

ISSN 0320-9725

Том 89, Номер 11

Ноябрь 2024



# БИОХИМИЯ



# СОДЕРЖАНИЕ

---

Том 89, № 11, 2024

---

## Молекулярные механизмы расстройств, связанных с употреблением психоактивных веществ (специальный выпуск)

Приглашённые редакторы: Н.В. Гуляева, Д.И. Перегуд

Роковой дуэт «зависимого» мозга и тела: психоактивные вещества, стресс и нейропластичность <i>Н.В. Гуляева, Д.И. Перегуд</i>	1769
Вклад висцеральных систем в развитие зависимости от психоактивных веществ: трансляционные аспекты взаимодействия центральных и периферических механизмов (обзор) <i>Д.И. Перегуд, Н.В. Гуляева</i>	1775
Алкоголь-индуцированная активация системы хемокинов и развитие нейровоспаления (обзор) <i>Е.В. Михалицкая, Н.М. Вялова, Н.А. Бохан, С.А. Иванова</i>	1799
Ассоциации периферических маркеров окислительного стресса с клиническими характеристиками и факторами воспаления у больных алкоголизмом <i>В.Д. Прокопьева, Т.П. Ветлугина, Е.В. Епимахова, А.С. Бойко, Н.А. Бохан</i>	1816
Изучение нейровоспаления в гиппокампе крыс при воздействии этанола и фармакологической коррекции азитромицином: новые данные и перспективы на будущее <i>М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, С.А. Шамаева, Е.Р. Бычков, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов</i>	1824
Нейроиммунные особенности животных с пренатальной алкогольной интоксикацией <i>И.Ю. Шамакина, П.К. Анохин, Р.А. Агельдинов, В.С. Кохан</i>	1837
Особенности поведения и активность ферментов крови потомства крыс, зачатых отцом в алкогольном опьянении <i>С.К. Судаков, Н.Г. Богданова, Г.А. Назарова, Н.Н. Золотов</i>	1847
Пурморфамин изменяет тревожно-подобное поведение и экспрессию компонентов каскада Hedgehog в мозге крыс после отмены алкоголя <i>Д.И. Перегуд, Н.И. Широбокова, А.А. Квичанский, М.Ю. Степаничев, Н.В. Гуляева</i>	1856
Пренатальная гипоксия вызывает нарушение экспрессии генов <i>chrna4</i> и <i>chrna7</i> в мозге взрослых крыс, не влияя на метаболизм ацетилхолина во время эмбрионального развития <i>О.В. Ветровой, С.С. Потапова, В.А. Стратилов, Е.И. Тюлькова</i>	1870
Низкомолекулярные миметики нейротрофина-3, отличающиеся паттерном активации пострецепторного сигналинга, по-разному ослабляют проявления синдрома отмены морфина у крыс <i>Л.Г. Колик, М.А. Константинопольский, С.В. Николаев, И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева</i>	1882
Внеклеточные везикулы как перспективные маркеры аддиктивных расстройств (обзор) <i>В.В. Северцев, М.А. Павкина, Н.Н. Иванец, М.А. Винникова, А.А. Яковлев</i>	1893

## РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

Разнообразие циркулирующих опухолевых маркеров: перспективы мультипараметрической жидкостной биопсии (обзор)

*Е.Ш. Кулигина, Г.А. Янус, Е.Н. Имяниотов*

1910

Роль ММП-2 и ММП-9 в реализации связи процессов воспаления, фиброза и апоптоза при прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени и диагностическая значимость плазменного уровня их активных форм

*И.В. Курбатова, Л.В. Топчиева, О.П. Дуданова, А.А. Шиповская*

1924

(Стрепт)авидин взаимодействует с гликоконъюгатами

*Н.В. Шилова, С.М. Полякова, А.Ю. Нокель, А.Д. Липатников, Е.А. Гордеева,  
М.В. Лаврентьева, Н.В. Бовин*

1950

Виментиновые и десминовые промежуточные филаменты поддерживают мембранный потенциал митохондрий

*А.А. Далял, О.И. Парфентьевая, Ван Хуэйин, А.С. Шахов, И.Б. Алиева, А.А. Минин*

1956

Полноразмерный репликон SARS-CoV-2 с двумя репортерами для скрининга ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса

*С.П. Королев, А.А. Шулепова, А.Н. Анисенко, С.О. Галкин, Л.А. Александрова, М.В. Ясько,  
Е.С. Матюгина, М.С. Новиков, А.Л. Хандажинская, С.Н. Кочетков, М.Б. Готтих*

1966

Гены днРНК семейства *SNHG*: кометилирование и общие функции при раке яичников

*Э.А. Брага, Е.А. Филиппова, Л.А. Урошлев, С.С. Лукина, И.В. Пронина, Т.П. Казубская,  
Д.Н. Кушлинский, В.И. Логинов, М.В. Фридман, А.М. Бурдённый, Н.Е. Кушлинский*

1982

Характеристика структурных свойств и антимикробной активности пептида C3f системы комплемента

*И.А. Кренев, Е.В. Егорова, М.М. Хайдукова, А.Д. Микушина, Я.А. Забродская, А.С. Комлев,  
И.Е. Елисеев, О.В. Шамова, М.Н. Берлов*

2002

# CONTENTS

---

---

Vol. 89, Issue 11, 2024

---

---

## Molecular Mechanisms of Substance Use Disorders (Special Issue)

Guest Editors: Natalia V. Gulyaeva and Danil I. Peregud

An Intricated <i>pas de deux</i> of Addicted Brain and Body Is Orchestrated by Stress and Neuroplasticity <i>N. V. Gulyaeva and D. I. Peregud</i>	1769
Invlovement of Visceral Systems in Substance Use Disorders: Translational Aspects of Interaction between Central and Peripheral Mechanisms (Review) <i>D. I. Peregud and N. V. Gulyaeva</i>	1775
Alcohol-Induced Activation of the Chemokine System and the Activation of Neuroinflammation (Review) <i>E. V. Mikhalitskaya, N. M. Vyalova, N. A. Bokhan, and S. A. Ivanova</i>	1799
Associations Oxidative Stress Peripheral Markers with Clinical Characteristics and Inflammatory Factors in Alcoholic Patients <i>V. D. Prokopieva, T. P. Vetlugina, E. V. Epimakhova, A. S. Boiko, and N. A. Bokhan</i>	1816
Study of Neuroinflammation in the Rat Hippocampus during Ethanol Exposure and Pharmacologic Correction with Azithromycin: New Data and Future Perspectives <i>M. I. Airapetov, S. O. Eresko, S. A. Shamaeva, E. R. Bychkov, A. A. Lebedev, and P. D. Shabanov</i>	1824
Neuroimmune Characteristics of Animals with Prenatal Alcohol Intoxication <i>I. Yu. Shamakina, P. K. Anokhin, R. A. Ageldinov, and V. S. Kokhan</i>	1837
Features of the Behavior and Activity of Blood Enzymes of the Offspring of Rats Conceived by Their Father under the Influence of Alcohol <i>S. K. Sudakov, N. G. Bogdanova, G. A. Nazarova, and N. N. Zolotov</i>	1847
Purmorphamine Affects Anxiety-Like Behavior and Expressions of Hedgehog Pathway Components in Rat Brain after Withdrawal <i>D. I. Peregud, N. I. Shirobokova, A. A. Kvichansky, M. Yu. Stepanichev, and N. V. Gulyaeva</i>	1856
Prenatal Hypoxia Predisposes to Impaired Expression of the <i>chrna4</i> and <i>chrna7</i> Genes in Adult Rats Without Affecting Acetylcholine Metabolism during Embryonic Development <i>O. V. Vetrovoy, S. S. Potapova, V. A. Stratilov, and E. I. Tyulkova</i>	1870
Low Molecular Weight Neurotrophin-3 Mimetics, Distinct in the Pattern of Activation of Postreceptor Signaling, Attenuate the Manifestations of Morphine Withdrawal in Rats in Different Ways <i>L. G. Kolik, M. A. Konstantinopolsky, S. V. Nikolaev, I. O. Logvinov, T. A. Antipova, and T. A. Gudasheva</i>	1882
Extracellular Vesicles as Promising Markers of Addictive Disorders (Review) <i>V. V. Severtsev, M. A. Pavkina, N. N. Ivanets, M. A. Vinnikova, and A. A. Yakovlev</i>	1893

## REGULAR ARTICLES

- The Diversity of Circulating Tumor Markers: A Trend Towards a Multimodal Liquid Biopsy (Review)  
*E. S. Kuligina, G. A. Yanus, and E. N. Imyanitov* 1910
- The Role of MMP-2 and MMP-9 in the Relationship of Inflammation, Fibrosis and Apoptosis during the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and the Diagnostic Significance of the Plasma Level of Their Active Forms  
*I. V. Kurbatova, L. V. Topchieva, O. P. Dudanova, and A. A. Shipovskaya* 1924
- (Strept)avidin Binds Glycoconjugates  
*N. V. Shilova, S. M. Polyakova, A. Yu. Nokel, A. D. Lipatnikov, E. A. Gordeeva, M. V. Lavrenteva, and N. V. Bovin* 1950
- Vimentin and Desmin Intermediate Filaments Maintain Mitochondrial Membrane Potential  
*A. A. Dayal, O. I. Parfenteva, W. Huiying, A. S. Shakhov, I. B. Alieva, and A. A. Minin* 1956
- Dual-Reporter SARS-CoV-2 Replicon for Screening Viral Polymerase Inhibitors  
*S. P. Korolev, A. A. Shulepova, A. N. Anisenko, S. O. Galkin, L. A. Alexandrova, M. V. Jasko, E. S. Matyugina, M. S. Novikov, A. L. Khandazhinskaya, S. N. Kochetkov, and M. B. Gottikh* 1966
- LncRNA Genes of the SNHGs Family: Cometylation and Common Functions in Ovarian Cancer  
*E. A. Braga, E. A. Filippova, L. A. Uroshev, S. S. Lukina, I. V. Pronina, T. P. Kazubskaya, D. N. Kushlinskiy, V. I. Loginov, M. V. Fridman, A. M. Burdennyy, and N. E. Kushlinskii* 1982
- Characterization of Structural Properties and Antimicrobial Activity of Complement System C3f Peptide  
*I. A. Krenev, E. V. Egorova, M. M. Khaydukova, A. D. Mikushina, Y. A. Zabrodskaya, A. S. Komlev, I. E. Eliseev, O. V. Shamova, and M. N. Berlov* 2002

## РОКОВОЙ ДУЭТ «ЗАВИСИМОГО» МОЗГА И ТЕЛА: ПСИХОАКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, СТРЕСС И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТЬ

© 2024 Н.В. Гуляева<sup>1,2\*</sup>, Д.И. Перегуд<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
117485 Москва, Россия; электронная почта: nata\_gul@ihna.ru

<sup>2</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы  
«Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева»  
Департамента здравоохранения города Москвы, 115419 Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский  
исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119034 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.08.2024

После доработки 13.08.2024

Принята к публикации 13.08.2024

Зависимость от психоактивных веществ представляет собой феномен, в основе которого лежит изменение под их действием общих молекулярно-клеточных механизмов, структур и нейронных сетей, лежащих в основе нормального функционирования мозга и реализующих стрессорный ответ, подкрепление и аверсию, обучение и память. В результате формируются состояния aberrантной пластичности, ассоциированные с соматическими изменениями, которые определяют патогенез и симптоматику химической зависимости и одновременно могут рассматриваться как мишени для разработки терапии таких зависимостей. Представлена основанная на холистическом подходе интегративная схема участия стресса и нейропластических изменений в формировании порочного круга синдрома патологической зависимости от психоактивных веществ. Этот спецвыпуск журнала посвящен молекулярным механизмам расстройств, связанных с употреблением психоактивных веществ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** психоактивные вещества, зависимость, мозг, стресс, нейропластичность, нейроэндокринные механизмы.

DOI: 10.31857/S0320972524110014 EDN: ILHSWQ

Алкоголь убивает нервные клетки.  
Остаются только спокойные.

Фраза, приписываемая Бернарду Шоу

Этот выпуск журнала «Биохимия» посвящен молекулярным механизмам зависимости от психоактивных веществ. Психоактивные вещества (ПАВ) – химические соединения с различными фармакодинамическими свойствами и молекулярными мишениями – объединены способностью вызывать чувство удовлетворения и эйфории, что при хроническом приеме может сопровождаться развитием патологической зависимости [1]. Формирование зависимости от ПАВ (алкоголя, нарко-

тиков, ненаркотических ПАВ) является хроническим рецидивирующими процессом у имеющих биологическую предрасположенность лиц, при котором ПАВ при наличии специфических внешних стимулов вызывают в целом сходные адаптационные процессы на молекулярном, клеточном и функциональном уровнях.

Адаптационные процессы в мозге реализуются в форме нейропластичности, которая охватывает многообразные процессы на уровне от молекул до нервных сетей [2]. При этом с точки зрения интегративной нейробиологии была сформулирована концепция о континууме нейропластичности и нейропатологии. Очевидно, что общность и плейотропность механизмов на молекулярном,

Принятые сокращения: ВОП – вентральная область покрышки; ГГНО – гипоталамо-гипофизарная-надпочечниковая ось; ГП – гиппокамп; ПАВ – психоактивное вещество; ПФК – префронтальная кора; СТР – стриатум.

\* Адресат для корреспонденции.

синаптическом, клеточном и сетевом уровнях ассоциирована с высокой адаптивной пластичностью ряда отделов мозга (например, гиппокампа), ответственных за его интегративную функцию, в т.ч. обучение и память [3]. При этом ценой высокой пластичности становится селективная чувствительность этих структур к развитию различных патологических процессов.

Трудности лечения и профилактики зависимостей от ПАВ связаны со сложностью и многомерностью механизмов формирования таких зависимостей, множественных состояний в континууме пластичности-патологии, которые развиваются на основе фундаментальных физиологических механизмов функционирования мозга, таких как стресс-реактивность, подкрепление и аверсия, обучение и память. Холистический подход (термин «холизм» был введен в 1926 г. Я. Смэтсом (J. Smuts)) [4], интегрирующий различные механизмы и аспекты развития зависимости, представляется нам адекватным аналитическим инструментом, который позволяет учесть многофакторность и многоэтапность феномена зависимости и понять, каким образом последовательно изменяется функционирование мозга от изменения активности генома, биохимических изменений, ремоделирования нейрональных связей до выхода поведенческих актов на новый уровень [5].

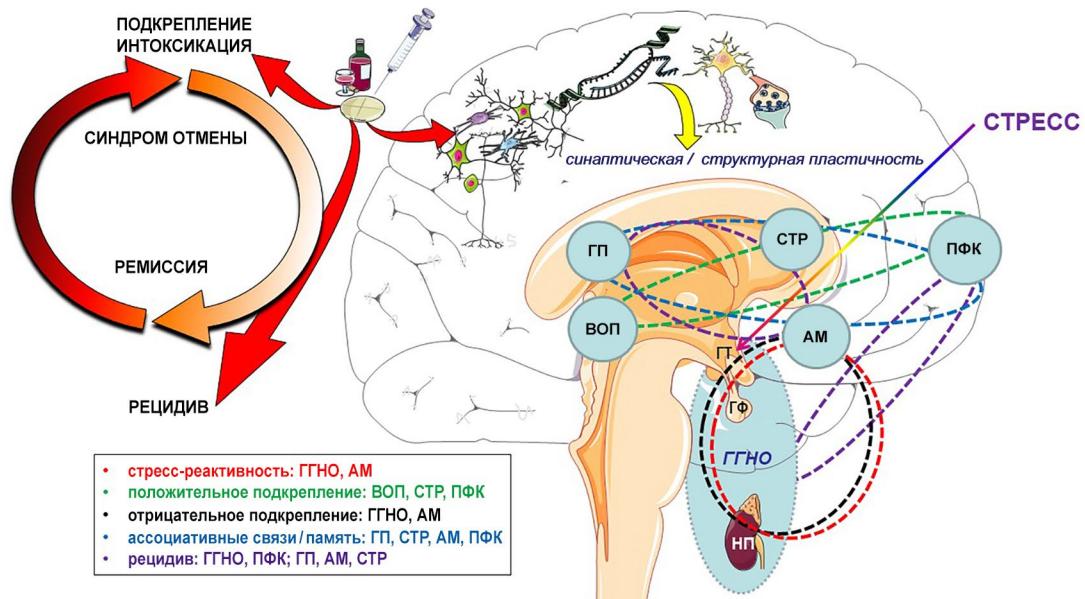
Такой подход тем более важен, что формирование зависимостей от ПАВ происходит в результате тесного взаимодействия центральных и периферических систем. В обзоре [6] данного выпуска представлены современные представления о молекулярных механизмах, которые лежат в основе взаимодействия висцеральных систем с центральными механизмами химической зависимости. Болезни зависимости ассоциированы с измененной пластичностью специфических структур мозга, при этом развитие зависимостей сопровождается стрессорными реакциями, адаптивными процессами, процессами обучения и памяти, реализация которых находится под контролем центральной нейрогуморальной стресс-реализующей системы, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО). Эта система тесно связана с иммунными реакциями, процессами воспаления и функционирует в качестве ключевого регулятора важнейших событий, запускающих пластические изменения в мозге, – системных воспалительных процессов и нейровоспаления [7]. В данном выпуске представлен обзор [8], а также работы, касающиеся роли воспалительных процессов в патогенезе алкогольной зависимости в клинике [9] и модельных экспериментах на животных [10, 11].

На рис. 1 представлена интегративная схема участия стресса и нейропластических измене-

ний в формировании порочного круга синдрома патологической зависимости от ПАВ в результате изменений пластичности основных вовлеченных структур мозга. Непрямую или опосредованно ПАВ стимулируют дофаминергические проекции центральной области покрышки (ВОП) в стриатум (СТР) и префронтальную кору (ПФК), что составляет ключевой механизм подкрепления [12, 13]. ПАВ влияют на систему подкрепления, которая в обычных условиях является мишенью естественных стимулов [14], однако степень воздействия ПАВ несопоставимо выше [15]. При сочетании внешних (стресс [16]) и внутренних (генетическая предрасположенность [17]) факторов становится возможной добровольная хроническая интоксикация, которая со временем может приобретать неконтролируемый характер и сопровождаться развитием толерантности и формированием устойчивых условных ассоциативных связей [18]. Считается, что на данном этапе задействованы стресс-реактивная ГГНО, ПФК как центр принятия решений и гиппокамп (ГП) как структура, ключевая для обучения и формирования памяти.

Изменение спектра экспрессируемых генов в специфических отделах мозга, эпигенетические изменения, нарушения в нейрохимических системах биогенных аминов, нейропептидов, возбуждающих и тормозных аминокислот (в данном выпуске этим аспектам посвящены работы [19–21]), нарушение трофической регуляции нейронов, развитие воспалительного процесса и как результат – активные структурно-функциональные перестройки мезокортиколимбической системы являются основой адаптационного процесса перехода ЦНС на функционирование в условиях хронической интоксикации ПАВ [22, 23]. Расстройства, развивающиеся в результате злоупотребления ПАВ, рассматриваются как патологическая форма обучения и консолидации памяти, сопровождающаяся изменением архитектуры синаптических контактов в результате адаптивных процессов во внутриклеточных сигнальных каскадах дофаминергических нейронов, прежде всего в каскаде протеинкиназы А-транскрипционный фактор CREB [24].

Прекращение поступления ПАВ при сформированной зависимости сопровождается дефицитом положительного подкрепления, развитием болезненного синдрома отмены, который имеет как физиологические проявления, так и выраженный аффективный компонент. Абстинентные расстройства являются дополнительным стрессорным фактором и основой формирования отрицательного подкрепления. Ключевая роль в развитии аффективного компонента абстинентных расстройств отводится амигдале (амигдалярному комплексу) и ГГНО [25]. Исходя из концепции



**Рис. 1.** Участие стресса и нейропластических изменений в формировании порочного круга синдрома патологической зависимости от психоактивных веществ (ПАВ): холистический подход. Развитие зависимости от ПАВ осуществляется на базе фундаментальных механизмов нормального функционирования мозга, включая стресс-реактивность, подкрепление (положительное и отрицательное), обучение и память. Различные ПАВ, наряду со специфическими эффектами, вызывают типовые адаптивные и патологические процессы на молекулярном, клеточном и функциональном уровнях. В процессе формирования зависимости ключевой механизм влияния ПАВ на функционирующую в норме систему положительного подкрепления составляет стимуляция дофаминергических проекций вентральной области покрышки (ВОП) в стриатум (СТР) и действие на префронтальную кору (ПФК). При этом стрессорные факторы, действие которых опосредовано стресс-реактивной гипоталамо-гипофизарной-надпочечниковой осью (ГГНО; ГП – гипоталамус, ГФ-гипофиз, НП – надпочечники) во взаимодействии с ядрами амигдалы (АМ) способствуют добровольной хронической интоксикации, которая становится неконтролируемой. Это сопровождается развитием толерантности к ПАВ и формированием условных ассоциативных связей, при этом включается система ключевых структур в процессах обучения и памяти: гиппокамп (ГП), ПФК и АМ, которая имеет тесные связи с ГГНО. Прекращение поступления ПАВ при сформированной зависимости сопровождается развитием синдрома отмены (абstinентным синдромом), который, проявляясь на физиологическом и аффективном уровнях, ассоциирован со снижением положительного подкрепления. Абстинентные расстройства становятся новым тяжелым стрессорным фактором, на базе которого формируется отрицательное подкрепление, опосредованное ГГНО и АМ. С дисфункцией ГГНО связано и проявление рецидива, развивающегося на фоне ослабления контроля со стороны ПФК. Реконсолидация памяти – физиологический триггер рецидива, а АМ, ГП и СТР – ключевые структуры. Ассоциированные с развитием зависимости изменения нейропластичности охватывают все уровни, от эпигенетического, молекулярного и синаптического до клеточного и сетевого. Хроническая интоксикация ПАВ приводит как к адаптивным, так и патологическим изменениям экспрессии различных генов, нейрохимическим нарушениям в системах нейромедиаторов и трофических факторов, развитию воспалительного процесса и как результат – структурно-функциональным перестройкам задействованных структур. Следует учесть, что приведенные на рисунке ассоциации структур головного мозга с определенными этапами формирования зависимости достаточно условны и не могут учесть всех известных связей между указанными и другими структурами мозга. Тем не менее, очевидно, что функциональная плеiotропность структур мозга, задействованных в процессах стресса, адаптации, обучения и памяти, характерная для здорового мозга, играет важную роль и при формировании зависимости, с одной стороны, обеспечивая процессы адаптации к интоксикации ПАВ, а с другой стороны, формируя патологический фенотип зависимости. В итоге зависимость от ПАВ реализуется на базе фундаментальных физиологических механизмов функционирования мозга, таких как стресс, подкрепление и аверсия, обучение и память. В приведенной на этом рисунке интегративной схеме использована информация, представленная в статьях [12, 13, 18, 25–28], а также шаблонов Servier Medical Art (Servier), предоставленных по свободной лицензии Creative Commons Attribution 3.0 unported license.

зависимости как aberrantной формы обучения и памяти сочетание условных и безусловных стимулов приводит к реконсолидации памяти, что является триггером рецидива. Амигдала, ГП и СТР являются ключевыми структурами этого процесса, а сигнальные каскады, инициируемые дофаминовыми и глутаматными рецепторами, – его моле-

кулярной основой [26]. Рецидив также связывают с ослаблением контроля со стороны ПФК [27]. Нарастание стрессорного влияния, развитие депрессивной симптоматики, которые сопровождаются активацией ГГНО, снижением трофической регуляции и атрофией областей лобной коры являются предикторами рецидива [28]. Череда

положительного и отрицательного подкрепления кристаллизует ассоциативные связи зависимости и нарушает гомеостатические механизмы функционирования ЦНС [29]. Таким образом, синдром патологической зависимости от ПАВ – это порочный круг, состоящий из циклов интоксикации и воздержания с вовлечением анатомических субстратов, специфических для каждого акта (рис. 1).

С увеличением длительности срока воздержания структурно-функциональные нарушения в ЦНС постепенно восстанавливаются [30]. Иными словами, если исключить поступление ПАВ при отсутствии значимого органического повреждения, мозг достигнет если не исходных параметров функционирования, то по крайне мере максимально к ним приблизится. Ключевой аспект зависимости – это влечение к ПАВ, которое при стечении внешних обстоятельств и внутренней готовности приведет к реализации мотивационного акта и последующему рецидиву. Одна из основных задач терапии – стабилизировать ремиссию, предотвратить реконсолидацию памяти, ослабить влечение и мотивацию к употреблению. Разработка подходов к патогенетически обоснованной терапии болезней зависимости основана, в том числе, на понимании важной роли изменений систем нейротрофических факторов в развитии зависимости от ПАВ [31]. В этом выпуске представлена работа, в которой показано, что низкомолекулярные миметики нейротрофина-3 ослабляют соматические проявления синдрома отмены морфина у крыс [32]. С другой стороны, важной проблемой является поиск новых биомаркеров, отражающих процессы, происходящие в головном мозге, при формировании зависимости от ПАВ. В данном выпуске этому аспекту посвящена

обзорная статья о малых внеклеточных везикулах в периферической крови [33].

Подводя итог, можно заключить, что химическая зависимость – поистине удивительный феномен, в основе которого лежит usurпация ПАВ общих молекулярно-клеточных механизмов, структур и нейронных сетей, фундаментальных для нормального функционирования мозга, на базе которых реализуются стрессорный ответ, подкрепление и аверсия, обучение и память. В результате формируются состояния аберрантной пластичности, ассоциированные с соматическими изменениями, которые лежат в основе патогенеза и симптоматики зависимости от ПАВ и одновременно являются мишениями для разработки терапии таких зависимостей. При этом важно отметить, что общие механизмы патогенеза на молекулярно-клеточном и сетевом уровне объясняют высокую частоту коморбидности зависимости от ПАВ и многих других психических заболеваний [17, 34, 35].

**Вклад авторов.** Н.В. Гуляева – концепция, поиск и анализ данных литературы, окончательное редактирование статьи; Д.И. Перегуд – концепция, поиск и анализ данных литературы, написание первичного текста.

**Финансирование.** Работа поддержана АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении» (соглашение № 0702-1/23).

**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. Ciucă Anghel, D. M., Nițescu, G. V., Tiron, A. T., Guțu, C. M., and Baconi, D. L. (2023) Understanding the mechanisms of action and effects of drugs of abuse, *Molecules*, **28**, 4969, <https://doi.org/10.3390/molecules28134969>.
2. Gulyaeva, N. V. (2017) Molecular mechanisms of neuroplasticity: An expanding universe, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 237-242, <https://doi.org/10.1134/S0006297917030014>.
3. Gulyaeva, N. V. (2022) Multi-level plasticity-pathology continuum of the nervous system: functional aspects, *Neurochem. J.*, **16**, 424-428, <https://doi.org/10.1134/S1819712422040092>.
4. Smuts, J. C. (1926) *Holism and Evolution*, Macmillan and Co., Limited, London.
5. Valentino, R. J., Nair, S. G., and Volkow, N. D. (2024) Neuroscience in addiction research, *J. Neural. Transm. (Vienna)*, **131**, 453-459, <https://doi.org/10.1007/s00702-023-02713-7>.
6. Peregud, D. I., and Gulyaeva, N. V. (2024) Contribution of visceral systems to the development of substance use disorders: translational aspects of interaction between central and peripheral mechanisms, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1868-1888, <https://doi.org/10.1134/S0006297924110026>.
7. Gulyaeva, N. V. (2023) Glucocorticoids orchestrate adult hippocampal plasticity: growth points and translational aspects, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 565-589, <https://doi.org/10.1134/S0006297923050012>.
8. Mikhailitskaya, E. V., Vyalova, N. M., Bokhan, N. A., and Ivanova, S. A. (2024) Alcohol-induced activation of chemo-kine system and neuroinflammation development, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1889-1903, <https://doi.org/10.1134/S0006297924110038>.

9. Prokopieva, V. D., Vetlugina, T. P., Epimakhova, E. V., Boiko, A. S., and Bokhan, N. A. (2024) Association of peripheral markers of oxidative stress with clinical parameters and inflammatory factors in alcoholic patients, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1904-1910, <https://doi.org/10.1134/S000629792411004X>.
10. Airapetov, M. I., Eresko, S. O., Shamaeva, S. A., Bychkov, E. R., Lebedev, A. A., and Shabanov, P. D. (2024) Study of neuroinflammation in the rat hippocampus during ethanol exposure and pharmacological correction with azithromycin: new data and future perspectives, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1911-1921, <https://doi.org/10.1134/S0006297924110051>.
11. Shamakina, I. Yu., Anokhin, P. K., Ageldinov, R. A., and Kokhan, V. S. (2024) Neuroimmune characteristics of animals with prenatal alcohol intoxication, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1922-1929, <https://doi.org/10.1134/S0006297924110063>.
12. Cooper, S., Robison, A. J., and Mazei-Robison, M. S. (2017) Reward circuitry in addiction, *Neurotherapeutics*, **14**, 687-697, <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z>.
13. Hayes, A., Herlinger, K., Paterson, L., and Lingford-Hughes, A. (2020) The neurobiology of substance use and addiction: evidence from neuroimaging and relevance to treatment, *BJPsych. Adv.*, **26**, 367-378. doi:10.1192/bja.2020.68.
14. Tan, B., Browne, C.J., Nöbauer, T., Vaziri, A., Friedman, J. M., and Nestler, E. J. (2024) Drugs of abuse hijack a mesolimbic pathway that processes homeostatic need, *Science*, **384**, eadk6742, <https://doi.org/10.1126/science.adk6742>.
15. Wightman, R. M., and Robinson, D. L. (2002) Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with 'reward', *J. Neurochem.*, **82**, 721-735, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01005.x>.
16. Ruisoto, P., and Contador, I. (2019) The role of stress in drug addiction. An integrative review, *Physiol. Behav.*, **202**, 62-68, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.01.022>.
17. Miller, A. P., Bogdan, R., Agrawal, A., and Hatoum, A. S. (2024) Generalized genetic liability to substance use disorders, *J. Clin. Invest.*, **134**, e172881, <https://doi.org/10.1172/JCI172881>.
18. Koob, G. F., and Volkow, N. D. (2010) Neurocircuitry of addiction, *Neuropsychopharmacology*, **35**, 217-238, <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>.
19. Peregud, D. I., Shirobokova, N. I., Kvichansky, A. A., Stepanichev, M. Yu., and Gulyaeva, N. V. (2024) Purmorphamine alters anxiety-like behavior and expression of hedgehog cascade components in rat brain after alcohol withdrawal, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1938-1949, <https://doi.org/10.1134/S0006297924110087>.
20. Vetrovoy, O. V., Potapova, S. S., Stratilov, V. A., and Tyulkova, E. I. (2024) Prenatal hypoxia predisposes to impaired expression of the *chrna4* and *chrna7* genes in adult Rats without affecting acetylcholine metabolism during embryonic development, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1950-1960, <https://doi.org/10.1134/S0006297924110099>.
21. Sudakov, S. K., Bogdanova, N. G., Nazarova, G. A., and Zolotov N. N. (2024) Behavioral features and blood enzyme activity in offspring of rats conceived from an alcohol-intoxicated father, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1930-1937, <https://doi.org/10.1134/S0006297924110075>.
22. Korpi, E. R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D. J., Hyytiä, P., and Dawe, G. S. (2015) Mechanisms of action and persistent neuroplasticity by drugs of abuse, *Pharmacol. Rev.*, **67**, 872-1004, <https://doi.org/10.1124/pr.115.010967>.
23. Nestler, E. J., and Lüscher, C. (2019) The molecular basis of drug addiction: linking epigenetic to synaptic and circuit mechanisms, *Neuron*, **102**, 48-59, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.016>.
24. Liu, X., Wang, F., Le, Q., and Ma, L. (2023) Cellular and molecular basis of drug addiction: The role of neuronal ensembles in addiction, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **83**, 102813, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102813>.
25. Koob, G. F. (2021) Drug addiction: hyperkatifeia/negative reinforcement as a framework for medications development, *Pharmacol. Rev.*, **73**, 163-201, <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000083>.
26. Milton, A. L. (2023) Drug memory reconsolidation: from molecular mechanisms to the clinical context, *Transl. Psychiatry*, **13**, 370, <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02666-1>.
27. Garavan, H., Brennan, K. L., Hester, R., and Whelan, R. (2013) The neurobiology of successful abstinence, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **23**, 668-674, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.029>.
28. Sinha, R. (2011) New findings on biological factors predicting addiction relapse vulnerability, *Curr. Psychiatry Rep.*, **13**, 398-405, <https://doi.org/10.1007/s11920-011-0224-0>.
29. Ferrer-Pérez, C., Montagud-Romero, S., and Blanco-Gandía, M. C. (2024) Neurobiological theories of addiction: a comprehensive review, *Psychoactives*, **3**, 35-47, <https://doi.org/10.3390/psychoactives3010003>.
30. Parvaz, M. A., Rabin, R. A., Adams, F., and Goldstein, R. Z. (2022) Structural and functional brain recovery in individuals with substance use disorders during abstinence: a review of longitudinal neuroimaging studies, *Drug Alcohol Depend.*, **232**, 109319, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2022.109319>.
31. Peregud, D. I., Baronets, V. Y., Terebilina, N. N., and Gulyaeva, N. V. (2023) Role of BDNF in neuroplasticity associated with alcohol dependence, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 404-416, <https://doi.org/10.1134/S0006297923030094>.

32. Kolik, L. G., Konstantinopolsky, M. A., Nikolaev, S. V., Logvinov, I. O., Antipova, T. A., and Gudasheva, T. A. (2024) Low-molecular neurotrophin-3 mimetics with different patterns of postreceptor signaling activation attenuate differentially morphine withdrawal in rats, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1961-1969, <https://doi.org/10.1134/S0006297924110105>.
33. Severtsev, V. V., Pavkina, M. A., Ivanets, N. N., Vinnikova, M. A., and Yakovlev, A. A. (2024) Extracellular vesicles as potential biomarkers in addictive disorders, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 1970-1984, <https://doi.org/10.1134/S0006297924110117>.
34. Nardi, W. R., Kelly, P., Roy, A., Becker, S., Brewer, J., and Sun, S. (2024) A systematic review and meta-analysis of psychosocial interventions for persons with comorbid anxiety and substance use disorders, *J. Subst. Use Addict. Treat.*, **165**, 209442, <https://doi.org/10.1016/j.josat.2024.209442>.
35. De Aguiar, A. C. L., and Bloc, L. G. (2024) Transdiagnosis of alcohol use and psychopathologies: a systematic review, *Addict. Behav. Rep.*, **19**, 100543, <https://doi.org/10.1016/j.abrep.2024.100543>.

## **AN INTRICATED *pas de deux* OF ADDICTED BRAIN AND BODY IS ORCHESTRATED BY STRESS AND NEUROPLASTICITY**

**N. V. Gulyaeva<sup>1,2\*</sup> and D. I. Peregud<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,  
117485 Moscow, Russia; e-mail: nata\_gul@ihna.ru*

<sup>2</sup> *Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department,  
115419 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Federal State Budgetary Institution “V. Serbsky National Medical Research Center  
for Psychiatry and Drug Addiction” of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
119034 Moscow, Russia*

Dependence on psychoactive substances is a phenomenon that is based on the alterations of common molecular cellular mechanisms, structures and neuronal networks underlying normal brain functioning and realizing stress response, reinforcement and aversion, learning and memory. As a result, aberrant neuroplasticity states associated with somatic changes are formed, which determine the pathogenesis and symptoms of chemical dependence and at the same time can be considered as targets for the development of therapies for such addictions. An integrative scheme of stress and neuroplastic changes participation in the formation of the vicious circle of pathological substance dependence syndrome based on a holistic approach is presented.

**Keywords:** psychoactive substances, addiction, brain, stress, neuroplasticity, neuroendocrine mechanisms

## ВКЛАД ВИСЦЕРАЛЬНЫХ СИСТЕМ В РАЗВИТИЕ ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ: ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦЕНТРАЛЬНЫХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ

### Обзор

© 2024 Д.И. Перегуд<sup>1,2\*</sup>, Н.В. Гуляева<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России,  
119034 Москва, Россия; электронная почта: peregud\_d@yahoo.com

<sup>2</sup> ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
117485 Москва, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева»  
Департамента здравоохранения города Москвы, 115419 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.05.2024

После доработки 08.07.2024

Принята к публикации 11.07.2024

Синдром патологической зависимости от психоактивных веществ формируется при хронической интоксикации. В основе этого синдрома лежат структурно-функциональные изменения нейроэндокринных, нейромедиаторных и нейромодуляторных систем в специфических областях головного мозга, связанных с механизмами подкрепления и стресс-реактивности. На фоне интоксикации могут утяжеляться течения существующих болезней и развиваться новые соматические заболевания. Расстройства, связанные с употреблением психоактивных веществ, и коморбидное заболевание оказывают взаимное влияние, усугубляя клиническое течение каждого. Выявление общих биохимических механизмов коморбидности может являться основой создания и внедрения в практику эффективных средств фармакологической коррекции, включая репозиционирование известных препаратов. В настоящем обзоре представлены современные представления о молекулярных механизмах, которые лежат в основе взаимодействия висцеральных систем с центральными механизмами химической зависимости.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** психоактивные вещества, зависимость, мозг, висцеральные системы, нейроэндокринные механизмы, нейромедиаторы, нейромодуляторы, соматические заболевания.

DOI: 10.31857/S0320972524110029 EDN: ILDFUE

### ВВЕДЕНИЕ. ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ – ЗАБОЛЕВАНИЕ НЕ ТОЛЬКО ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Не менее 1% населения мира страдает расстройствами, связанными с потреблением психоактивных веществ (ПАВ, вещества, влияющие на

функции центральной нервной системы (ЦНС) и приводящие к изменению психического состояния, вплоть до измененного состояния сознания). Эти расстройства являются тяжелым социально-экономическим бременем; а их распространенность, заболеваемость и величина экономических потерь демонстрируют стойкую тенденцию к росту [1]. Расстройства, развивающиеся в результате

Принятые сокращения: АПФ – ангиотензин-превращающий фермент; ГГНО – гипоталамо-гипофизарная-надпочечниковая ось; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ПАВ – психоактивное вещество; ССС – сердечно-сосудистая система; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ANP – предсердный натрийуретический пептид; BDNF – нейротрофический фактор мозга; FGF – ростовой фактор фибробластов; GLP-1 – глюкагоноподобный пептид-1; PPAR – рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом.

\* Адресат для корреспонденции.

потребления ПАВ, характеризуются хроническим рецидивирующими течением, потерей контроля и чрезмерным потреблением ПАВ, несмотря на очевидные негативные последствия. В основе патогенеза таких состояний лежат изменения функционирования нейроэндокринных, нейромедиаторных и нейромодуляторных систем в специфических областях головного мозга, связанных с механизмами подкрепления и стресс-реактивности [2]. Поскольку хроническое воздействие ПАВ сопровождается, наряду с патологическими процессами, также и адаптивными реакциями в ЦНС, химическая зависимость рассматривается и как вариант своеобразной аберрантной нейропластичности [3], в которой определяющую роль может играть дисбаланс нейротрофинов [4].

Несмотря на определенные успехи в понимании закономерностей хронического воздействия ПАВ, возможности и эффективность фармакотерапии зависимостей остаются достаточно ограниченными. Так, Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA, U.S. Food and Drug Administration) для лечения расстройств, связанных с потреблением ПАВ, одобрены единичные фармпрепараты. Например, для лечения зависимости от алкоголя одобрены только ингибитор ацетальдегиддегидрогеназы дисульфирам, антагонист опиоидных рецепторов налтрексон и препарат с нейромодулирующим действием акампромасат [5], а для лечения опийной зависимости – налтрексон и опиоиды, используемые в заместительной терапии (бупренорфин и метадон) [6]. При этом препараты, одобренные для лечения зависимости от психостимуляторов (психотропные вещества, активизирующие психическую и в меньшей степени физическую активность организма), на рынке отсутствуют. Очевидно, что препараты, используемые в терапии зависимостей, преимущественно действуют на центральные нейромедиаторные системы и соответствующие рецепторы. Высокая социальная и биологическая значимость данных расстройств и ограниченность терапевтических подходов определяет актуальность изучения биологических механизмов всех уровней (от молекулярного до интегративного на уровне организма), опосредующих формирование и течение болезней химической зависимости.

Расстройства, развивающиеся в результате потребления ПАВ, характеризуются периодическим или постоянным течением с увеличением дозировки потребляемого вещества в результате развития толерантности, потерей контроля, развитием синдрома отмены, озабоченностью поиском или употреблением вещества, а также продолжением злоупотребления, несмотря на очевидные психологические, физические и социаль-

ные последствия [7, 8]. По сути, процессы рискованного потребления, пристрастия и зависимости интегрированы в единую психопатологическую структуру, ключевым субстратом которой является головной мозг [9, 10]. Критерии различных систем классификации этих расстройств недостаточно учитывают вклад физического здоровья в формирование зависимости от ПАВ. Это, несомненно, существенное упущение, потому что по умолчанию такие расстройства представляют как заболевание ЦНС, игнорируя вовлеченность практически всех висцеральных систем организма, о которой и пойдет речь в данном обзоре.

ПАВ являются ксенобиотиками и, следовательно, токсичность ПАВ, помимо влияния на ЦНС, оказывает значимое действие на функционирование внутренних органов. Не удивительно, что злоупотреблению ПАВ зачастую сопутствуют коморбидные заболевания, например, кардиометаболический синдром [11], эндокринопатии [12], нарушения пищевого поведения [13] и ряд других. Примерно у половины потребителей ПАВ с зависимостью имеется хотя бы одно хроническое соматическое заболевание [14]. Наличие расстройств, связанных с потреблением ПАВ, значительно повышает риск развития соматической патологии [15]. Коморбидность соматической патологии и зависимости от ПАВ значительно повышает смертность от многих заболеваний, включая заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), сердечно-сосудистой системы (ССС), эндокринные заболевания и патологии, связанные с метаболическими нарушениями [16]. Распространенность болезней зависимости у лиц с расстройством пищевого поведения достигает 40%, а расстройство пищевого поведения у лиц с зависимостью может достигать 30%, что значительно выше доли в общей популяции [17]. Коморбидность расстройств пищевого поведения с зависимостью от ПАВ при этом повышает риск развития соматических заболеваний [18]. Нарушение циркадианых ритмов, структуры сна, его качества и длительности сопутствует злоупотреблению ПАВ, достигая 90% в случае алкогольной зависимости [19] и до 80% – в случае зависимости от нелегальных ПАВ [20]; это значительно превосходит долю людей с проблемами со сном в популяции в целом. Нарушения пищевого поведения и нарушения сна относятся к психоневрологическим расстройствам и тесно связаны с физическим здоровьем человека.

Несомненно, психическое и физическое здоровье тесно взаимосвязаны [21]. Это очень ярко проявляется на примере заболеваний аффективного спектра. Доказано, что в основе развития стресс-индукционных психических расстройств, в частности, психогенной депрессии, лежит тесное взаимодействие центральных и перифери-

ческих механизмов [22]. Подобный пример особенно важен для рассмотрения формирования зависимостей ввиду того, что психопатологически пристрастие формируется как средство достижения ощущения благополучия на фоне хронического стресса и психического напряжения [23], т.е. в определенной степени представляет попытку адаптации к стрессу. Действительно, при развитии патологического паттерна потребления ПАВ отмечается дисбаланс в системе стресс-реактивности [2]. В развитии патологии мозга в условиях хронического стресса и формирования депрессивного фенотипа ключевая роль отводится стресс-реактивным системам и их медиаторам – кортикостероидам [24, 25]. Вероятность развития депрессии значительно увеличивается в условиях хронической соматической патологии, в свою очередь, депрессия рассматривается как самостоятельный фактор риска повышенного уровня заболеваемости и смертности при многих соматических заболеваниях. При этом эффективная терапия депрессии способствует не только восстановлению психического здоровья, но и способствует улучшению клинического прогноза сопутствующих соматических заболеваний [26].

Таким образом, расстройства, связанные с употреблением ПАВ, и коморбидное соматическое заболевание оказывают взаимное влияние, утяжеляя клиническое течение каждого из них. Кроме того, хроническое злоупотребление ПАВ является фактором риска соматической патологии и наоборот. Очевидно, что выявление общих биологических механизмов на молекулярном уровне может являться основой создания и внедрения в практику новых эффективных средств фармакологической коррекции соответствующих коморбидных заболеваний.

В связи с этим основной целью обзора явился проведенный впервые концептуальный анализ связей периферических систем с центральными биохимическими механизмами формирования зависимости от ПАВ. Настоящая работа представляет собой традиционный критический обзор литературы. Поисковые запросы велись посредством ключевых слов [наименование интересующего соединения/медиатора или процесса И зависимость от психоактивных веществ ИЛИ расстройство, связанное с употреблением психоактивных веществ] с помощью русскоязычного ресурса «Научная электронная библиотека» (eLIBRARY.ru), а также аналогичных терминов на английском языке в базах MEDLINE (PubMed) и Google Scholar. Поиск литературы в основном велся за последние 5 лет, также включались более ранние значимые работы. Описание соответствующих периферических медиаторов сгруппировано по анатомической локализации и их принад-

лежности к системе органов либо по вовлеченности в сопряженный физиологический процесс. Несомненно, разделение по системам и органам весьма условно, т.к. все описанные биологически активные молекулы плейотропны.

### МЕДИАТОРЫ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ И ВОДНО-СОЛЕВОГО БАЛАНСА

**Эндотелин** синтезируется во многих типах клеток с преимущественной локализацией в эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов, а также в макрофагах, фибробластах и нейронах головного мозга [27]. Физиологическая активность эндотелина проявляется за счет активации соответствующих рецепторов подтипов A (ETA) и B (ETB), которые являются трансмембранными рецепторами, ассоциированными с G-белками. Стимуляция ETA-рецепторов сопровождается вазоконстрикцией и развитием воспаления, в то время как стимуляция ETB-рецепторов в целом оказывает противоположный эффект [27]. Активация эндотелиновых рецепторов, расположенных в головном мозге, обеспечивает их вовлеченность в ряд патофизиологических процессов ЦНС. ETA-рецепторы модифицируют антиоцидантный эффект опиатов, а также развитие толерантности [28]. Предполагается, что блокада ETA-рецепторов потенцирует антиоцидантную активность опиатов, а также снижает развитие десенсилизации и толерантности за счет восстановления ассоциации Gi-белков с опиоидными рецепторами, а также предотвращения их десенсилизации, опосредованной  $\beta$ -аррестином [28]. Кроме того, введение антагониста эндотелиновых ETA-рецепторов BQ123 в желудочки мозга ослабляет проявления синдрома отмены оксикодона и морфина у мышей, что свидетельствует о вовлеченности эндотелина в механизмы формирования зависимости [29]. Несмотря на очевидный потенциал антагонистов эндотелиновых рецепторов в отношении зависимости от опиатов и появление на фармацевтическом рынке одобренных антигипертензивных препаратов с данной фармакологической активностью, до настоящего времени клинических исследований проведено не было.

**Предсердный натриуретический пептид** (ANP, Atrial natriuretic peptide) – гормон, продуцируемый кардиомиоцитами в ответ на растяжение миокарда. Связываясь с рецептором, обладающим гуанилатциклазной активностью, ANP стимулирует образование cGMP, который опосредует биологические функции пептида. ANP проявляет плейотропные эффекты, включая расслабление гладкой мускулатуры сосудов, регуляцию водно-солевого баланса за счет влияния на экскрецию натрия,

подавление системы ренин–ангиотензин–альдостерон, стимулирует липолиз и окисление липидов, а также влияет на чувствительность к инсулину [30]. В общем виде повышенный уровень ANP в плазме ассоциирован со снижением риска развития кардиометаболического синдрома. ANP является не только регулятором водно-солевого баланса, но и интегрирован в гипоталамо-гипофизарную–надпочечниковую ось (ГГНО) и иммунную систему [31]. Несмотря на то что доклиническими исследованиями продемонстрирована вовлеченность ANP в механизмы развития психических расстройств, в настоящее время исследования в данной области практически не ведутся, хотя и отмечается их целесообразность. Алкогольная интоксикация приводит к нарушениям электролитного баланса, что сопровождается изменением регуляторов гомеостаза электролитов в плазме крови в период синдрома отмены. В острой фазе отмены повышается активность ренина и уровень альдостерона в плазме, а по мере ослабления абстинентной симптоматики показатели возвращаются в норму [32]. Показано, что у пациентов с развивающимся алкогольным психозом уровень ANP повышается накануне манифестации психоза. На мышах, потреблявших алкоголь содержащее жидкое питание, введение в желудочки мозга ANP или блокирующих антител ослабляло или потенцировало судорожную активность (явление отмены алкоголя) [32]. На пациентах с алкогольной зависимостью показано, что через две недели воздержания в стационарных условиях уровень ANP в плазме крови отрицательно коррелирует с влечением к алкоголю, выраженностю субъективного уровня стресса и выраженностью тревоги, при этом уровень ANP оказался надежным предиктором тревоги и стресса [33]. Таким образом, ANP может быть не только периферическим маркером клинических проявлений алкогольной зависимости, но и проявляет центральную активность в отношении синдрома отмены алкоголя.

**Система ренин–ангиотензин** участвует в функционировании ССС за счет регуляции тонуса сосудов и водно-солевого баланса. Вместе с тем ангиотензин вовлечен в механизмы развития зависимости от ПАВ. С помощью фармакологического подхода и функциональной МРТ продемонстрировано, что в мозге ангиотензин за счет активации рецептора 1-типа определяет функциональную активность отделов головного мозга человека [34]. Кроме того, физиологическая активность сигнальных каскадов, которые запускаются при активации рецептора к ангиотензину II 1-типа, интегрирована в ГГНО и участвует в формировании реакции на стресс, что также может определять его вовлеченность в механизмы зависимости [35]. Известно, что система

ангиотензина способна модифицировать мотивацию к потреблению алкоголя в экспериментах на грызунах [36]. В ранних экспериментах на грызунах показано, что ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) каптоприл и эналаприл, тормозящие образование активного ангиотензина II и применяемые в терапии гипертензии, способны подавлять потребление алкоголя в условиях выбора, при этом не оказывая влияния на гемодинамические параметры [37]. Интересно, что АПФ, участвующий в протеолитическом созревании ангиотензина, в прилежащем ядре опосредует деградацию эндогенных пептидных опиоидов, что лежит в основе взаимодействия опиоидной, глутаматной и дофаминергической нейромедиаторных систем [38]. При этом системное введение каптоприла снижает активность дофаминергических нейронов стриатума и ослабляет подкрепляющие свойства фентанила [38]. Отмечается перспективность репозиционирования подобных фармакологических средств в фармакотерапии зависимостей. В экспериментах на грызунах детально исследовано участие ангиотензина II в ЦНС в потреблении алкоголя [39]. На трансгенных крысах с пониженной экспрессией ангиотензина II, у которых также специфично снижено содержание дофамина вентральной области покрышки, снижено и потребление алкоголя в условиях свободного выбора по сравнению с диким типом [39]. На нокаутных мышах показано, что потребление алкоголя зависит от рецепторов ангиотензина типа 1, но не типа 2 [39]. Однократное введение антагониста рецепторов к ангиотензину II телмисартана в желудочки мозга снижает потребление алкоголя, не оказывая влияния на потребление пищи и воды крысами, предпочитающими алкоголь [40]. Введение антагониста рецепторов к ангиотензину II валсартана на протяжении интоксикации морфином предотвращает развитие толерантности к антиноцицептивному эффекту морфина и смягчает тяжесть синдрома отмены [41]. Антагонист ангиотензиновых рецепторов типа 1 кандесартан ослабляет подкрепляющие свойства метамфетамина на модели самовведения у крыс [42]. При этом, несмотря на то что как ингибиторы АПФ, так и блокаторы ангиотензиновых рецепторов широко применяются в терапии гипертензии, данных о клинических исследованиях их эффективности в отношении расстройств, связанных с потреблением ПАВ, в анализируемой литературе не обнаружено.

**Альдостерон** – стероидный гормон, производимый надпочечниками в ответ на стимуляцию ангиотензином, внеклеточным калием и адренокортикотропным гормоном (АКТГ). Связываясь с минералкортикоидными рецепторами,

входящими в семейство ядерных рецепторов с функцией транскрипционного фактора, в дистальных нефронах альдостерон повышает реабсорбцию натрия и воды сочетанно, стимулируя экскрецию калия, таким образом, модулируя водно-солевой баланс и кровяное давление [43]. Минералкортикоидные рецепторы экспрессируются также в мозге, в частности в гиппокампе, амигдале и префронтальной коре – отделах мозга, вовлеченных в реализацию когнитивных функций и формирование зависимостей [44]. Исследования на животных показывают, что содержание альдостерона и экспрессия соответствующих рецепторов изменяются в отделах головного мозга при воздействии ПАВ, в то время как функциональные исследования свидетельствуют о том, что блокада минералкортикоидных рецепторов в целом ослабляет подкрепляющие свойства ПАВ или проявления абстиненции [45]. При этом отмечается, что, прежде всего, при алкогольной зависимости назначение антагонистов имеет перспективы клинического применения. На приматах показано, что экспрессия минералкортикоидного рецептора в амигдале на уровне мРНК отрицательно коррелирует с потреблением алкоголя, а уровень альдостерона в плазме повышается после потребления алкоголя [44]. Аналогично у крыс снижение экспрессии минералкортикоидного рецептора в амигдале на уровне мРНК ассоциировано с повышением тревожноподобного поведения в период острой абстиненции и компульсивным потреблением алкоголя [44]. У пациентов, зависимых от алкоголя, уровень альдостерона в плазме позитивно коррелирует с количеством потребляемого алкоголя, а также выраженной степенью влечения и тревоги [44]. Антагонист минералкортикоидных рецепторов спиронолактон снижает потребление раствора алкоголя мышами, а ретроспективный анализ записей фармакоэпидемиологического исследования показал, что назначение спиронолактона лицам, злоупотребляющим алкоголем, также сопровождается снижением уровня потребляемого алкоголя [46]. Стероидные антагонисты минералкортикоидных рецепторов, например, спиронолактон, одобрены для лечения гипертензии и сердечной недостаточности, при этом контролируемые клинические исследования их эффективности в отношении расстройств, связанных с употреблением ПАВ, в литературе не представлены.

**Вазопрессин** – антидиуретический гормон, который также вовлечен в регуляцию сосудистого тонуса и водно-солевого баланса, что определяет его влияние на кровяное давление [47]. Пептид вазопрессин экспрессируется в гипоталамусе и выполняет функции гормона и нейротрасмиттера в мозге. Выделяют несколько подтипов ре-

цепторов к вазопрессину, которые принадлежат к классу рецепторов, связанных с G-белками [47]. Рецепторы подтипа V1a, представленные в сосудах, надпочечниках и почках, стимулируют вазоконстрикцию, секрецию альдостерона и глюкокортикоидов, а также продукцию ренина. Центральные V1a-рецепторы вносят вклад в регуляцию симпатической нервной системы. Рецепторы к вазопрессину подтипа V1b, экспрессируемые в гипоталамусе, гипофизе и лимбических структурах, играют ключевую роль в стресс-реактивности. Посредством активации V1b-рецепторов вазопрессин потенцирует действие кортизолибера, стимулируя секрецию АКТГ из гипофиза и активацию ГГНО. Антагонисты V1b-рецепторов перспективны в отношении подавления активности ГГНО в условиях формирования зависимостей, прежде всего от алкоголя. Так, SSR149415, селективный антагонист V1b-рецептора, подавляет потребление алкоголя в экспериментах на крысах [48, 49]. У мышей SSR149415 способен также подавлять выработку условной реакции предпочтения места, ассоциированной с введением морфина [50]. Антагонист V1b-рецепторов ABT-436 подавляет активность ГГНО у людей, снижая уровень кортизола в сыворотке крови [51]. Во второй фазе клинического исследования ABT-436 повышал продолжительность воздержания от алкоголя, при этом не влияя на влечение, а наибольший эффект наблюдался в подгруппе с более высоким исходным уровнем стресса [52]. Примечательно, что антагонист V1b-рецепторов к вазопрессину ABT-436 входит в список наиболее перспективных для разработки и внедрения препаратов при лечении расстройств, связанных с потреблением алкоголя [53].

**Окситоцин.** Упоминая вазопрессин, нельзя оставить без внимания сопряженный с ним нейропептидный гормон окситоцин. Включение окситоцина и вазопрессина в раздел ССС может показаться спорным, но, учитывая невероятную плеiotропность обоих гормонов, их можно отнести к регуляторам любой из систем организма. Анатомически источником продукции окситоцина, так же как и вазопрессина, является гипоталамус, и, наряду с регуляцией различных аспектов работы мозга и поведения, окситоцин является реулятором функций многих систем организма [54, 55], включая и ССС [56]. Метаботропные рецепторы к окситоцину экспрессируются в лимбических структурах и регулируют подкрепляющий эффект различных стимулов, включая ПАВ, чувствительность к стрессу и социализацию [57]. Нейробиологической основой этой активности является способность напрямую или опосредованно регулировать дофамин- и серотонинергические нейромедиаторные системы и ГГНО [58].

Согласно данным доклинических исследований, стимуляция окситоциновых рецепторов в целом оказывает протективный эффект в контексте химических зависимостей: снижает выраженность тревожно- и депрессивно-подобного поведения, ослабляет подкрепляющие свойства ПАВ, снижает вероятность рецидивирования в период абstinенции [57, 58]. Инъекционная форма окситоцина применяется в акушерской практике для стимуляции родов, и в настоящее время окситоцин, прежде всего в виде интраназального спрея, активно исследуется в клинике в комплексе терапии психических расстройств, включая расстройства, связанные с употреблением ПАВ. Окситоцин способен ослаблять проявления синдрома отмены ПАВ, включая его аффективную составляющую, может подавлять влечение к ПАВ и их потребление [59].

### МЕДИАТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА И ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ

Показано, что ПАВ вносят изменения в фундаментальные процессы энергетического метаболизма. Хроническая интоксикация морфином сопровождается снижением экспрессии субъединиц пируват- и NADH-дегидрогеназных комплексов и лактатдегидрогеназы 2, а также снижением уровня ATP и нарушением гликолиза в гиппокампе мышей; при этом системное и внутритигиппокампальное введение D-глюкозы ослабляет проявления отмены морфина [60]. Jiang и Ma [61] на основе данных результатов с определенной долей скептицизма предположили, что гипогликемия может являться одной из причин проявлений физической зависимости от опиатов. Интересно, что действие морфина на энергетический метаболизм может быть прямым: было показано, что морфин связывается с креатинкиназой В и ингибитирует ее активность как *in vitro*, так и *in vivo* [62].

**Инсулин** синтезируется  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, его ключевая функция заключается в регуляции энергетического метаболизма, в первую очередь углеводного обмена за счет стимуляции транспорта глюкозы внутрь клетки. Помимо регуляции энергетического метаболизма, практически во всех органах и тканях, инсулин, преодолевший гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), участвует в регуляции когнитивных функций и пищевого поведения [63]. Центральная инсулинерезистентность (как правило, сопровождающая периферическую инсулинерезистентность) нарушает синаптогенез, нейрогенез и многие аспекты нейропластичности, а снижение чувствительности инсулиновых рецепторов к инсулину сопровождается морфофункциональными нару-

шениями в ЦНС, формированием аффективного (депрессивного) фенотипа и нарушением когнитивных способностей [63].

Препараты, используемые для лечения диабета, в первую очередь проникающий через ГЭБ метформин, имеют терапевтический потенциал при лечении психических расстройств, включая связанные с употреблением ПАВ. Метформин нормализует уровень глюкозы в крови за счет способности ингибировать печеночный глюконеогенез, снижения абсорбции глюкозы через ЖКТ, стимуляции захвата глюкозы периферическими тканями и улучшения чувствительности к инсулину [64]. Метформин является бигуанидином, и основной механизм его действия основан на способности ингибировать митохондриальный комплекс I, снижать продукцию активных форм кислорода и проявлять противовоспалительные свойства. Метформин снижает выраженную нейропатологию, стимулирует нейропластичность и возбудимость нейронов. В основе нейротропных эффектов лежит способность активировать AMP-зависимую протеинкиназу AMPK (AMP activated protein kinase) и транскрипционный фактор CREB (cAMP responsive element binding protein), что, в частности, приводит к повышению экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) с последующей стимуляцией нейрогенеза и проявлением антидепрессивного эффекта [64].

Конкурентное введение метформина совместно с морфином препятствует формированию толерантности к антиноцицептивному эффекту и зависимости от морфина в модели на крысях [65]. Введение метформина предотвращает развитие тревожноподобного и депрессивноподобного поведения, нарушения памяти и обучения при хронической интоксикации метамфетамином крыс (что сопровождается активацией CREB и повышением уровня BDNF в гиппокампе) [66]. Введение метформина в прилежащее ядро ослабляет реакцию обусловленного самовведения кокаина [67]. Тем не менее до настоящего момента контролируемых клинических исследований эффекта метформина или других препаратов, нормализующих уровень глюкозы, в отношении зависимостей от ПАВ не проводилось.

**Холецистокинин** – пептидный гормон, вырабатываемый слизистой тонкого кишечника в ответ на стимуляцию белками и липидами пищи. Связываясь с рецепторами, ассоциированными с G-белками, он регулирует аппетит и насыщение, стимулирует сокращения желчного пузыря, а также секреторную активность желудка и поджелудочной железы, тем самым участвуя в пищеварении [68]. Кроме того, холецистокинин синтезируется в ЦНС, где он колокализован

и функционально взаимодействует с нейромедиаторными системами, такими как дофамин, ГАМК, серотонин и опиоидные пептиды в лимбических структурах, модулируя систему положительного подкрепления и эмоциональное состояние [69].

На животных моделях было показано, что введение агонистов или антагонистов холецистокининовых рецепторов способно модифицировать потребление ПАВ различных классов, однако результаты данных исследований остаются весьма противоречивыми [69]. Важно отметить, что российскими исследователями были синтезированы и охарактеризованы оригинальные тетра- [70] и дипептидные [71] аналоги холецистокинина, которые ослабляли потребление алкоголя, а также проявления синдрома отмены алкоголя и морфина. Тем не менее до настоящего момента лишь единичные работы свидетельствуют о перспективах клинического использования лигандов рецепторов к холецистокинину. Антагонист холецистокининовых рецепторов ССК-В (ССК2) RPR 102681 повышает высвобождение дофамина вентральном стриатуме и снижает самовведение кокаина у грызунов. В клиническом исследовании введение RPR 102681 сопровождалось тенденцией к снижению тяги к кокаину [72].

**Грелин** – гормон пептидной природы, производимый преимущественно энтероэндокринными клетками желудка. Ацилированный грелин взаимодействует с соответствующим рецептором, связанным с G-белками (GHSR1a, growth hormone secretagogue receptor 1a), который экспрессируется как в ЦНС, так и периферическими органами и тканями, такими как кишечник, поджелудочная железа, надпочечники, жировая ткань [73, 74]. Основная функция грелина – регуляция пищевого поведения, кроме того, он играет важную роль в энергетическом гомеостазе, регулируя потребление и расход питательных веществ, вовлечен в базовый метаболизм глюкозы и липидов [75]. Грелин – стресс-реактивная молекула, тесно взаимодействует с ГГНО при формировании реакции на стрессорное воздействие [76].

Грелин активно исследуется в отношении болезней зависимости в качестве перспективной фармакологической мишени. Например, системное введение антагонистов рецепторов к грелину JMV2959, HM-04 или обратных агонистов PF-5190457 и PF-6870961 ослабляло потребление алкоголя независимо от пола [77]. Аналогично системное введение антагониста JMV2959 ослабляло выработку условной реакции предпочтения места и самовведение фентанила, что сопровождалось снижением внеклеточного дофамина в прилежащем ядре [78]. В целом, согласно данным доклинических исследований, грелин стимулирует влечение и потребление ПАВ, по-видимому, за счет

его способности оказывать влияние на активность дофаминергической системы путем формирования гетеродимеров рецепторов грелина с дофаминовыми рецепторами D1 и D2 [79, 80]. Согласно данным ряда клинических исследований, грелин может модифицировать влечение к алкоголю. Внутривенное введение грелина пациентам, злоупотребляющим алкоголем, стимулирует влечение к алкоголю [81], а пероральное введение обратного агониста PF-5190457, напротив, ослабляет обусловленное стимулом влечение к алкоголю [82]. Клинический эффект манипуляции активностью грелина может достигаться за счет его способности влиять на цитокиновый профиль. Показано, что совместное внутривенное введение грелина, но не обратного агониста PF-5190457, в период внутривенного самовведения алкоголя снижает уровень IL-6, но повышает IL-10 у лиц, злоупотребляющих алкоголем и имеющих алкогольную зависимость [83]. Активность обратного агониста PF-05190457 исследовали в отношении влечения к алкоголю в клиническом исследовании фазы 2 (<https://clinicaltrials.gov/study/NCT02707055>); к сожалению, в связи с пандемией COVID-19 исследование было прекращено. Важно, что грелин при хронической интоксикации играет определяющую роль в развитии алкогольной болезни печени за счет снижения секреции инсулина, прямого влияния на транспорт, синтез *de novo* и эстерификацию жирных кислот, что вызывает стеатоз печени [84]. Таким образом, разработка и внедрение антагонистов грелина при лечении алкогольной зависимости важно для коррекции собственно синдрома зависимости и сопутствующей патологии печени. Лиганды, подавляющие активность рецепторов к грелину, входят в список наиболее перспективных препаратов в лечении расстройств, связанных с потреблением алкоголя [53] и опиоидов [85].

**Глюкагоноподобный пептид-1** (GLP-1, glucagon-like peptide-1), инкретиновый гормон, экспрессируется в кишечнике и поджелудочной железе, секретируется в ответ на потребление пищи и регулирует насыщение. Физиологическая активность GLP-1 реализуется за счет активации периферических рецепторов GLP-1, связанных G-белками, проявляется в замедлении перистальтики кишечника, стимуляции секреции инсулина и торможения секреции глюкагона, а это, в свою очередь, нормализует уровень глюкозы [86, 87]. GLP-1 может проникать через ГЭБ, а также экспрессируется в стволе головного мозга, рецепторы GLP-1 экспрессируются в отделах мозга, связанных с формированием подкрепления [86, 87].

Эксперименты на животных показывают, что стимуляция центральных рецепторов GLP-1 подавляет подкрепляющие свойства алкоголя,

опиоидов и психостимуляторов, мотивацию к их потреблению, а также проявления зависимости [86, 87]. Среди механизмов действия агонистов рецепторов GLP-1, лежащих в основе их модифицирующего влияния в отношении ПАВ, следует отметить взаимосвязь GLP-1 со стресс-реактивной системой и способностью нейронов гипоталамуса экспрессировать кортиколиберин [88], а также модулировать активность дофаминергических и глутаматергических нейронов в лимбических структурах [86]. Агонист рецепторов к GLP-1 эксенатид, используемый в терапии диабета, снижал потребление алкоголя в подгруппе лиц с коморбидным ожирением [89]. В экспериментах на животных эксенатид снижал алкоголь-зависимую активацию центрального стриатума и доступность транспортера к дофамину [89]. Пациенты с клинически выраженным ожирением, потребляющие алкоголь и получавшие агонисты рецепторов GLP-1 семаглутид или тирзепатид для терапии диабета или ожирения на протяжении по меньшей мере 30 дней, отмечали, что сократили потребление алкоголя; это сопровождалось снижением выраженности симптомокомплекса зависимости от алкоголя по шкале AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) по сравнению как с контрольной группой, не получавшей эти препараты, так и со значениями до лечения [90]. Кроме того, пациенты, использовавшие данные препараты для лечения диабета или ожирения, отмечали субъективное снижение влечения к алкоголю, что можно считать косвенным свидетельством эффективности подобных препаратов в отношении потребления алкоголя [90]. Ретроспективный анализ пациентов, получавшие семаглутид для снижения веса, также демонстрировали снижение выраженности симптомокомплекса зависимости от алкоголя по шкале AUDIT [91]. Таким образом, в независимых исследованиях продемонстрирована эффективность активации рецепторов к GLP-1 посредством агонистов, прежде всего семаглутида, в экспериментах на грызунах и приматах, и использование подобных препаратов в клинике является крайне перспективным направлением [92].

**Лептин** является пептидным гормоном, который секретируется жировой тканью и регулирует потребление пищи за счет влияния на аппетит; кроме того, он вовлечен в регуляцию поведения, связанного с подкреплением, ассоциированным с различными стимулами [93]. Лептин проявляет свою физиологическую активность посредством рецептора, принадлежащего к классу I цитокиновых рецепторов, который экспрессируется в гипоталамусе, гиппокампе и амигдале. В центральной области покрышки лептин ослабляет возбудимость дофаминергических

нейронов, которые имеют проекции в прилежащее ядро [93].

Результаты относительно влияния алкоголя на уровень лептина в крови у экспериментальных животных противоречивы. На линейных мышах с мутациями в генах, кодирующих лептин или его рецептор, при введении лептина показано, что он стимулирует потребление алкоголя [93]. На крысях, напротив, было показано, что введение лептина ослабляет мотивацию к потреблению кокаина [94]. Введение антагониста лептиновых рецепторов в желудочки или локальный нокаут рецепторов в мезолимбических структурах повышали уровень дофамина и стимулировали выработку условной реакции предпочтения места, ассоциированной с кокаином [95]. Результаты относительно периферического уровня лептина при алкогольной зависимости у людей достаточно разнородные, и это касается также связи уровня лептина с клиническими проявлениями зависимости от алкоголя, прежде всего влечения к алкоголю [93].

**Нейротензин** – пептид, вырабатываемый ЦНС и ЖКТ. Нейротензин сложно отнести к какой-либо из систем, поскольку он проявляет биологическую активность в нервной ткани, ССС, жировой ткани и ЖКТ, помимо прочего, регулируя потребление пищи и воды, температуру тела, кровяное давление, метаболизм и энергетический баланс, цикл сон–бодрствование [96]. Кроме того, нейротензин играет важную роль в механизмах подкрепления и формирования приспособительной реакции в ответ на стресс. Положительные подкрепляющие свойства нейротензина реализуются за счет активации высокоаффинного рецептора NTSR1 (neurotensin receptor 1), связанного с G-белками в структурах мезокортиколимбической системы [96].

В основе влияния нейротензина на процессы подкрепления и, соответственно, механизмы предпочтения психостимуляторов и алкоголя, а также мотивацию к их потреблению лежит его способность взаимодействовать с дофаминергической системой посредством формирования гетерокомплексов NTSR1 с дофаминовым рецептором D2-подтипа [97, 98]. Таким образом, взаимодействие нейротензина с дофаминергической системой опосредованно модулирует активность глутаматергической- и ГАМКергической систем. Российскими исследователями был синтезирован и охарактеризован дипептидный аналог нейротензина, который способен ослаблять проявления синдрома отмены морфина у грызунов, что сопровождается изменением метabolизма дофамина [99]. Отмечается, что результаты исследований на грызунах зачастую противоречивы [97, 98]. Видимо, в связи с этим, несмотря на данные

об эффективности лигандов нейротензиновых рецепторов, прежде всего NTSR1, в отношении потребления ПАВ в доклинических исследованиях, до настоящего времени клинических исследований проведено не было.

**Семейство ростовых факторов фибробластов** (FGF, fibroblast growth factor) включает 23 секретируемых лиганда белковой природы, которые у человека продуцируются кератиноцитами, фибробластами, хондроцитами, эндотелиальными, гладкомышечными и тучными клетками, проявляют широкий спектр биологической активности, а нарушение их функционирования ассоциировано с метаболическими нарушениями, сердечно-сосудистыми заболеваниями и онкогенезом. К настоящему моменту известно, что по меньшей мере два представителя данного семейства, FGF2 [100] и FGF21 [101], вовлечены в механизмы действия ПАВ. FGF2 функционирует паракринно, связываясь с рецепторами FGFR, обладающими тирозинкиназной активностью, участвует в миграции и пролиферации клеток, регулирует сосудистый тонус и ангиогенез, проявляет антиапоптотическую и противовоспалительную активности [100]. FGF2 экспрессируется также в головном мозге и посредством активации FGFR1 реализует нейропротекторные свойства, участвует в нейрогенезе, формировании памяти, регуляции стресс-реактивности и эмоционального фона [102]. FGF21, напротив, является эндокринным регулятором и для проявления его активности, помимо FGFR, необходим трансмембранный белок клото (Klotho, регулирует чувствительность организма к инсулину), который повышает аффинность лиганда к рецептору [100]. FGF21 экспрессируется в печени, жировой ткани и поджелудочной железе и участвует в метabolизме жиров и глюкозы.

В моделях на грызунах показано, что FGF2 определяет чувствительность к амфетамину и самовведению кокаина, а психостимуляторы изменяют его экспрессию в дофаминергических нейронах. В этих экспериментальных условиях FGF2 участвует в морфологических изменениях в нейронах вентральной области покрышки [100]. В экспериментах на грызунах показано, что системное введение FGF2 или его введение в стриатум стимулирует потребление алкоголя, тогда как нокаут гена *Fgf2* или ингибирование рецептора FGFR1 снижают подкрепляющие свойства алкоголя и мотивацию к потреблению [103–105]. При системном и центральном введении FGF21 или его аналога PF-05231023, а также тканеспецифической делеции FGF21 в печени показано, что экспрессируемый в печени FGF21 в ответ на алкогольную интоксикацию является элементом отрицательной обратной связи, подавляющей последующее потребление алкоголя посредством

корецептора клото в базолатеральной амигдале и последующей регуляции активности дофаминергических нейронов в прилежащем ядре [106]. Согласно клиническим данным, потребление алкоголя сопровождается повышением циркулирующего FGF21 [107, 108]. Трансгенные мыши с повышенным уровнем циркулирующего FGF21 демонстрируют устойчивость к развитию толерантности к анальгетическому эффекту, развитию зависимости и положительного подкрепляющего эффекта, ассоцииированного с введением морфина [109]. Таким образом, блокада трансдукции сигнала FGF2 ослабляет аддиктивные свойства алкоголя и психостимуляторов, а стимуляция FGF21 подавляет формирование зависимости от алкоголя и опиатов. Тем не менее до настоящего времени не было проведено исследований, клинически подтверждающих активность FGF2 или FGF21 в отношении потребления алкоголя или других ПАВ. Стоит отметить, что FDA одобрило ингибиторы рецепторов FGFR эрдафитиниб и пемигатиниб для терапии злокачественных новообразований с наличием активирующих мутаций в FGFR2 и FGFR3, поэтому может быть поставлен вопрос о потенциальном репозиционировании этих препаратов в фармакотерапии зависимостей.

## КОМПОНЕНТЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Важным аспектом действия ПАВ и формирования зависимости является эффект, который они оказывают на иммунную систему и нейроиммунную коммуникацию. В общем случае резидентные макрофаги ЦНС реагируют на провоспалительные стимулы; рецепторы TLR (Toll-like receptors) запускают каскады, приводящие к активации транскрипционных факторов, прежде всего NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), и последующей экспрессии провоспалительных цитокинов микроглией [110]. В свою очередь, астроциты в ответ на цитокины снижают экспрессию транспортера глутамата, что ассоциировано с нарушением функционирования глутаматергической системы [110]. Таким образом, микроглия и астроциты могут контролировать возбудимость глутаматергических нейронов. В случае нарушения баланса про- и противовоспалительных систем развивается нейровоспаление, которое часто сопутствует злоупотреблению ПАВ. Иммунные механизмы играют важную роль в развитии коморбидных заболеваний при хроническом злоупотреблении ПАВ, таких как аффективные психические расстройства, болевой синдром и инфекционный процесс [111].

Исследования на животных с нокаутом ключевых медиаторов иммунного ответа, таких как рецепторы TLR, цитокины TNF (tumor necrosis

factor), IL-1 и IL-6, показывают, что данные молекулы способны модифицировать аддиктивную активность ПАВ или проявления синдрома отмены [111]. Доклинические исследования демонстрируют, что модуляторы нейроиммунной системы, такие как ингибиторы фосфодиэстераз и лиганды рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor) могут модифицировать течение и проявления зависимости [110, 111]. Важно, что данные агенты демонстрируют активность и в клинических исследованиях [110, 111].

#### **Циклические нуклеотиды cAMP и cGMP.**

В качестве вторичных посредников циклические нуклеотиды cAMP и cGMP играют важную роль в передаче сигнала в иммунной системе, при этом специфические в отношении определенных изоформ ингибиторы фосфодиэстераз (ферментов, расщепляющие фосфодиэфирную связь циклических нуклеотидов) проявляют иммуномодулирующую активность, подавляя воспалительный ответ [112]. Неизбирательный ингибитор фосфодиэстераз ибудиласт, одобренный в некоторых странах для лечения астмы, известен как иммуносупрессор, подавляющий активацию микроглии [113]. Ибудиласт эффективно снижает потребление алкоголя во многих моделях на грызунах [114]. В клиническом исследовании ибудиласт ослаблял влечение к алкоголю и нормализовал настроение [115], а также сокращал объемы потребляемого алкоголя, что, согласно данным МРТ, сопровождалось снижением активности вентрального стриатума [116]. Системное введение ибудиласта способно потенцировать анальгетический эффект морфина или оксикодона, а также ослабляет проявления синдрома отмены у крыс [117]. В клинических исследованиях на пациентах с опийной зависимостью ибудиласт ослаблял подкрепляющие свойства оксикодона и влечение к героину, но потенцировал антиноцицептивный эффект оксикодона [118], а также частично ослаблял проявления опийного синдрома отмены [119]. При этом ибудиласт не влиял на количество потребляемого метамфетамина в 12-недельном клиническом исследовании с участием пациентов, проходивших амбулаторное лечение от зависимости [120]. Многообещающие результаты продемонстрированы в отношении антиалкогольных свойств ингибитора фосфодиэстеразы-4 апремиласта, который одобрен для лечения псориаза. Апремиласт снижает мотивацию к потреблению алкоголя в модели на мышах, по-видимому, за счет его способности модифицировать дофаминергические нейроны в прилежащем ядре, а также снижает потребление алкоголя зависимыми пациентами в клиническом исследовании фазы 2 [121].

**PPAR** – семейство транскрипционных факторов, проявляющих широкий спектр биологической активности за счет экспрессии мишенией, регулирующих метаболизм, воспалительный ответ и иммунную реакцию [122, 123]. Изоформа PPAR $\alpha$  стимулирует эндоцитоз жирных кислот, ихエステрификацию и транспорт, регулирует гены метаболизма липопротеинов. PPAR $\delta$  стимулирует катаболизм липидов и глюкозы. PPAR $\gamma$  способствует захвату жирных кислот, образованию триглицеридов, тем самым обеспечивая чувствительность к инсулину и метаболизм глюкозы. Агонисты PPAR широко применяются в клинике: агонисты PPAR $\gamma$  глитазоны – при инсулиновой резистентности, а фибраты, активирующие PPAR $\alpha$ , – при дислипидемиях [122, 123]. Ввиду вовлеченности PPAR в фундаментальные процессы метаболизма, такие как окислительное фосфорилирование, семейство рецепторов является частью практических всех тканей и органов.

Окислительный стресс и воспаление – ключевые процессы, которые регулируются PPAR, также вовлеченными в развития патологии ЦНС. Многие агонисты PPAR, одобренные для применения в клинике, проникают через ГЭБ и проявляют центральную активность, что открывает перспективы их репозиционирования при заболеваниях мозга [124]. Изоформы PPAR экспрессируются в дофаминергических нейронах лимбических структур, вовлеченных в формирование зависимости, а агонисты способны модифицировать активность этих нейронов, что делает актуальным их исследование при зависимостях [125]. На экспериментальных моделях показано, что агонисты изоформ PPAR $\alpha$  и PPAR $\gamma$  способны ослаблять мотивацию и потребление ПАВ, а также снижать проявления отмены [125]. Следует отметить, что подавляющее большинство работ проведено на моделях потребления алкоголя, в которых агонисты обеих изоформ подавляют потребление в условиях выбора и оперантное потребление [125]. Несмотря на потенциал, агонисты PPAR $\alpha$  вряд ли могут быть эффективными в клинике алкогольной зависимости, поскольку в клиническом исследовании фенофибрат не оказывал влияния ни на потребление, ни на влечение к алкоголю [126]. При этом на небольшой выборке злоупотребляющих алкоголем пациентов с диабетом показано, что пиоглитазон может способствовать снижению потребляемого алкоголя [127]. В другом, к настоящему времени остановленном, клиническом исследовании, напротив, показано, что пиоглитазон скорее стимулирует, чем подавляет влечение к алкоголю [128]. Таким образом, клинические исследования не позволяют сделать однозначные заключения относительно эффективности агонистов PPAR.

**Микрофлора кишечника** (микробиота) вносит ощутимый вклад в развитие воспалительной реакции в органах и тканях, включая ЦНС. Когда идет речь о коммуникации между ЖКТ и мозгом в контексте формирования зависимости от ПАВ, необходимо иметь в виду, что хроническое потребление ПАВ оказывает влияние на микробиом, который, в свою очередь, оказывает влияние на мозг [129]. Будучи ксенобиотиками, многие классы лекарственных средств, включая ПАВ, оказывают прямое действие на бактерии [130, 131]. Косвенно ПАВ, например опиаты и опиоиды, оказывают влияние на периферическую нервную систему, тем самым регулируя перистальтику кишечника, что также может оказывать влияние на состав микрофлоры [132]. Наиболее исследованный механизм воздействия микрофлоры на ЦНС – это продукция нейроактивных метаболитов, в первую очередь короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), которые попадают в циркуляторное русло, а затем – в головной мозг [133]. Кроме того, при нарушении проницаемости кишечника в кровоток могут попадать липополисахариды, которые также являются провоспалительным стимулом [134]. КЦЖК оказывают влияние на активность микроглии и иммунных клеток посредством активации соответствующих рецепторов, кроме того, они могут напрямую быть субстратами для модификации гистонов, а также выступать в роли регуляторов активности ферментов, например деацетилаз гистонов [135].

В экспериментах на животных и в клинических исследованиях начальных фаз или ретроспективном анализе показано, что ПАВ изменяют состав микрофлоры, что может иметь значение в формировании зависимости, при этом манипуляция составом микрофлоры с помощью антибиотиков или трансплантации микробиоты могут модифицировать течение или проявления зависимостей [129, 135]. Несмотря на то что характер взаимодействия микрофлоры с мозгом при воздействии ПАВ зависит от многих факторов, что проявляется в многообразии и зачастую противоречивости результатов, воздействие на микробиоту или на продуцируемые микрофлорой метаболиты в будущем имеет объективные перспективы стать частью терапевтической программы при лечении зависимостей [129, 135].

### ЦИРКАДИАННЫЕ РИТМЫ

Регуляция циркадианых ритмов и сна обеспечивается центральными механизмами, однако их нарушения сказываются на somатическом здоровье, проявляясь в широком спектре внутренних болезней [136]. В связи с этим посчитали необходимым уделить некоторое внимание этому

аспекту в настоящем обзоре, тем более что нарушения качества и длительности сна часто сопровождают злоупотребление ПАВ. Расстройства сна повышают вероятность рецидива, утяжеляют течение собственно зависимости, а также ухудшают общее физическое здоровье [137, 138].

**Мелатонин** (N-ацетил-5-метокситриптамин) секретируется в гипофизе и, связываясь с ассоциированными с G-белками рецепторами MT1 и MT2 в супрахиазматическом ядре, регулирует циркадианные ритмы. На моделях с использованием грызунов продемонстрировано, что введение мелатонина снижает потребление алкоголя, опиатов или кокаина [139]. Мелатонин вовлечен в механизмы формирования зависимости на клеточном и системном уровнях за счет модуляции нейромедиаторных систем глутамата, дофамина и ГАМК; кроме того, мелатонин проявляет выраженные противовоспалительные свойства [139]. В отличие от экспериментальных, клинических работ значительно меньше, а эффект критически зависит от фармакологического класса ПАВ. Так, у зависимых от героина лиц, находящихся на заместительной терапии, мелатонин значительно улучшал качество сна, а также снижал уровень тревожности и депрессивности, что сопровождалось снижением уровня инсулина в сыворотке, а также снижением резистентности к инсулину [140]. При этом в клиническом исследовании не удалось показать эффективность мелатонина в отношении нарушений сна, связанных с зависимостью от алкоголя [141].

**Оrexсины** регулируют цикл сон–бодрствование, а также пищевое поведение – процессы, зачастую нарушенные в условиях зависимости от ПАВ. Орексины А и В являются лигандами пептидной природы, которые продуцируются нейронами латерального гипоталамуса и функционируют посредством рецепторов, связанных G-белками Ox1R и Ox2R, которые экспрессируются в различных отделах мозга. В отличие от классических нейромедиаторных систем, вовлеченных в процессы подкрепления, орексины не участвуют напрямую в регуляции первичного подкрепления. Орексины регулируют мотивацию к потреблению ПАВ, ключевой симптом аддикции, посредством влияния на функциональную пластичность нейронов в лимбических структурах в условиях хронической интоксикации [142]. На животных моделях показано, что селективные в отношении подтипов рецепторов Ox1R и Ox2R, а также неизбирательные антагонисты способны снижать подкрепляющие свойства стимуляторов (алкоголя и опиатов), тем самым снижая потребление и вероятность рецидива [143]. Так, у крыс антагонист Ox1R SB-408124 блокирует экспрессию условной реакции предпочтения места, связанной

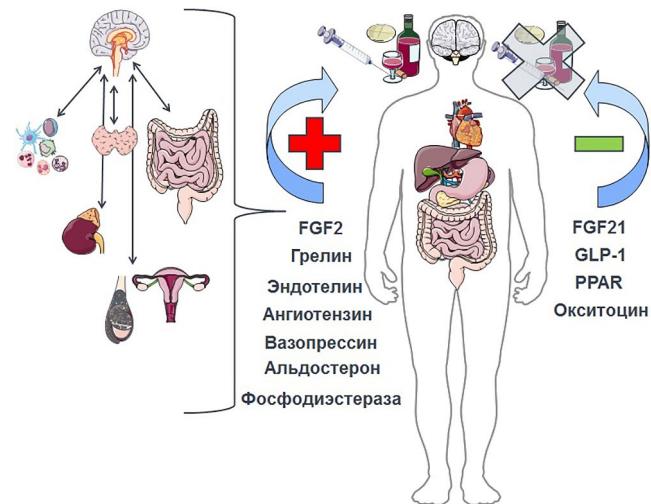
с алкоголем [144]. Неселективные антагонисты OX1R и OX2R, например суворексант, одобрены для клинического использования при инсомнии. Кроме того, данные препараты имеют терапевтический потенциал в отношении влечения к потреблению при коморбидных нарушениях сна и зависимости от алкоголя [145]. Суворексант также показал эффективность в клиническом исследовании при купировании нарушений сна, депрессивной симптоматики и проявлений синдрома отмены опиатов [146, 147]. Таким образом, рецепторы к орексину являются многообещающими фармакологическими мишениями при разработке средств терапевтической коррекции нарушения сна и коморбидных болезней зависимости. Важно, что антагонисты или негативные аллостерические модуляторы рецепторов к орексину отмечаются как одни из наиболее перспективных препаратов в лечении расстройств, связанных с потреблением алкоголя [53] и опиоидов [85].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*Comprendi che tutto è connesso.  
(Поймите, что все взаимосвязано.)*  
Leonardo da Vinci (1452–1519)

Функционирование организма в условиях изменяющейся внешней среды возможно при поддержании метаболического гомеостаза, который достигается благодаря коопération между ЦНС и внутренними органами. Мириады гормонов, пептидов и нейромедиаторов в причудливом ансамбле обеспечивают функционирование систем и органов, а также коммуникацию между ними. Следует отметить несколько принципиальных характеристик соединений, описанных в данном обзоре: 1) плейотропность, обеспечивающую действие на различные системы организма и различные эффекты этого действия; 2) взаимодействие с системами трансдукции сигнала и метаболическими событиями, в которых участвуют другие описанные соединения; 3) тесная связь всех соединений с основной нейрогуморальной системой организма, регулирующей стресс-реактивность и реализацию адаптивных процессов. Именно поэтому нарушение баланса медиаторов какого-то из звеньев системы, дойдя до критического уровня, когда компенсация уже невозможна, вызовет комплексное заболевание. Расстройства, связанные с потреблением ПАВ, являются психопатологическим феноменом с мезокортико-лимбическими структурами и системой стресс-реактивности в качестве основных биологических субстратов, при этом взаимодействие с внутренними органами регулирует данный процесс.

Согласно приведенным данным, очевидно, что основой влияния медиаторов висцеральных систем с плейотропными функциями на механизмы воздействия ПАВ является их интегрированность в лимбическую систему подкрепления и систему стресс-реактивности, которая берет начало в гипоталамо-гипофизарной системе. Если система подкрепления имеет центральную локализацию, то система чувствительности к стрессу посредством гормональной коммуникации взаимосвязана с внутренними органами. Помимо ключевой ГГНО, которая неоднократно здесь упоминалась, критическое значение в контексте химических зависимостей могут иметь оси, связывающие гипоталамо-гипофизарную систему с функционированием щитовидной и половых желез. Ввиду обширности этой темы авторы намеренно не включили описание этого материала, а заинтересованные читатели могут обратиться к исчерпывающим обзорам на данную тему [12, 148, 149].



**Рис. 1.** Взаимодействие висцеральных систем и ЦНС при расстройствах, связанных с потреблением ПАВ. При воздействии ПАВ гормоны, пептиды, нейромедиаторы и ростовые факторы, вырабатываясь в мозге и/или в периферических органах и тканях, проявляют плейотропные свойства, с одной стороны, функционируя как часть механизма развития патологии внутренних органов, а с другой – модулируя систему подкрепления и стресс-реактивности в качестве звена центрального механизма химической зависимости. Медиаторы оказывают протективное (–) или стимулирующее (+) действие в отношении различных аспектов формирования зависимости от ПАВ (правая часть рисунка). Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая, гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная и гипоталамо-гипофизарно-гонадная оси, а также иммунная система и микрофлора кишечника координируют процесс (левая часть рисунка). FGF – ростовой фактор фибробластов; GLP-1 – глюкагоноподобный пептид-1; PPAR – рецептор, активируемый пролифераторами пероксидом. Схема создана с использованием шаблонов Servier Medical Art (Servier), предоставленных по свободной лицензии Creative Commons Attribution 3.0 unported license

Таким образом, собственно ПАВ, а также циклы интоксикации и отмены напрямую или опосредованно нарушают нейрохимический и гормональный гомеостаз, что усугубляет течение хронических соматических заболеваний, а это, в свою очередь, утяжеляет течение собственно патологической зависимости. Эти события образуют замкнутый круг усугубления болезней зависимости и сопутствующих коморбидных заболеваний. Схематическое взаимодействие некоторых медиаторов висцеральных систем и ЦНС, которые, согласно данным литературы, оказывают однозначный эффект при расстройствах, связанных с потреблением ПАВ, представлено на рис. 1.

Важным направлением развития психофармакотерапии в клинике расстройств, связанных с потреблением ПАВ, должно быть исследование и внедрение новых препаратов, а также репозиционирование, т.е. использование не по основному показанию уже существующих одобренных препаратов [53, 85, 150, 151]. В обзоре описаны основные медиаторы периферических систем, которые вовлечены в центральные биохимические механизмы расстройств, связанных с потреблением ПАВ. Наличие общих биологических механизмов соматической патологии и химической зависимости в условиях коморбидности может являться основой создания и внедрения в практику новых эффективных средств фармакологической коррекции. При этом вопрос о потенциальном репозиционировании ряда уже внедренных препаратов в фармакотерапию зависимостей на основании общих патогенетических механизмов может быть принципиально важным, поскольку такое репозиционирование позволит в короткие сроки и с минимальным финансированием за счет сокращения этапа испытаний безвредности препарата довести его до клинического использования по новому назначению. Список наиболее перспективных фармакологических мишеньей, вовлеченность которых в формирование зависимостей была описана в настоящем обзоре, суммирован в табл. 1.

Потребление ПАВ не обязательно коморбидно с соматической патологией, но они значительно повышают риск развития друг друга. Формирование высокотехнологической методической базы для генотипирования позволяет проводить анализ на полногеномной уровне. Использование таких технологий позволит выявить генетические и эпигенетические маркеры развития сочетанной патологии, что, несомненно, может быть использовано в наркологической практике с целью выявления групп риска, использования в прогнозировании и диагностике, а также выявления лиц, чувствительных к фармакотерапии [8].

Развитие науки в настоящее время достигло того уровня, когда накоплено невероятное количество экспериментальных данных, что определяет необходимость анализа этих данных и создания новых концепций физиологических и патологических процессов. Действительно, учитывая многофакторность, полигенность, плейотропность медиаторов, вовлеченных в механизмы формирования патологической зависимости, складывается впечатление о безнадежности имплементации новых эффективных способов терапии. Тем не менее современные инструменты анализа данных вселяют определенные надежды. К примеру, использование интегративных биоинформационных подходов позволило выявить протеинкиназу mTOR (mammalian target of rapamycin) среди наиболее перспективных мишеней при терапии зависимостей для репозиционирования уже одобренных лекарств [152]. Ингибиторы mTOR используются при химиотерапии злокачественных новообразований. mTOR является ключевой молекулой, регулирующей фундаментальные физиологические процессы, кроме того, есть свидетельства вовлеченности mTOR в механизмы действия ПАВ [153].

Очевидно, что, соответствствуя общей тенденции оказания медицинской помощи, в наркологической практике также следует реализовывать персонализированный подход и в индивидуальном порядке проводить тщательный клинический осмотр и диагностику с целью выявления коморбидных соматических заболеваний. Ранее неоднократно отмечалось, что при лечении расстройств, связанных с употреблением ПАВ, с целью повышения эффективности необходимо учитывать сочетанную соматическую патологию в анамнезе и интегрировать терапевтические программы, направленные на улучшение как психического, так и соматического здоровья [21, 154].

**Вклад авторов.** Д.И. Перегуд – концепция, поиск и анализ данных литературы, написание первичного текста; Н.В. Гуляева – концепция, поиск и анализ данных литературы, окончательное редактирование статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НМИЦ ПН имени В.П. Сербского» Минздрава России (рег. № 122031000267-0).

**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.

**Таблица 1.** Перспективные фармакологические группы препаратов при терапии расстройств, связанных с потреблением ПАВ

Фармакологическая группа	Свидетельства эффективности при действии ПАВ			Показания для одобренных средств группы
	представители группы	ПАВ	клинические исследования	
Ангапонисты репепторов к эндотелину	BQ123	опиаты/опиоиды	потенциация анальгезии, ослабление развития толерантности и синдрома отмены [28]	отсутствуют
Ингибиторы антиотензин-превращающего фермента	каптоприл, эналаприл	алкоголь	подавление потребления [37]	отсутствуют
Ангапонисты рецепторов к ангиотензину	каптоприл	опиаты/опиоиды	ослабление подкрепления [38]	
Ангапонисты рецепторов к ангиотензину	телмисартан	алкоголь	ослабление подкрепления [40]	
Ангапонисты спиронолактон	валсартан	опиаты/опиоиды	ослабление развития толерантности и синдрома отмены [41]	отсутствуют
Ангапонисты V1b-рецепторов к вазопрессину	кандесартан	психостимуляторы	ослабление подкрепления [42]	
Ангапонисты минералкортикоидных рецепторов	спиронолактон	алкоголь	подавление потребления [46]	отсутствуют
Ангапонисты V1b-рецепторов к окситоцину	SSR149415, ABT-436	алкоголь	подавление потребления [48, 49]	подавление потребления [52]
Агонисты рецепторов к окситоцину	SSRI49415	опиаты/опиоиды	ослабление подкрепления [50]	отсутствуют
Гипогликемические средства (бигуаниды)	окситоцин	алкоголь, опиаты/опиоиды, психостимуляторы	ослабление подкрепления, снижение вероятности рецидива [57, 58]	подавление влечения и потребления, ослабление синдрома отмены [59]
	метформин	опиаты/опиоиды	ослабление развития толерантности и манифестиации синдрома отмены [65]	
		психостимуляторы	подавление потребления, ослабление проявлений интоксикации [66, 67]	отсутствуют

Таблица 1 (окончание)

Фармакологическая группа	Свидетельства эффективности при действии ПАВ			Показания для одобренных средств группы
	представители группы	ПАВ	клинические исследования	
Антагонисты рецепторов к прелину	JMV2959, HM-04 JMV2959	алкоголь опиаты/опиоиды	подавление потребления [77] ослабление подкрепления [78]	отсутствуют отсутствуют
Обратные агонисты рецепторов к прелину	PF-5190457, PF-6870961	алкоголь	подавление потребления [77]	подавление влечения [82]
Агонисты рецепторов гликокагоноподобному пептиду-1	эксенатид, семагуттид, тирзепатид	алкоголь, опиаты/опиоиды, психостимуляторы	подавление потребления [86, 87] подавление потребления [86, 87] подавление потребления [106]	подавление влечения к алкоголю и снижение его потребления [90, 91]
Агонисты рецепторов к FGF21	FGF21, PF05231023	алкоголь опиаты/опиоиды	подавление потребления [106] ослабление подкрепления, развития толерантности и синдрома отмены [109]	отсутствуют отсутствуют
Ингибиторы фосфодиэстераз	ибудиласт	алкоголь	подавление потребления [114]	подавление влечения к алкоголю и снижение его потребления [115, 116]
Агонисты рецепторов PPAR $\alpha$ и PPAR $\gamma$	апремиласт фибраты, гликазоны	алкоголь	подавление потребления [121] подавление потребления [125]	астма потовитализация анальгезии, подавление влечения, ослабление синдрома отмены [118, 119] псориаз противоречивые результаты в отношении потребления [126–128]

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rehm, J., Probst, C., Falcón, L. L., and Shield, K. D. (2021) Burden of disease: the epidemiological aspects of addiction, in *Textbook of Addiction Treatment* (el-Guebaly, N., Carrà, G., Galanter, M., Baldacchino, A. M., eds) Springer, Cham, pp. 51-64, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-36391-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-36391-8_5).
2. Koob, G. F., and Le Moal, M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostatic, *Neuropsychopharmacology*, **24**, 97-129, [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00195-0).
3. Korpi, E. R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D. J., Hyytiä, P., and Dawe, G. S. (2015) Mechanisms of action and persistent neuroplasticity by drugs of abuse, *Pharmacol. Rev.*, **67**, 872-1004, <https://doi.org/10.1124/pr.115.010967>.
4. Перегуд Д. И., Баронец В. Ю., Теребилина Н. Н., Гуляева Н. В. (2023) Роль BDNF в нейропластичности при формировании зависимости от алкоголя, *Биохимия*, **88**, 491-507, <https://doi.org/10.31857/S0320972523030090>.
5. Zindel, L. R., and Kranzler, H. R. (2014) Pharmacotherapy of alcohol use disorders: seventy-five years of progress, *J. Stud. Alcohol Drugs Suppl.*, **75**, 79-88.
6. Connery, H. S. (2015) Medication-assisted treatment of opioid use disorder: review of the evidence and future directions, *Harv. Rev. Psychiatry*, **23**, 63-75, <https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000075>.
7. First, M. B., Gaebel, W., Maj, M., Stein, D. J., Kogan, C. S., Saunders, J. B., Poznyak, V. B., Gureje, O., Lewis-Fernández, R., Maercker, A., Brewin, C. R., Cloitre, M., Claudino, A., Pike, K. M., Baird, G., Skuse, D., Krueger, R. B., Briken, P., Burke, J. D., Lochman, J. E., Evans, S. C., Woods, D. W., and Reed, G. M. (2021) An organization-and category-level comparison of diagnostic requirements for mental disorders in ICD-11 and DSM-5, *World Psychiatry*, **20**, 34-51, <https://doi.org/10.1002/wps.20825>.
8. Sanchez-Roige, S., Kember, R. L., and Agrawal, A. (2022) Substance use and common contributors to morbidity: a genetics perspective, *EBioMedicine*, **83**, 104212, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104212>.
9. Heilig, M., MacKillop, J., Martinez, D., Rehm, J., Leggio, L., and Vanderschuren, L. J. M. J. (2021) Addiction as a brain disease revised: why it still matters, and the need for consilience, *Neuropsychopharmacology*, **46**, 1715-1723, <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00950-y>.
10. Fang, Y., Sun, Y., Liu, Y., Liu, T., Hao, W., and Liao, Y. (2021) Neurobiological mechanisms and related clinical treatment of addiction: a review, *Psychoradiology*, **2**, 180-189, <https://doi.org/10.1093/psyrad/kkac021>.
11. Virmani, A., Binienda, Z. K., Ali, S. F., and Gaetani, F. (2007) Metabolic syndrome in drug abuse, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1122**, 50-68, <https://doi.org/10.1196/annals.1403.004>.
12. Quirk, A., and Twigg, S. (2021) Endocrine Manifestations of Alcohol and Other Drug Use Disorders, in *Textbook of Addiction Treatment* (el-Guebaly, N., Carrà, G., Galanter, M., Baldacchino, A. M., eds) Springer, Cham, pp. 1209-1224, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-36391-8\\_84](https://doi.org/10.1007/978-3-030-36391-8_84).
13. Serafine, K. M., O'Dell, L. E., and Zorrilla, E. P. (2021) Converging vulnerability factors for compulsive food and drug use, *Neuropharmacology*, **196**, 108556, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108556>.
14. Wu, L. T., Zhu, H., and Ghitsa, U. E. (20118) Multicomorbidity of chronic diseases and substance use disorders and their association with hospitalization: Results from electronic health records data, *Drug Alcohol. Depend.*, **192**, 316-323, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.08.013>.
15. Skarstein, S., Lien, L., and Abebe, D. S. (2023) The burden of somatic diseases among people with alcohol- and drug use disorders are influenced by mental illness and low socioeconomic status. A registry-based cohort study in Norway, *J. Psychosom. Res.*, **165**, 111137, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2022.111137>.
16. Formánek, T., Krupchanka, D., Mladá, K., Winkler, P., and Jones, P. B. (2022) Mortality and life-years lost following subsequent physical comorbidity in people with pre-existing substance use disorders: a national registry-based retrospective cohort study of hospitalised individuals in Czechia, *Lancet Psychiatry*, **9**, 957-968, [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(22\)00335-2](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(22)00335-2).
17. Nøkleby, H. (2012) Comorbid drug use disorders and eating disorders – a review of prevalence studies, *Nordic Stud. Alcohol Drugs*, **29**, 303-314, <https://doi.org/10.2478/v10199-012-0024-9>.
18. Mellentin, A. I., Nielsen, D. G., Skøt, L., Støving, R. K., Guala, M. M., Nielsen, A. S., Wesselhoeft, R., and Mejldal, A. (2022) Risk of somatic diseases in patients with eating disorders: the role of comorbid substance use disorders, *Epidemiol. Psychiatr. Sci.*, **31**, e73, <https://doi.org/10.1017/S204579602200052X>.
19. He, S., Hasler, B. P., and Chakravorty, S. (2019) Alcohol and sleep-related problems, *Curr. Opin. Psychol.*, **30**, 117-122, <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2019.03.007>.
20. Tang, J., Liao, Y., He, H., Deng, Q., Zhang, G., Qi, C., Cui, H., Jiao, B., Yang, M., Feng, Z., Chen, X., Hao, W., and Liu, T. (2015) Sleeping problems in Chinese illicit drug dependent subjects, *BMC Psychiatry*, **15**, 28, <https://doi.org/10.1186/s12888-015-0409-x>.

21. Labrie, R. A., Laplante, D. A., Peller, A. J., Christensen, D. E., Greenwood, K. L., Straus, J. H., Garmon, M. S., Browne, C., and Shaffer, H. J. (2007) The interdependence of behavioral and somatic health: implications for conceptualizing health and measuring treatment outcomes, *Int. J. Integr. Care*, **7**, e10, <https://doi.org/10.5334/ijic.192>.
22. Cathomas, F., Murrough, J. W., Nestler, E. J., Han, M. H., and Russo, S. J. (2019) Neurobiology of resilience: interface between mind and body, *Biol. Psychiatry*, **86**, 410-420, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.011>
23. McDougall, J. (2002) Addiction: a psychosomatic solution, *Int. Congress Ser.*, **1241**, 345-351, [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)00771-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00771-9).
24. Большаков А. П., Третьякова Л. В., Квичанский А. А., Гуляева Н. В. (2021) Глюокортикоиды в нейророспальении гиппокампа: доктор Джекилл и мистер Хайд, *Биохимия*, **86**, 186-199, <https://doi.org/10.31857/S0320972521020044>.
25. Герсамия А. Г., Почигаева К. И., Лесс Ю. Э., Акжигитов Р. Г., Гехт А. Б., Гуляева Н. В. (2024) Гендерные особенности депрессивных расстройств: клинико-психологические, нейробиологические и трансляционные аспекты, *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **124**, 7-16, <https://doi.org/10.17116/jnevro20241240317>.
26. Иванов С. В., Воронова Е. И. (2021) Терапия депрессий при соматических заболеваниях, *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **121**, 106-112, <https://doi.org/10.17116/jnevro2021121052106>.
27. Haryono, A., Ramadhiani, R., Ryanto, G. R. T., and Emoto, N. (2022) Endothelin and the cardiovascular system: the long journey and where we are going, *Biology (Basel)*, **11**, 759, <https://doi.org/10.3390/biology11050759>.
28. Bhalla, S., Andurkar, S. V., Gulati, A. (2016) Neurobiology of opioid withdrawal: Role of the endothelin system, *Life Sci.*, **159**, 34-42, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.016>.
29. Bhalla, S., Pais, G., Tapia, M., and Gulati, A. (2015) Endothelin ETA receptor antagonist reverses naloxone-precipitated opioid withdrawal in mice, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **93**, 935-944, <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0022>.
30. Cannone, V., Cabassi, A., Volpi, R., and Burnett, J. C. Jr. (2019) Atrial natriuretic peptide: a molecular target of novel therapeutic approaches to cardio-metabolic disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3265, <https://doi.org/10.3390/ijms20133265>.
31. Marazziti, D., Barberi, F. M., Mucci, F., Maglio, A., Dell’Oste, V., and Dell’Osso, L. (2021) The emerging role of atrial natriuretic peptide in psychiatry, *Curr. Med. Chem.*, **28**, 69-79, <https://doi.org/10.2174/0929867327666200219091102>.
32. Kovács, G. L. (2000) The role of atrial natriuretic peptide in alcohol withdrawal: a peripheral indicator and central modulator? *Eur. J. Pharmacol.*, **405**, 103-112, [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00545-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00545-8).
33. Koopmann, A., Leménager, T., Wolf, N. D., Reinhard, I., Hermann, D., Koch, J., Wiedemann, K., and Kiefer, F. (2014) The impact of atrial natriuretic peptide on anxiety, stress and craving in patients with alcohol dependence, *Alcohol Alcohol.*, **49**, 282-286, <https://doi.org/10.1093/alc/agt160>.
34. Xu, T., Chen, Z., Zhou, X., Wang, L., Zhou, F., Yao, D., Zhou, B., and Becker, B. (2024) The central renin-angiotensin system: A genetic pathway, functional decoding, and selective target engagement characterization in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **121**, e2306936121, <https://doi.org/10.1073/pnas.2306936121>.
35. Sommer, W. H., and Saavedra, J. M. (2008) Targeting brain angiotensin and corticotrophin-releasing hormone systems interaction for the treatment of mood and alcohol use disorders, *J. Mol. Med. (Berl)*, **86**, 723-728, <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0333-3>.
36. Котов А. В., Толпыго С. М., Певцова Е. И., Обухова М. Ф., Панченко Л. Ф., Наумова Т. А., Алябьева Т. Н., Баронец В. Ю., Перегуд Д. И. (2006) Ангиотензиноген в механизмах становления и реализации алкогольной зависимости, *Нейрохимия*, **23**, 143-155.
37. Spinoza, G., Perlanski, E., Leenen, F. H., Stewart, R. B., and Grupp, L. A. (1988) Angiotensin converting enzyme inhibitors: animal experiments suggest a new pharmacological treatment for alcohol abuse in humans, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **12**, 65-70, <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1988.tb00134.x>.
38. Trieu, B. H., Remmers, B. C., Toddes, C., Brandner, D. D., Lefevre, E. M., Kocharian, A., Retzlaff, C. L., Dick, R. M., Mashal, M. A., Gauthier, E. A., Xie, W., Zhang, Y., More, S. S., and Rothwell, P. E. (2022) Angiotensin-converting enzyme gates brain circuit-specific plasticity via an endogenous opioid, *Science*, **375**, 1177-1182, <https://doi.org/10.1126/science.abl5130>.
39. Maul, B., Krause, W., Pankow, K., Becker, M., Gembardt, F., Alenina, N., Walther, T., Bader, M., and Siems, W. E. (2005) Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor, *FASEB J.*, **19**, 1474-1481, <https://doi.org/10.1096/fj.05-3742com>.
40. Tezcan, K., Yananli, H. R., Demirkapu, M. J., Gören, M. Z., Sakalli, H. E., Colombo, G., and Gülhan, R. (2021) The effect of telmisartan, an angiotensin receptor blocker, on alcohol consumption and alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens, *Alcohol*, **96**, 73-81, <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2021.08.004>.

41. Kaeidi, A., Amirteimoury, M., Zare, M. S., Nazari, A., Hakimizadeh, E., Hassanshahi, J., and Fatemi, I. (2021) Effects of valsartan on morphine tolerance and dependence in rats, *Res. Pharm. Sci.*, **16**, 286-293, <https://doi.org/10.4103/1735-5362.314827>.
42. Xu, X., Pan, J., Li, X., Cui, Y., Mao, Z., Wu, B., Xu, H., Zhou, W., and Liu, Y. (2019) Inhibition of methamphetamine self-administration and reinstatement by central blockade of angiotensin II receptor in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **369**, 244-258, <https://doi.org/10.1124/jpet.118.255729>.
43. Fuller, P. J., and Young, M. J. (2005) Mechanisms of mineralocorticoid action, *Hypertension*, **46**, 1227-1235, <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000193502.77417.17>.
44. Aoun, E. G., Jimenez, V. A., Vendruscolo, L. F., Walter, N. A. R., Barbier, E., Ferrulli, A., Haass-Koffler, C. L., Darakjian, P., Lee, M. R., Addolorato, G., Heilig, M., Hitzemann, R., Koob, G. F., Grant, K. A., and Leggio, L. (2018) A relationship between the aldosterone-mineralocorticoid receptor pathway and alcohol drinking: preliminary translational findings across rats, monkeys and humans, *Mol. Psychiatry*, **23**, 1466-1473, <https://doi.org/10.1038/mp.2017.97>.
45. Pince, C. L., Whiting, K. E., Wang, T., Lékó, A. H., Farinelli, L. A., Cooper, D., Farokhnia, M., Vendruscolo, L. F., and Leggio, L. (2023) Role of aldosterone and mineralocorticoid receptor (MR) in addiction: a scoping review, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **154**, 105427, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105427>.
46. Farokhnia, M., Rentsch, C. T., Chuong, V., McGinn, M. A., Elvig, S. K., Douglass, E. A., Gonzalez, L. A., Sanfilippo, J. E., Marchette, R. C. N., Tunstall, B. J., Fiellin, D. A., Koob, G. F., Justice, A. C., Leggio, L., and Vendruscolo, L. F. (2022) Spironolactone as a potential new pharmacotherapy for alcohol use disorder: convergent evidence from rodent and human studies, *Mol. Psychiatry*, **27**, 4642-4652, <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01736-y>.
47. Ložić, M., Šarenac, O., Murphy, D., and Japundžić-Žigon, N. (2018) Vasopressin, central autonomic control and blood pressure regulation, *Curr. Hypertens. Rep.*, **20**, 11, <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0811-0>.
48. Zhou, Y., Colombo, G., Carai, M. A., Ho, A., Gessa, G. L., and Kreek, M. J. (2011) Involvement of arginine vasopressin and V1b receptor in alcohol drinking in Sardinian alcohol-preferring rats, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **35**, 1876-1883, <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01532.x>.
49. Edwards, S., Guerrero, M., Ghoneim, O. M., Roberts, E., and Koob, G. F. (2012) Evidence that vasopressin V1b receptors mediate the transition to excessive drinking in ethanol-dependent rats, *Addict. Biol.*, **17**, 76-85, <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00291.x>.
50. Bates, M. L. S., Hofford, R. S., Emery, M. A., Wellman, P. J., and Eitan, S. (2018) The role of the vasopressin system and dopamine D1 receptors in the effects of social housing condition on morphine reward, *Drug Alcohol Depend.*, **188**, 113-118, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.03.021>.
51. Katz, D. A., Locke, C., Liu, W., Zhang, J., Achari, R., Wesnes, K. A., and Tracy, K. A. (2016) Single-dose interaction study of the arginine vasopressin type 1B receptor antagonist ABT-436 and alcohol in moderate alcohol drinkers, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **40**, 838-845, <https://doi.org/10.1111/acer.12996>.
52. Ryan, M. L., Falk, D. E., Fertig, J. B., Rendenbach-Mueller, B., Katz, D. A., Tracy, K. A., Strain, E. C., Dunn, K. E., Kampman, K., Mahoney, E., Ciraulo, D. A., Sickles-Colaneri, L., Ait-Daoud, N., Johnson, B. A., Ransom, J., Scott, C., Koob, G. F., and Litten, R. Z. (2017) A phase 2, double-blind, placebo-controlled randomized trial assessing the efficacy of ABT-436, a novel V1b receptor antagonist, for alcohol dependence, *Neuropsychopharmacology*, **42**, 1012-1023, <https://doi.org/10.1038/npp.2016.214>.
53. Burnette, E. M., Nieto, S. J., Grodin, E. N., Meredith, L. R., Hurley, B., Miotto, K., Gillis, A. J., and Ray, L. A. (2022) Novel agents for the pharmacological treatment of alcohol use disorder, *Drugs*, **82**, 251-274, <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01670-3>.
54. Carter, C. S., Kenkel, W. M., MacLean, E. L., Wilson, S. R., Perkeybile, A. M., Yee, J. R., Ferris, C. F., Nazarloo, H. P., Porges, S. W., Davis, J. M., Connelly, J. J., and Kingsbury, M. A. (2020) Is oxytocin “nature’s medicine”? *Pharmacol. Rev.*, **2**, 829-861, <https://doi.org/10.1124/pr.120.019398>.
55. Wang, P., Wang, S. C., Liu, X., Jia, S., Wang, X., Li, T., Yu, J., Parpura, V., and Wang, Y. F. (2022) Neural functions of hypothalamic oxytocin and its regulation, *ASN Neuro*, **14**, 17590914221100706, <https://doi.org/10.1177/17590914221100706>.
56. Jankowski, M., Broderick, T. L., and Gutkowska, J. (2020) The role of oxytocin in cardiovascular protection, *Front. Psychol.*, **11**, 2139, <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.02139>.
57. Cid-Jofré, V., Moreno, M., Reyes-Parada, M., and Renard, G. M. (2021) Role of oxytocin and vasopressin in neuropsychiatric disorders: therapeutic potential of agonists and antagonists, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12077, <https://doi.org/10.3390/ijms222112077>.
58. Wronikowska-Denysiuk, O., Mrozek, W., and Budzyńska, B. (2023) The role of oxytocin and vasopressin in drug-induced reward-implications for social and non-social factors, *Biomolecules*, **13**, 405, <https://doi.org/10.3390/biom13030405>.

59. Mellentin, A. I., Finn, S. W., Skøt, L., Thaysen-Petersen, D., Mistarz, N., Fink-Jensen, A., and Nielsen, D. G. (2023) The effectiveness of oxytocin for treating substance use disorders: a systematic review of randomized placebo-controlled trials, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **151**, 105185, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105185>.
60. Chen, X. L., Lu, G., Gong, Y. X., Zhao, L. C., Chen, J., Chi, Z. Q., Yang, Y. M., Chen, Z., Li, Q. L., and Liu, J. G. (2007) Expression changes of hippocampal energy metabolism enzymes contribute to behavioural abnormalities during chronic morphine treatment, *Cell Res.*, **17**, 689-700, <https://doi.org/10.1038/cr.2007.63>.
61. Jiang, X., Li, J., and Ma, L. (2007) Metabolic enzymes link morphine withdrawal with metabolic disorder, *Cell Res.*, **17**, 741-743, <https://doi.org/10.1038/cr.2007.75>.
62. Weinsanto, I., Mouheiche, J., Laux-Biehlmann, A., Delalande, F., Marquette, A., Chavant, V., Gabel, F., Cianferani, S., Charlet, A., Parat, M. O., and Goumon, Y. (2018) Morphine binds creatine kinase B and inhibits its activity, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 464, <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00464>.
63. Sullivan, M., Fernandez-Aranda, F., Camacho-Barcia, L., Harkin, A., Macrì, S., Mora-Maltas, B., Jiménez-Murcia, S., O'Leary, A., Ottomana, A. M., Presta, M., Slattery, D., Scholtz, S., and Glennon, J. C. (2023) Insulin and disorders of behavioural flexibility, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **150**, 105169, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105169>.
64. Dodd, S., Sominsky, L., Siskind, D., Bortolasci, C. C., Carvalho, A. F., Maes, M., Walker, A. J., Walder, K., Yung, A. R., Williams, L. J., Myles, H., Watson, T., and Berk, M. (2022) The role of metformin as a treatment for neuropsychiatric illness, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **64**, 32-43, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2022.09.002>.
65. Fatemi, I., Amirteimoury, M., Shamsizadeh, A., and Kaeidi, A. (2018) The effect of metformin on morphine analgesic tolerance and dependence in rats, *Res. Pharm. Sci.*, **13**, 316-323, <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235158>.
66. Keshavarzi, S., Kermanshahi, S., Karami, L., Motaghinejad, M., Motevalian, M., and Sadr, S. (2019) Protective role of metformin against methamphetamine induced anxiety, depression, cognition impairment and neurodegeneration in rat: The role of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathways, *Neurotoxicology*, **72**, 74-84, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.02.004>.
67. Chan, A., Willard, A., Mulloy, S., Ibrahim, N., Sciacotta, A., Schonfeld, M., Spencer, S. M. (2022) Metformin in nucleus accumbens core reduces cue-induced cocaine seeking in male and female rats, *Addict. Biol.*, **27**, e13165, <https://doi.org/10.1111/adbb.13165>.
68. Miller, L. J., Harikumar, K. G., Wootten, D., and Sexton, P. M. (2021) Roles of cholecystokinin in the nutritional continuum. Physiology and potential therapeutics, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **12**, 684656, <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.684656>.
69. Ma, Y., and Giardino, W. J. (2022) Neural circuit mechanisms of the cholecystokinin (CCK) neuropeptide system in addiction, *Addict. Neurosci.*, **3**, 100024, <https://doi.org/10.1016/j.addcn.2022.100024>.
70. Анохина И. П., Проскурякова Т. В., Беспалова А. Д. (2009) Новый нейропептид для лечения алкоголизма и наркоманий, *Вопр. Наркол.*, **6**, 42-49.
71. Колик Л. Г., Надорова А. В., Гудашева Т. А., Мартынов В. А., Середенин С. Б. (2017) Дипептидный аналог холецистокинина-4 ослабляет тревожную реакцию у «высокоэмоциональных» мышей BALB/c и при моделировании алкогольной абstinенции у крыс: сравнение с феназепамом, *Фармакокинет. Фармакодинамика*, **2**, 19-24.
72. Elkashef, A., Brašić, J. R., Cantelina, L. R. Jr., Kahn, R., Chiang, N., Ye, W., Zhou, Y., Mojsiak, J., Warren, K. R., Crabb, A., Hilton, J., Wong, D. F., and Vocci, F. (2019) A cholecystokinin B receptor antagonist and cocaine interaction, phase I study, *CNS Neurosci. Ther.*, **25**, 136-146, <https://doi.org/10.1111/cnst.12994>.
73. Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S. A., Morris, D. G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A. B., and Korbonits, M. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 2988, <https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8739>.
74. Айрапетов М. И., Ереско С. О., Лебедев А. А., Бычков Е. Р., Шабанов П. Д. (2021) Экспрессия рецептора грелина GHS-R1A в головном мозге (мини-обзор), *Мол. Биол.*, **55**, 578-584, <https://doi.org/10.31857/S0026898421040029>.
75. Yanagi, S., Sato, T., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2018) The homeostatic force of ghrelin, *Cell Metab.*, **27**, 786-804, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.008>.
76. Stone, L. A., Harmatz, E. S., and Goosens, K. A. (2020) Ghrelin as a stress hormone: implications for psychiatric illness, *Biol. Psychiatry*, **88**, 531-540, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.05.013>.
77. Richardson, R. S., Sulima, A., Rice, K. C., Kucharczuk, J. A., Janda, K. D., Nisbett, K. E., Koob, G. F., Vendruscolo, L. F., and Leggio, L. (2023) Pharmacological GHSR (ghrelin receptor) blockade reduces alcohol binge-like drinking in male and female mice, *Neuropharmacology*, **238**, 109643, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109643>.

78. Sustkova-Fiserova, M., Puskina, N., Havlickova, T., Lapka, M., Syslova, K., Pohorala, V., and Charalambous, C. (2020) Ghrelin receptor antagonism of fentanyl-induced conditioned place preference, intravenous self-administration, and dopamine release in the nucleus accumbens in rats, *Addict. Biol.*, **25**, e12845, <https://doi.org/10.1111/adb.12845>.
79. Zallar, L. J., Farokhnia, M., Tunstall, B. J., Vendruscolo, L. F., and Leggio, L. (2017) The role of the ghrelin system in drug addiction, *Int. Rev. Neurobiol.*, **136**, 89-119, <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.08.002>.
80. Jerlhag, E. (2023) Animal studies reveal that the ghrelin pathway regulates alcohol-mediated responses, *Front. Psychiatry*, **14**, 1050973, <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2023.1050973>.
81. Leggio, L., Zywiak, W. H., Fricchione, S. R., Edwards, S. M., de la Monte, S. M., Swift, R. M., and Kenna, G. A. (2014) Intravenous ghrelin administration increases alcohol craving in alcohol-dependent heavy drinkers: a preliminary investigation, *Biol. Psychiatry*, **76**, 734-741, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.019>.
82. Lee, M. R., Tapocik, J. D., Ghareeb, M., Schwandt, M. L., Dias, A. A., Le, A. N., Cobbina, E., Farinelli, L. A., Bouhlal, S., Farokhnia, M., Heilig, M., Akhlaghi, F., and Leggio, L. (2020) The novel ghrelin receptor inverse agonist PF-5190457 administered with alcohol: preclinical safety experiments and a phase 1b human laboratory study, *Mol. Psychiatry*, **25**, 461-475, <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0064-y>.
83. Farokhnia, M., Portelli, J., Lee, M. R., McDiarmid, G. R., Munjal, V., Abshire, K. M., Battista, J. T., Browning, B. D., Deschaine, S. L., Akhlaghi, F., and Leggio, L. (2020) Effects of exogenous ghrelin administration and ghrelin receptor blockade, in combination with alcohol, on peripheral inflammatory markers in heavy-drinking individuals: results from two human laboratory studies, *Brain Res.*, **1740**, 146851, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146851>.
84. Kharbanda, K. K., Farokhnia, M., Deschaine, S. L., Bhargava, R., Rodriguez-Flores, M., Casey, C. A., Goldstone, A. P., Jerlhag, E., Leggio, L., and Rasineni, K. (2022) Role of the ghrelin system in alcohol use disorder and alcohol-associated liver disease: a narrative review, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **46**, 2149-2159, <https://doi.org/10.1111/acer.14967>.
85. Rasmussen, K., White, D. A., and Acri, J. B. (2019) NIDA's medication development priorities in response to the opioid crisis: ten most wanted, *Neuropsychopharmacology*, **44**, 657-659, <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0292-5>.
86. Klausen, M. K., Thomsen, M., Wortwein, G., and Fink-Jensen, A. (2022) The role of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in addictive disorders, *Br. J. Pharmacol.*, **179**, 625-641, <https://doi.org/10.1111/bph.15677>.
87. Jerlhag, E. (2023) The therapeutic potential of glucagon-like peptide-1 for persons with addictions based on findings from preclinical and clinical studies, *Front. Pharmacol.*, **14**, 1063033, <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1063033>.
88. Eren-Yazicioglu, C. Y., Yigit, A., Dogruoz, R. E., and Yapici-Eser, H. (2021) Can GLP-1 Be a target for reward system related disorders? A qualitative synthesis and systematic review analysis of studies on palatable food, drugs of abuse, and alcohol, *Front. Behav. Neurosci.*, **14**, 614884, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.614884>.
89. Klausen, M. K., Jensen, M. E., Møller, M., Le Dous, N., Jensen, A. Ø., Zeeman, V. A., Johannsen, C. F., Lee, A., Thomsen, G. K., Macoveanu, J., Fisher, P. M., Gillum, M. P., Jørgensen, N. R., Bergmann, M. L., Enghusen Poulsen, H., Becker, U., Holst, J. J., Benveniste, H., Volkow, N. D., Vollstädt-Klein, S., Miskowiak, K. W., Ekstrøm, C. T., Knudsen, G. M., Vilsbøll, T., and Fink-Jensen, A. (2022) Exenatide once weekly for alcohol use disorder investigated in a randomized, placebo-controlled clinical trial, *JCI Insight*, **7**, e159863, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.159863>.
90. Quddos, F., Hubshman, Z., Tegge, A., Sane, D., Marti, E., Kablinger, A. S., Gatchalian, K. M., Kelly, A. L., DiFeliceantonio, A. G., and Bickel, W. K. (2023) Semaglutide and Tirzepatide reduce alcohol consumption in individuals with obesity, *Sci. Rep.*, **13**, 20998, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48267-2>.
91. Richards, J. R., Dorand, M. F., Royal, K., Mnajjed, L., Paszkowiak, M., and Simmons, W. K. (2023) Significant decrease in alcohol use disorder symptoms secondary to semaglutide therapy for weight loss: a case series, *J. Clin. Psychiatry*, **85**, 23m15068, <https://doi.org/10.4088/JCP.23m15068>.
92. Leggio, L., Hendershot, C. S., Farokhnia, M., Fink-Jensen, A., Klausen, M. K., Schacht, J. P., and Simmons, W. K. (2023) GLP-1 receptor agonists are promising but unproven treatments for alcohol and substance use disorders, *Nat. Med.*, **29**, 2993-2995, <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02634-8>.
93. Bach, P., Koopmann, A., and Kiefer, F. (2021) The impact of appetite-regulating neuropeptide leptin on alcohol use, alcohol craving and addictive behavior: a systematic review of preclinical and clinical data, *Alcohol Alcohol.*, **56**, 149-165, <https://doi.org/10.1093/alc/aga044>.
94. Carrette, L. L. G., Corral, C., Boomhower, B., Brennan, M., Crook, C., Ortez, C., Shankar, K., Simpson, S., Maturin, L., Solberg Woods, L. C., Palmer, A. A., de Guglielmo, G., and George, O. (2022) Leptin protects against the development and expression of cocaine addiction-like behavior in heterogeneous stock rats, *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 832899, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.832899>.

95. Shen, M., Jiang, C., Liu, P., Wang, F., and Ma, L. (2016) Mesolimbic leptin signaling negatively regulates cocaine-conditioned reward, *Transl. Psychiatry*, **6**, e972, <https://doi.org/10.1038/tp.2016.223>.
96. Gereau, G. B., Garrison, S. D., and McElligott, Z. A. (2023) Neurotensin and energy balance, *J. Neurochem.*, **166**, 189-200, <https://doi.org/10.1111/jnc.15868>.
97. Ferraro, L., Tiozzo Fasiolo, L., Beggiato, S., Borelli, A. C., Pomierny-Chamiolo, L., Frankowska, M., Antonelli, T., Tomasini, M. C., Fuxe, K., and Filipi, M. (2016) Neurotensin: A role in substance use disorder? *J. Psychopharmacol.*, **30**, 112-127, <https://doi.org/10.1177/0269881115622240>.
98. Rodríguez, F. D., Sánchez, M. L., and Coveñas, R. (2023) Neurotensin and alcohol use disorders: towards a pharmacological treatment, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 8656, <https://doi.org/10.3390/ijms24108656>.
99. Константинопольский М. А., Чернякова И. В., Кудрин В. С., Клодт П. М., Колик Л. Г., Гудашева Т. А. (2013) Дипептидный аналог нейротензина NT (8-13) дилепт повышает болевой порог и снижает выраженность синдрома отмены морфина у крыс, *Эксп. Клин. Фармакол.*, **76**, 6-11.
100. Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009) The FGF family: biology, pathophysiology and therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 235-253, <https://doi.org/10.1038/nrd2792>.
101. Wang, T., Farokhnia, M., and Leggio, L. (2022) FGF21 regulates alcohol intake: New hopes on the rise for alcohol use disorder treatment? *Cell. Rep. Med.*, **3**, 100578, <https://doi.org/10.1016/j.crm.2022.100578>.
102. Turner, C. A., Watson, S. J., and Akil, H. (2012) The fibroblast growth factor family: neuromodulation of affective behavior, *Neuron*, **76**, 160-174, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.037>.
103. Even-Chen, O., Sadot-Sogrin, Y., Shaham, O., and Barak, S. (2017) Fibroblast growth factor 2 in the dorsomedial striatum is a novel positive regulator of alcohol consumption, *J. Neurosci.*, **37**, 8742-8754, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0890-17.2017>.
104. Even-Chen, O., and Barak, S. (2019) Inhibition of FGF receptor-1 suppresses alcohol consumption: role of PI3 kinase signaling in dorsomedial striatum, *J. Neurosci.*, **39**, 7947-7957, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0805-19.2019>.
105. Even-Chen, O., Herburg, L., Kefalakes, E., Urshansky, N., Grothe, C., and Barak, S. (2022) FGF2 is an endogenous regulator of alcohol reward and consumption, *Addict. Biol.*, **27**, e13115, <https://doi.org/10.1111/adb.13115>.
106. Flippo, K. H., Trammell, S. A. J., Gillum, M. P., Aklan, I., Perez, M. B., Yavuz, Y., Smith, N. K., Jensen-Cody, S. O., Zhou, B., Claflin, K. E., Beierschmitt, A., Fink-Jensen, A., Knop, F. K., Palmour, R. M., Grueter, B. A., Atasoy, D., and Potthoff, M. J. (2022) FGF21 suppresses alcohol consumption through an amygdalo-striatal circuit, *Cell Metab.*, **34**, 317-328, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.024>.
107. Wagner-Skacel, J., Horvath, A., Grande, P., Wenninger, J., Matzer, F., Fazekas, C., Mörkl, S., Meinitzer, A., and Stadlbauer, V. (2021) Association of fibroblast growth factor 21 with alcohol consumption and alcohol liver cirrhosis, *Neuropsychiatry*, **35**, 140-146, <https://doi.org/10.1007/s40211-020-00380-8>.
108. Farokhnia, M., Wang, T., Jourdan, T., Godlewski, G., Farinelli, L. A., Kunos, G., and Leggio, L. (2023) A human laboratory study on the link between alcohol administration and circulating fibroblast growth factor 21 (FGF21) in individuals with alcohol use disorder, *Drug Alcohol Depend.*, **245**, 109809, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2023.109809>.
109. Dorval, L., Knapp, B. I., Majekodunmi, O. A., Eliseeva, S., and Bidlack, J. M. (2022) Mice with high FGF21 serum levels had a reduced preference for morphine and an attenuated development of acute antinociceptive tolerance and physical dependence, *Neuropharmacology*, **202**, 108858, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108858>.
110. Grodin, E. N. (2024) Neuroimmune modulators as novel pharmacotherapies for substance use disorders, *Brain Behav. Immun. Health*, **36**, 100744, <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2024.100744>.
111. Namba, M. D., Leyrer-Jackson, J. M., Nagy, E. K., Olive, M. F., and Neisewander, J. L. (2021) Neuroimmune mechanisms as novel treatment targets for substance use disorders and associated comorbidities, *Front. Neurosci.*, **15**, 650785, <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.650785>.
112. Essayan, D. M. (1999) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation, *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 965-973, [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00331-1](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00331-1).
113. Rolan, P., Hutchinson, M., and Johnson, K. (2009) Ibudilast: a review of its pharmacology, efficacy and safety in respiratory and neurological disease, *Expert. Opin. Pharmacother.*, **10**, 2897-2904, <https://doi.org/10.1517/14656560903426189>.
114. Bell, R. L., Lopez, M. F., Cui, C., Egli, M., Johnson, K. W., Franklin, K. M., and Becker, H. C. (2015) Ibudilast reduces alcohol drinking in multiple animal models of alcohol dependence, *Addict. Biol.*, **20**, 38-42, <https://doi.org/10.1111/adb.12106>.
115. Ray, L. A., Bujarski, S., Shoptaw, S., Roche, D. J., Heinzerling, K., and Miotto, K. (2017) Development of the neuroimmune modulator ibudilast for the treatment of alcoholism: a randomized, placebo-controlled, human laboratory trial, *Neuropsychopharmacology*, **42**, 1776-1788, <https://doi.org/10.1038/npp.2017.10>.

116. Grodin, E. N., Bujarski, S., Towns, B., Burnette, E., Nieto, S., Lim, A., Lin, J., Miotto, K., Gillis, A., Irwin, M. R., Evans, C., and Ray, L. A. (2021) Ibudilast, a neuroimmune modulator, reduces heavy drinking and alcohol cue-elicited neural activation: a randomized trial, *Transl. Psychiatry*, **11**, 355, <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01478-5>.
117. Hutchinson, M. R., Lewis, S. S., Coats, B. D., Skyba, D. A., Crysdale, N. Y., Berkelhammer, D. L., Brzeski, A., Northcutt, A., Vietz, C. M., Judd, C. M., Maier, S. F., Watkins, L. R., and Johnson, K. W. (2009) Reduction of opioid withdrawal and potentiation of acute opioid analgesia by systemic AV411 (ibudilast), *Brain Behav. Immun.*, **23**, 240-250, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.012>.
118. Metz, V. E., Jones, J. D., Manubay, J., Sullivan, M. A., Mogali, S., Segoshi, A., Madera, G., Johnson, K. W., and Comer, S. D. (2017) Effects of ibudilast on the subjective, reinforcing, and analgesic effects of oxycodone in recently detoxified adults with opioid dependence, *Neuropsychopharmacology*, **42**, 1825-1832, <https://doi.org/10.1038/npp.2017.70>.
119. Cooper, Z. D., Johnson, K. W., Pavlicova, M., Glass, A., Vosburg, S. K., Sullivan, M. A., Manubay, J. M., Martinez, D. M., Jones, J. D., Saccone, P. A., and Comer, S. D. (2016) The effects of ibudilast, a glial activation inhibitor, on opioid withdrawal symptoms in opioid-dependent volunteers, *Addict. Biol.*, **21**, 895-903, <https://doi.org/10.1111/adb.12261>.
120. Heinzerling, K. G., Briones, M., Thames, A. D., Hinkin, C. H., Zhu, T., Wu, Y. N., and Shoptaw, S. J. (2020) Randomized, placebo-controlled trial of targeting neuroinflammation with ibudilast to treat methamphetamine use disorder, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **15**, 238-248, <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09883-w>.
121. Grigsby, K. B., Mangieri, R. A., Roberts, A. J., Lopez, M. F., Firsick, E. J., Townsley, K. G., Beneze, A., Bess, J., Eisenstein, T. K., Meissler, J. J., Light, J. M., Miller, J., Quello, S., Shadan, F., Skinner, M., Aziz, H. C., Metten, P., Morrisett, R. A., Crabbe, J. C., Roberto, M., Becker, H. C., Mason, B. J., and Ozburn, A. R. (2023) Preclinical and clinical evidence for suppression of alcohol intake by apremilast, *J. Clin. Invest.*, **133**, e159103, <https://doi.org/10.1172/JCI159103>.
122. Montaigne, D., Butruille, L., and Staels, B. (2021) PPAR control of metabolism and cardiovascular functions, *Nat. Rev. Cardiol.*, **18**, 809-823, <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00569-6>.
123. Christofides, A., Konstantinidou, E., Jani, C., and Boussiotis, V. A. (2021) The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses, *Metabolism*, **114**, 154338, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154338>.
124. Sagheddu, C., Melis, M., Muntoni, A. L., and Pistis, M. (2021) Repurposing peroxisome proliferator-activated receptor agonists in neurological and psychiatric disorders, *Pharmaceuticals (Basel)*, **14**, 1025, <https://doi.org/10.3390/ph14101025>.
125. Matheson, J., and Le Foll, B. (2020) Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists in substance use disorders: a synthesis of preclinical and human evidence, *Cells*, **9**, 1196, <https://doi.org/10.3390/cells9051196>.
126. Mason, B. J., Estey, D., Roberts, A., de Guglielmo, G., George, O., Light, J., Stoolmiller, M., Quello, S., Skinner, M., Shadan, F., Begovic, A., Kyle, M. C., and Harris, R. A. (2024) A reverse translational study of PPAR- $\alpha$  agonist efficacy in human and rodent models relevant to alcohol use disorder, *Neurobiol. Stress*, **29**, 100604, <https://doi.org/10.1016/j.jnstr.2023.100604>.
127. Dieperink, E., Hauser, P., Dockter, K., Miranda, J., Evenson, M., and Thuras, P. (2021) Reduced alcohol use in patients prescribed pioglitazone, *Am. J. Addict.*, **30**, 570-577, <https://doi.org/10.1111/ajad.13214>.
128. Schwandt, M. L., Diazgranados, N., Umhau, J. C., Kwako, L. E., George, D. T., and Heilig, M. (2020) PPAR $\gamma$  activation by pioglitazone does not suppress cravings for alcohol, and is associated with a risk of myopathy in treatment seeking alcohol dependent patients: a randomized controlled proof of principle study, *Psychopharmacology (Berl)*, **237**, 2367-2380, <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05540-w>.
129. García-Cabrero, R., and Cryan, J. F. (2024) A gut (microbiome) feeling about addiction: interactions with stress and social systems, *Neurobiol. Stress*, **30**, 100629, <https://doi.org/10.1016/j.jnstr.2024.100629>.
130. Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G., Telzerow, A., Anderson, E. E., Brochado, A. R., Fernandez, K. C., Dose, H., Mori, H., Patil, K. R., Bork, P., and Typas, A. (2018) Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria, *Nature*, **555**, 623-628, <https://doi.org/10.1038/nature25979>.
131. Vich Vila, A., Collij, V., Sanna, S., Sinha, T., Immann, F., Bourgonje, A. R., Mujagic, Z., Jonkers, D. M. A. E., Mascllee, A. A. M., Fu, J., Kurilshikov, A., Wijmenga, C., Zhernakova, A., and Weersma, R. K. (2020) Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota, *Nat. Commun.*, **11**, 362, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14177-z>.
132. Galligan, J. J., and Sternini, C. (2017) Insights into the role of opioid receptors in the GI tract: experimental evidence and therapeutic relevance, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **239**, 363-378, [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_116](https://doi.org/10.1007/164_2016_116).

133. Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., and Verbeke, K. (2019) The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 461-478, <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>.
134. Maldonado, R. F., Sá-Correia, I., and Valvano, M. A. (2016) Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection, *FEMS Microbiol. Rev.*, **40**, 480-493, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>.
135. Hofford, R. S., and Kiraly, D. D. (2024) Clinical and preclinical evidence for gut microbiome mechanisms in substance use disorders, *Biol. Psychiatry*, **95**, 329-338, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2023.08.004>.
136. Foster, R. G. (2020) Sleep, circadian rhythms and health, *Interface Focus*, **10**, 20190098, <https://doi.org/10.1098/rsfs.2019.0098>.
137. Adan, A. (2010) Circadian rhythmicity and addiction, *Adicciones*, **22**, 5-9, <https://doi.org/10.20882/adicciones.208>.
138. Valentino, R. J., and Volkow, N. D. (2020) Drugs, sleep, and the addicted brain, *Neuropsychopharmacology*, **45**, 3-5, <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0465-x>.
139. Jia, S., Guo, X., Chen, Z., Li, S., and Liu, X. A. (2022) The roles of the circadian hormone melatonin in drug addiction, *Pharmacol. Res.*, **183**, 106371, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106371>.
140. Ghaderi, A., Banafshe, H. R., Mirhosseini, N., Motmaen, M., Mehrzad, F., Bahmani, F., Aghadavod, E., Mansournia, M. A., Reiter, R. J., Karimi, M. A., and Asemi, Z. (2019) The effects of melatonin supplementation on mental health, metabolic and genetic profiles in patients under methadone maintenance treatment, *Addict. Biol.*, **24**, 754-764, <https://doi.org/10.1111/adb.12650>.
141. Gendy, M. N. S., Lagzdins, D., Schaman, J., and Le Foll, B. (2020) Melatonin for treatment-seeking alcohol use disorder patients with sleeping problems: a randomized clinical pilot trial, *Sci. Rep.*, **10**, 8739, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65166-y>.
142. Mehr, J. B., Bilotti, M. M., and James, M. H. (2021) Orexin (hypocretin) and addiction, *Trends Neurosci.*, **44**, 852-855, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.09.002>.
143. Matzeu, A., and Martin-Fardon, R. (2022) Understanding the role of orexin neuropeptides in drug addiction: preclinical studies and translational value, *Front. Behav. Neurosci.*, **15**, 787595, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.787595>.
144. Косякова Г. П., Тиссен И. Ю., Бычков Е. Р., Лебедев А. А., Шабанов П. Д. (2023) Вовлечение системы орексина в стабилизацию клеточного генома периферической крови и аддиктивное поведение у крыс при хронической алкоголизации, *Наркология*, **22**, 43-51, <https://doi.org/10.25557/1682-8313.2023.03.43-51>.
145. Campbell, E. J., Norman, A., Bonomo, Y., and Lawrence, A. J. (2020) Suvorexant to treat alcohol use disorder and comorbid insomnia: plan for a phase II trial, *Brain Res.*, **1728**, 146597, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146597>.
146. Huhn, A. S., Finan, P. H., Gamaldo, C. E., Hammond, A. S., Umbricht, A., Bergeria, C. L., Strain, E. C., and Dunn, K. E. (2022) Suvorexant ameliorated sleep disturbance, opioid withdrawal, and craving during a buprenorphine taper, *Sci. Transl. Med.*, **14**, eabn8238, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abn8238>.
147. Reid, M. J., Dunn, K. E., Abraham, L., Ellis, J., Hunt, C., Gamaldo, C. E., Coon, W. G., Mun, C. J., Strain, E. C., Smith, M. T., Finan, P. H., and Huhn, A. S. (2024) Suvorexant alters dynamics of the sleep-EEG power spectrum and depressive symptom trajectories during inpatient opioid withdrawal, *Sleep*, **47**, zsae025, <https://doi.org/10.1093/sleep/zsae025>.
148. Rachdaoui, N., and Sarkar, D. K. (2017) Pathophysiology of the effects of alcohol abuse on the endocrine system, *Alcohol Res.*, **38**, 255-276.
149. Famitafreshi, H., and Karimian, M. (2021) Hormones can influence drug addiction – a narrative review, *Bio-medicine (Taipei)*, **11**, 5-10, <https://doi.org/10.37796/2211-8039.1120>.
150. Fischler, P. V., Soyka, M., Seifritz, E., and Mutschler, J. (2022) Off-label and investigational drugs in the treatment of alcohol use disorder: a critical review, *Front. Pharmacol.*, **13**, 927703, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.927703>.
151. Ветлугина Т. П., Прокопьева В. Д., Бохан Н. А. (2023) *Биологические основы адьювантной терапии алкоголизма*, Издательство Томского государственного университета, Томск, 208 с.
152. Du, H., Wei, G. W., and Hou, T. (2024) Multiscale topology in interactomic network: from transcriptome to antiaddiction drug repurposing, *Brief Bioinform.*, **25**, bbae054, <https://doi.org/10.1093/bib/bbae054>.
153. Ucha, M., Roura-Martínez, D., Ambrosio, E., and Higuera-Matas, A. (2020) The role of the mTOR pathway in models of drug-induced reward and the behavioural constituents of addiction, *J. Psychopharmacol.*, **34**, 1176-1199, <https://doi.org/10.1177/0269881120944159>.
154. Dom, G., and Moggi, F. (2015) Toward a New Model of Care: Integrating Mental Health, Substance Use, and Somatic Care, in *Co-Occurring Addictive and Psychiatric Disorders* (Dom, G., and Moggi, F., eds) Springer, Berlin, Heidelberg, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-45375-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-642-45375-5_25).

## INVLOVEMENT OF VISCERAL SYSTEMS IN SUBSTANCE USE DISORDERS: TRANSLATIONAL ASPECTS OF INTERACTION BETWEEN CENTRAL AND PERIPHERAL MECHANISMS

### Review

D. I. Peregud<sup>1,2\*</sup> and N. V. Gulyaeva<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution "V. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Drug Addiction" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119034 Moscow, Russia; e-mail: peregud\_d@yahoo.com

<sup>2</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 117485 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department, 115419 Moscow, Russia

Structural and functional changes in the neuroendocrine, neuromediator, and neuromodulator systems in brain areas related to reward and stress reactivity underlie the development of substance use disorders. Chronic intoxication provokes somatic diseases and aggravates existing pathologies. Thus, substance use disorders and somatic diseases worsen clinics of each other. Elucidation of common biochemical pathways overlapping between comorbidities may be a basis for the development of new effective pharmacotherapy as well as drug repositioning. Here we reviewed the molecular mechanisms underlying integration of visceral systems into the central mechanisms of substance use disorders.

**Keywords:** psychoactive substances, dependence, brain, visceral systems, neuroendocrine mechanisms, neuromediators, neuromodulators, internal diseases

## АЛКОГОЛЬ-ИНДУЦИРОВАННАЯ АКТИВАЦИЯ СИСТЕМЫ ХЕМОКИНОВ И РАЗВИТИЕ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ

### Обзор

© 2024 Е.В. Михалицкая\*, Н.М. Вялова, Н.А. Бохан, С.А. Иванова

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН,  
Научно-исследовательский институт психического здоровья,  
634014 Томск, Россия; электронная почта: Uzen63@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2024

После доработки 27.09.2024

Принята к публикации 30.09.2024

Хемокины являются иммунорегуляторными белками с плейотропными функциями, участвующими в процессах нейромодуляции, нейрогенезе и нейротрансмиссии. Действие хемокинов на ЦНС играет важную роль в модуляции различных состояний, которые могут иметь негативные последствия для функций ЦНС, включая развитие расстройств, связанных с употреблением алкоголя. В данном обзоре мы проанализировали имеющиеся данные литературы, посвященные проблеме участия хемокинов в патогенезе, формировании клинической картины и ремиссии алкогольной зависимости как на животных моделях, так и при исследовании пациентов с алкоголизмом. Представленные данные подтверждают гипотезу о том, что индуцированная алкоголем выработка хемокинов может модулировать процессы хронического нейровоспаления. Таким образом, обобщенные и представленные в настоящем обзоре данные посвящены актуальному направлению исследований в области психиатрии, которые будут востребованы как учеными, так и специалистами клинического направления.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** алкоголизм, зависимость, хемокины, нейровоспаление.

DOI: 10.31857/S0320972524110038 EDN: IKWXDE

### ВВЕДЕНИЕ

Хемокины – это семейство низкомолекулярных белков, которые представляют собой хемоаттрактантные цитокины, основное действие которых заключается в привлечении лейкоцитов в очаги воспаления [1]. Они играют важную роль как в иммунной системе, так и в центральной нервной системе (ЦНС) [2–4]. В ЦНС хемокины наряду с цитокинами участвуют в ряде физиологических процессов, таких как нейровоспаление, изменение активности нейронов, коммуникация между нейронами и глией, нейроэндокринное взаимодействие, нейрогенез и развитие ЦНС [5, 6].

В отношении расстройств, связанных с употреблением психоактивных веществ, все больше публикаций указывает на то, что алкоголь вызы-

вает активацию иммунного ответа с развитием хронического нейровоспаления и изменением хемокиновой регуляции [7].

Подбор, анализ и обобщение накопленного экспериментального материала и данных клинических наблюдений об изменении содержания хемокинов различных семейств при алкоголизации животных, а также при различных паттернах потребления алкоголя и в условиях абstinенции у человека в едином обзоре является актуальным с точки зрения определения дальнейшего вектора развития медико-биологических исследований, а именно поиска биомаркеров начальных этапов нейровоспаления и потенциальных средств фармакологической коррекции состояний в рамках алкогольной зависимости.

Тем не менее за последние годы изучению изменений в системе хемокинов при воздействии алкоголя посвящено не так много работ, и по большей части они включают исследования на животных моделях, а исследованиям людей посвящены единичные работы. В связи с этим

Принятые сокращения: ПНД – постнатальные дни; GSK-3 $\beta$  – киназа гликогенсинтазы 3 $\beta$ ; TLR4 – toll-подобный receptor 4.

\* Адресат для корреспонденции.

настоящий обзор включает данные литературы, опубликованные с января 2004 г. по апрель 2024 г.

Для поиска литературы мы использовали базы данных PubMed и eLIBRARY с использованием ключевых слов «алкоголизм», «алкогольная зависимость» в сочетании с одним из следующих поисковых терминов: «хемокин», «хемокиновый рецептор», «нейровоспаление».

Целью обзора является обобщение и анализ имеющихся данных об изменениях в системе хемокинов при алкогольной интоксикации как на животных моделях, так и при исследованиях пациентов с алкогольной зависимостью. В перспективе эти данные могут быть рассмотрены в будущих клинических и трансляционных исследованиях в качестве патологически значимых биомаркеров или терапевтических мишенией при лечении алкогольной зависимости.

## ХЕМОКИНЫ И ИХ ФУНКЦИИ В ЦНС

Хемокины являются важными компонентами нейроиммунной системы и участвуют в ряде физиологических процессов, таких как нейровоспаление, изменение активности нейронов, взаимодействие между нейронами и глией, нейроэндокринное взаимодействие, нейрогенез и развитие ЦНС [5, 6]. Показано, что провоспалительные хемокины, такие как CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 и CCL13, вызывают хемотаксис провоспалительных клеток к очагам воспаления или повреждения ЦНС. Аналогичным образом хемокин CX3CL1 участвует в стимулировании активации глиальных клеток, секреции провоспалительных цитокинов, экспрессии молекул внутриклеточной адгезии ICAM-1 и рекрутации CD4<sup>+</sup> Т-клеток в ЦНС во время нейровоспалительных процессов [8]. Следовательно, было высказано предположение, что нарушение регуляции передачи сигналов хемокинов и нейровоспаление способствуют нейродегенеративным и психическим заболеваниям [9]. Так, например, изменения в циркуляции хемокинов (таких как CCL2, также называемый моноцитарным хемоатрактанты белком-1 (MCP-1), CCL11 (эотаксин-1), CXCL8, CXCL12) ассоциировались с нейродегенеративными расстройствами [10–13] и психическими расстройствами [8], такими как расстройства, связанные с употреблением кокаина [14], аффективными расстройствами [15–19], генерализованным тревожным расстройством [20], расстройствами личности [20], шизофrenией [21–25], а также коррелировали с тяжестью психопатологических и когнитивных параметров [1]. В частности, CCL11 нарушает функцию гиппокампа при старении, а воздействие CXCL8 при внутриутроб-

ном развитии может привести к нарушениям в раннем периоде развития нервной системы [8].

Хемокины представляют собой группу небольших белков массой 8–12 кДа, имеющих сходную третичную структуру, которая включает 6–10 аминокислот, за которыми следует длинная петля (N-петля), спираль типа 310, 3 β-лист и C-концевая α-спираль [26].

В зависимости от положения остатков цистеина на N-конце молекулы хемокинов подразделяются на четыре подсемейства: C-, CC-, CXC- и CX3C-хемокины [27], при этом существует 27 CC-хемокинов, 17 CXC-хемокинов, 2 хемокина XC и 1 хемокин CX3C [26]. Свои эффекты хемокины опосредуют через трансмембранные рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), которые обозначаются CR1, CCR1–11, CXCR1–5 и CX3CR1 [4, 28, 29]. GPCR передают сигналы через Gα/o-белки, посредством которых они ингибируют аденилатциклазу и снижают активность протеинкиназы А [30], а также через белки Gq, посредством которых они могут повышать внутриклеточные уровни Ca<sup>2+</sup> и протеинкиназы С через путь фосфолипазы С [31–33].

Хемокины и их рецепторы широко экспрессируются на клетках сосудистого русла, гладкомышечных клетках, а также различных типах лейкоцитов [34]. Хемокины могут достигать головного мозга, проникая через гематоэнцефалический барьер [35]. В то же время они могут высвобождаться нейронами и глиальными клетками непосредственно в головном мозге в ответ на физиологические или патологические состояния [36].

Регуляция экспрессии хемокинов и их рецепторов включает сложное и недостаточно изученное взаимодействие как между собой, так и с другими системами. Так, например, при повреждении или воспалении ЦНС включаются механизмы увеличения экспрессии хемокинов лимфоцитами спинномозговой жидкости и Т-клетками, которые мигрируют через гематоэнцефалический барьер, а также глиальными клетками головного мозга, особенно астроцитами [37]. При этом в ЦНС отдельные хемокины всех четырех семейств выполняют различные, но и перекрывающиеся функции.

**C-хемокины.** XC-семейство включает всего 2 очень похожих между собой хемокина XCL1 и XCL2, также известных как лимфотактин α и β соответственно. Известно, что, действуя через уникальный receptor XCR1, XCL1 может вызывать хемотаксис лимфоцитов, но не моноцитов или нейтрофилов [38].

**CC-хемокины.** Хемокины данного семейства оказывают провоспалительное действие посредством хемотаксиса макрофагов к очагу воспаления или поврежденным клеткам ЦНС, а также участвуют в регуляции миграции нервных

стволовых клеток/клеток-предшественников [39]. Моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (CCL2/MCP-1) – первый обнаруженный и наиболее изученный СС-хемокин человека. Он является одним из ключевых хемокинов, которые регулируют рекрутование и активацию моноцитов и микроглии. Биологическая функция CCL2 опосредуется через связанный с G-белком рецептор CCR2. Помимо CCL2, CCR2 связывает еще 4 провоспалительных хемокина: CCL7, CCL8, CCL12 и CCL13 [40].

CCL2, как и его рецептор типа 2 (CCR2), экспрессируются в нейронах ЦНС и культивируемых линиях нейрональных клеток [41–43]. Так, CCL2 конститутивно экспрессируется в нейронах отдельных областей мозга крыс, таких как кора головного мозга, гиппокамп, гипоталамус, черная субстанция, мозжечок и спинной мозг [44, 45]. Таким образом, передача сигналов CCL2/CCR2 может регулировать функции нейронов.

В дополнение к своей роли в иммунной системе передача сигналов CCL2/CCR2 участвует в развитии различных нейровоспалительных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [46], рассеянный склероз [47], болезнь Паркинсона [40] и ишемическое повреждение головного мозга [48]. И хотя на некоторых исследованиях показано участие CCL2 в повреждении головного мозга, вызванном алкоголем [40], его роль в патогенезе алкогольной зависимости на сегодняшний день до конца остается не ясна.

Эотаксин-1 (CCL11), также известный как хемотактический белок эозинофилов, – еще один хемокин СС-семейства. После связывания с рецепторами CCR3, экспрессируемыми на клеточной поверхности эозинофилов, CCL11 активирует ряд внутриклеточных сигнальных каскадов, что приводит к рекрутованию эозинофилов в участки воспаления во время аллергических реакций, которые тщательно исследуются при астме, аллергическом рините и других состояниях, связанных с эозинофилами. Так, систематический обзор литературы, включающий 30 исследований, показал, что концентрации CCL11 в крови и мокроте постоянно повышались у пациентов с астмой, что отрицательно коррелировало с функцией легких. Это указывает на потенциальное использование CCL11 в качестве биомаркера для диагностики и оценки тяжести астмы и контроля над ней [49]. Помимо эозинофилов, хемокиновый рецептор CCR3 экспрессируется на базофилах, тучных клетках и Th2-лимфоцитах, причем последние участвуют в выработке так называемых Th2-цитокинов (интерлейкинов: IL-4, IL-5, IL-13), это свидетельствует о том, что CCL11 также участвует в направлении иммунного ответа в сторону Th2-профиля [1].

В ЦНС CCL11 продуцируется эпителиальными клетками сосудистого сплетения, перицитами, астроцитами и микроглией под действием воспалительных стимулов [50]. Кроме того, CCL11 может попадать в ЦНС, преодолевая гематоэнцефалический барьер [51]. В одном исследовании показано, что CCL11 обратимо ингибитирует пролиферацию нервных клеток-предшественников *in vitro* в изолированных клетках, нейросферах и в культурах срезов гиппокампа, не влияя на их способность образовывать как нейроны, так и астроциты [52]. Также продемонстрировано, что, хотя прямого воздействия CCL11 на нейроны не обнаружено, этот хемокин был способен стимулировать миграцию и активацию микроглии с последующей выработкой активных форм кислорода, что усиливало вызванную глутаматом гибель нейронов [53]. Рядом работ показана ассоциация CCL11 с болезнью Альцгеймера [10, 13], с детской и подростковой психопатологией, включая расстройства аутистического спектра [54, 55], большой депрессией [17], биполярным расстройством [56], дистимией [57], обсессивно-компульсивным расстройством [58], шизофренией [22, 25] и расстройствами, связанными с употреблением психоактивных веществ [59, 60], а также ассоциации повышенного уровня циркулирующего CCL11-хемокина с прогрессирующими клиническим ухудшением, наблюдаемым при данных расстройствах [61]. Таким образом, CCL11 связан с рядом психических и нейродегенеративных расстройств, а также с их клинической тяжестью.

**CXC-хемокины.** Основная роль хемокинов в регуляции нейровоспаления заключается в регуляции хемотаксиса нейтрофилов. Это основная функция хемокинов CXCL1–CXCL8, лигандов CXCR2, которые в высокой степени экспрессируются на нейтрофилах. Общий эффект этих хемокинов на улучшение или ухудшение выживаемости и восстановления нейронов при воспалительных состояниях остается неясным. Так, существуют данные о том, что большинство мышей, нокаутных по хемокинам CXC-семейства или рецепторам хемокинов, жизнеспособны и характеризуются отсутствием нарушений в функционировании нервной ткани [39].

Хемокины CXCL9–CXCL11, напротив, оказывают более явное провоспалительное действие посредством CXCR3-опосредованного хемотаксиса естественных клеток-киллеров Th1 и связанных с ними макрофагов. Так, показано, что блокада CXCR3 уменьшает инфильтрацию Th1 и макрофагов, а также повреждение тканей. Более того, продемонстрировано усиление нейрогенеза гиппокампа у взрослых мышей с нокаутом хемокинового рецептора CXCR5<sup>-/-</sup> CXCL13-лиганда, а у мышей с нокаутом CXCL12 и его рецептора CXCR4 наблюдается изменение структуры мозжечка [8].

**Хемокины CX3C.** Хемокин CX3CL1, также известный как фракталкин, высоко экспрессируется в зрелых нейронах и астроцитах, а его рецептор CX3CR1 в основном экспрессируется на клетках микроглии, но, кроме того, и на зрелых нейронах [62, 63]. Показано, что CX3CL1 оказывает множественное действие на ЦНС: с одной стороны, он предотвращает избыточную активацию микроглии при отсутствии травмы, при этом способствуя активации микроглии и астроцитов во время нейровоспалительных процессов, включая секрецию провоспалительных цитокинов, экспрессию ICAM-1 и рекрутование CD4<sup>+</sup> Т-клеток в ЦНС [64–66].

Как растворимая, так и мембраносвязанная формы CX3CL1 ослабляют активацию микроглии и индуцированное липополисахаридами увеличение провоспалительных цитокинов в первичных культурах клеток микроглии и нейронов.

Таким образом, хотя показано, что ряд хемокинов оказывает значительное влияние на регуляцию нейровоспаления, для большинства хемокинов еще предстоит изучить, имеют ли их функции такое же отношение к регуляции хронического воспаления, которое, как предполагается, является одним из механизмов патогенеза ряда психических расстройств.

## ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ХЕМОКИНОВ НА ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЯХ РАССТРОЙСТВ, СВЯЗАННЫХ С УПОТРЕБЛЕНИЕМ АЛКОГОЛЯ

**С-хемокины.** Исследования данного семейства хемокинов и их рецепторов очень немногочисленны, в том числе и на животных моделях. Выявлено, что экспрессия рецептора C3AR1 индуцируется этанолом, что приводит к изменению фагоцитоза микроглии [67]. В более ранних исследованиях показано, что рецептор C5AR1 участвует в воспалении, вызванном алкоголем [68, 69].

Потенциальные механизмы, с помощью которых нейровоспаление, вызванное употреблением этанола, может способствовать раннему началу нейропатологии, отражены в результатах исследования Holloway et al. [70]. Используя постнатальную модель фетального алкогольного синдрома на мышах, эквивалентную третьему триместру беременности у человека, была проведена оценка транскриптомных изменений, вызванных воздействием этанола в дозе 4 г/кг веса в день, в мозжечке на 5-й и 8-й постнатальные дни (ПНД), спустя 1 или 2 дня употребления этанола, с целью выявления изменений на ранних стадиях возникновения и развития данного синдрома. При определении возможных механизмов, с помощью которых этанол индуцирует раннюю иммунную

активацию, Holloway et al. [70] идентифицировали иммунно-связанные транскрипты, экспрессия которых была сильно изменена этанолом. На 5-й и 8-й ПНД транскрипты с повышенной регуляцией включали рецепторы C5AR1 и C3AR1, скавенджер-рецептор макрофагов MSR1, хемокин CCL3 (воспалительный белок макрофагов 1α, MIP-1α) и CD14.

**С-хемокины.** Большее количество исследований посвящено изучению хемокина CCL2, представителя данного семейства. Выявлено, что этанол индуцирует экспрессию CCL2 на животных моделях расстройств, связанных с употреблением алкоголя [70], а генетические исследования на животных показывают, что повышенная передача сигналов CCL2 сопровождается увеличением потребления алкоголя [71].

Передача сигналов CCL2/CCR2 играет важную роль при алкогольной невропатологии как в ЦНС взрослого организма, так и в развивающейся ЦНС. Исследования влияния этанола на развивающийся спинной мозг на мышной модели, эквивалентной третьему триместру беременности [72], установило, что воздействие этанола в дозе 2,5 г/кг веса в день в процессе развития вызвало необратимую потерю нейронов спинного мозга, а передача сигналов CCR2 сыграла важную роль в нейротоксичности этанола. Этanol вызывал апоптоз и нейродегенерацию в нейронах дорсального рога у мышей ранних дней постнатального периода, что сопровождалось активацией глии, инфильтрацией макрофагов и увеличением экспрессии CCR2. Вызванная этанолом гибель нейронов во время развития привела к необратимой потере нейронов спинного мозга у взрослых мышей. Исследование выявило, что этанол стимулировал стресс эндоплазматического ретикулума и окислительный стресс, а также активировал пути киназы гликогенсинтазы 3β (GSK-3β) и N-концевой киназы c-Jun (JNK). Нокаут же CCL2 или CCR2 сделал мышей устойчивыми к индуцированному этанолом апоптозу, стрессу эндоплазматического ретикулума, активации глии и активации GSK-3β и JNK. Нокаут CCR2 обеспечивал гораздо лучшую защиту от повреждения спинного мозга, вызванного этанолом. Таким образом, воздействие этанола на эмбриональное развитие мышей вызывало необратимую потерю нейронов спинного мозга, а передача сигналов CCR2 играла важную роль в нейротоксичности этанола [72].

В исследовании Chang et al. [73] беременным крысам на 10–15 день эмбрионального развития (во время пика нейрогенеза) перорально вводили этанол в умеренной дозе (2 г/кг веса в день) или периферически вводили антагонист CCL2 или CCR2, чтобы проверить роль системы CCL2/CCR2 в механизмах действия этанола. Продемонстрировано, что этанол, вводимый матери, увеличивает

плотность клеток радиальной глии у эмбрионов, одновременно стимулируя систему CCL2/CCR2, и эти эффекты имитируются введением матери CCL2 и блокируются антагонистом CCR2. Стимулируя колокализацию CCL2 с радиальной глией и нейронами, но не с микроглией, этанол увеличивает количество меланин-концентрирующего гормона (МCH) нейронов вблизи клеток радиальной глии и устанавливает контакт вдоль их отростков, выступающих в латеральном гипоталамусе. Дальнейшие тесты выявили, что система CCL2/CCR2 в нейроэпителии является основным источником полового диморфизма этанола. Эти результаты дают новые доказательства того, как воспалительный хемокиновый путь функционирует в нейропрогениторных клетках, опосредуя длительное стимулирующее воздействие этанола на пептидные нейроны, связанные с алкогольным поведением подростков [73].

Несколько исследований показали, что передача сигналов CCL2/CCR2 также участвует в поведении, связанном с употреблением алкоголя. Так, делеция CCR2 и CCL2 (у мышей-самок) снижала предпочтение этанола в условиях свободного выбора между раствором этанола и водой, а введение алкоголя вызывало более сильное условное отвращение к вкусу у мышей  $CCR2^{-/-}$  и  $CCL2^{-/-}$  [68]. Исследование Holloway et al. [74] на мышах показало, что алкоголь активирует передачу сигналов toll-подобного рецептора TLR4, что приводит к индукции провоспалительных цитокинов и хемокинов в ЦНС. Оценка экспрессии мРНК с помощью qRT-PCR показала, что этанол увеличивает уровни цитокинов IL-1 $\beta$  и фактора некроза опухоли TNF- $\alpha$ , хемокина CCL2, циклоксигеназы COX2, а также белков FosB и JunB в мозжечке у мышей дикого типа и мышей с дефицитом адаптера TLR4 (TRIF). Хотя точно не ясно, как CCL2 регулирует алкогольное поведение, возможное объяснение состоит в том, что CCL2 активирует дофаминовую систему [75]. В совокупности CCL2/CCR2 могут участвовать в вызванном алкоголем повреждении головного мозга посредством регуляции активации микроглии и нейротрансмиссии [40]. В исследовании June et al. [76] сообщается, что крысы линии P, предпочитающие алкоголь, имеют врожденно повышенные уровни TLR4 и хемокина CCL2, которые локализуются в нейронах центрального ядра миндалевидного тела (CeA) и вентральной тегментальной области (VTA). Чтобы изучить потенциальную роль сигнала TLR4/CCL2, использовались векторы (ампликоны) вируса простого герпеса (HSV), которые сохраняют нейротропизм *in vivo*. Введение ампликонов миРНК TLR4 или CCL2 в CeA или VTA крыс линии P ингибирировало экспрессию генов-мишенией и снижало зависимость от алкоголя.

Аналогичным образом доставленный ампликон для скремблированной миРНК не ингибирировал экспрессию TLR4 или CCL2 и не уменьшал чрезмерное употребление алкоголя, идентифицируя нейрональный сигнал TLR4/CCL2, который регулирует начало добровольного самостоятельного употребления алкоголя. Этот сигнал поддерживался во время употребления алкоголя за счет повышенной экспрессии кортикотропин-рилизинг-фактора и его обратной регуляции экспрессии TLR4, что, вероятно, способствовало переходу к алкогольной зависимости [76].

В исследовании Zhang et al. [77] показано, что этанол увеличивает экспрессию CCL2, но не CCR2, в мозге мышей на 4-й ПНД и в клетках микроглии (SIM-A9). Ингибитор синтеза CCL2 биндарит и антагонист CCR2 RS504393 ингибировали индуцированный этанолом нейроапоптоз, активацию микроглии и экспрессию провоспалительных факторов. Дальнейшие исследования с использованием мышей с нокаутом гена подтвердили, что дефицит CCL2 или CCR2 делает мышей более устойчивыми к нейродегенерации, вызванной этанолом. Более того, этанол и CCL2 вызывали большую гибель нейронов в совместных культурах нейронов/микроглии, чем в культуре нейронов в отдельности. Блокирование передачи сигналов CCL2/CCR2 защищало первичные кортикальные и мозжечковые нейроны от гибели, вызванной этанолом, в совместных культурах нейронов и микроглии. Оказалось, что рецептор TLR4, участвующий во врожденном иммунитете, и киназа GSK-3 $\beta$  опосредуют индуцированную этанолом активацию микроглии и провоспалительных цитокинов в культивируемых клетках микроглии, и существует значительное взаимодействие между передачей сигналов TLR4, GSK-3 $\beta$  и CCL2/CCR2 в ответ на воздействие этанола [77]. Также с помощью совместной культуры нейронов и микроглии Yang et al. [78] показали, что нейротоксичность, индуцированная CCL2, требует присутствия микроглии и что экзогенный CCL2 способен активировать и стимулировать микроглию для выработки цитокинов. Данное исследование показало, что нейтрализующие CCL2 антитела ингибируют CCL2-индуцированную активацию микроглии и гибель нейронов в культуре и таламусе.

Уровни транскрипта CCL2 повышаются под действием этанола. CCL2 и CCL3, гены-мишени транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, индуцируются этанолом и являются ключевыми медиаторами воспаления ЦНС и алкогольного поведения [68, 69]. Ранее было выявлено, что этанол индуцирует экспрессию CCL2 и на животных моделях фетального алкогольного синдрома [79], а также на взрослых моделях расстройств, связанных с употреблением алкоголя [80].

Воздействие алкоголя активирует микроглию, увеличивает экспрессию CCL2 и других провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$ , и вызывает гибель нейронов у крыс [81–83]. Qin et al. [84] обнаружили, что при введении в дозе 5 г/кг веса в день *per os* этанол потенцировал индуцированное липополисахаридами увеличение CCL2 и активацию микроглии в мозге взрослых мышей. Было высказано предположение, что CCL2 снижает «пороговую чувствительность» микроглии в качестве «праймирующего» стимула и усиливает синтез провоспалительных цитокинов в ответ на последующее воздействие [85].

В эксперименте Valenta et al. [86], заключавшемся в увеличении передачи сигналов CCL2 путем прямого введения его в мозг, наблюдалась корреляция между дозой CCL2 и потреблением крысами Лонг-Эванса подслащенного раствора этанола в течение первых 4 недель (во время работы помпы) и в течение 8-недельного эксперимента. Животные, получавшие самую высокую дозу CCL2 (2 мкг/день), потребляли больше всего этанола в течение 3–8 недель. Данное исследование доказывает, что нейроиммунная передача сигналов может напрямую увеличивать хроническое добровольное потребление этанола и что это увеличение сохраняется после введения цитокина. Вызванное этанолом увеличение CCL2 или же увеличение CCL2 из-за различных других нейроиммунных механизмов может дополнительно способствовать потреблению этанола. Продолжение исследований этого механизма, особенно с использованием моделей алкогольной зависимости, поможет определить, имеет ли воздействие на передачу сигналов CCL2 терапевтический потенциал при лечении расстройств, связанных с употреблением алкоголя. Исследование Bray et al. [87] связывает повышенные уровни экспрессии CCL2 в астроцитах трансгенных мышей с увеличением потребления алкоголя в тестах на употребление алкоголя, а также на пространственное и ассоциативное обучение, тем самым подтверждая гипотезу о том, что повышенные уровни CCL2 вызывают нейроадаптивные изменения, которые изменяют действие алкоголя на ЦНС.

Lowe et al. [88] в поисках потенциального терапевтического подхода для лечения нейровоспаления, связанного с алкоголем, предположили, что хроническое употребление алкоголя приводит к инфильтрации периферических иммунных клеток в ЦНС. Поскольку хемотаксис через сигнальную ось CCL2/CCR2 имеет решающее значение для рекрутования макрофагов на перipherии и в центре, также было предположено, что блокада передачи сигналов CCL2 с помощью двойного ингибитора CCR2/5 ценикривирока предотвратит индуцированную алкоголем инфильтрацию пери-

ферических макрофагов в ЦНС и изменит нейровоспалительное состояние головного мозга после хронического употребления алкоголя. В результате исследования, проведенного на самках мышей, было показано, что хроническое употребление алкоголя вызывало активацию микроглии и инфильтрацию периферических макрофагов в ЦНС, особенно в гиппокампе. Ценикривирок устранил вызванное этанолом рекрутование периферических макрофагов и частично обращал вспять активацию микроглии. Кроме того, хроническое употребление алкоголя повышало экспрессию провоспалительных маркеров в различных областях мозга, включая кору, гиппокамп и мозжечок. Ингибирование CCR2/5 снижало опосредованную алкоголем экспрессию маркеров воспаления, что рассматривается авторами как потенциальный терапевтический подход для лечения нейровоспаления, связанного с алкоголем. В другом своем исследовании Lowe et al. [89] выявили, что употребление алкоголя значительно увеличивало экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$ , IL-17 и IL-23, хемокина CCL2 и цитокинового медиатора Hmgb1 в головном мозге и кишечнике. Так, снижение бактериальной нагрузки кишечника в результате применения антибиотиков ослабило экспрессию всех провоспалительных цитокинов как в мозге, так и в тонком кишечнике. Употребление алкоголя приводило к активации микроглии и морфологическим изменениям в коре и гиппокампе, характеризующимся реактивным фенотипом. Эти изменения, вызванные алкоголем, были скорректированы после того как назначенные антибиотики ослабили микробиом кишечника. Неожиданно употребление антибиотиков увеличило экспрессию мРНК некоторых компонентов воспаления как в мозге, так и в кишечнике [89].

Данные, полученные Huang et al. [90] на людях и мышах, показывают, что хроническое употребление алкоголя связано с повышением уровня хемокина CCL11. Уровни CCL11 коррелируют с тяжестью алкогольной зависимости и могут быть ее потенциальным индикатором. Снижение CCL11 после прекращения употребления алкоголя связано с облегчением клинических симптомов. Авторы данного исследования заключают, что CCL11 участвует в нейробиологических механизмах, лежащих в основе алкогольной зависимости. Также показано, что хроническое и чрезмерное введение этанола индуцировало экспрессию воспалительных молекул (CCL2) у взрослых мышей [83].

Исследование специфических зависящих от пола воздействий алкоголя на микроглию в развивающемся гиппокампе крыс проведено группой исследователей при моделировании острого воздействия алкоголя в течение одного дня (2 корм-

ления с интервалом в 2 часа с общей дозой этанола 5,25 г/кг) на 4-й ПНД [91]. Нейроиммунный ответ оценивали путем измерения количества микроглии и экспрессии генов хемокинов на 5-й и 8-й ПНД. Во многих субрегионах гиппокампа на 5-й ПНД детеныши мужского пола имели более высокое количество микроглии по сравнению с самками, но эта разница исчезала на 8-й день, если только они не подвергались воздействию алкоголя. После воздействия алкоголя содержание хемокинового лиганда мотива 4 С-С (CCL4) было значительно увеличено у самок на 5-й и 8-й ПНД. Результаты демонстрируют четкую разницу между нейроиммунным ответом на воздействие этанола у самок и самцов [91].

Влияние алкоголя на активацию иммунитета у возрастных животных широко не исследовалось. Хотя злоупотребление алкоголем оказывает существенное влияние на здоровье пожилого населения. Kane et al. [92] сравнили влияние этанола на экспрессию хемокинов и цитокинов в гиппокампе, мозжечке и коре головного мозга возрастных мышей линии C57BL/6. Мышам вводили через зонд 6 г/кг этанола в течение 10 дней, ткани собирали через 1 день после обработки. Этanol избирательно повышал уровни мРНК CCL2 в гиппокампе и мозжечке, но не в коре возрастных мышей по сравнению с контрольными животными. В этой парадигме этанол не влиял на уровни мРНК цитокинов IL-6 или TNF- $\alpha$  ни в одной из исследуемых областей мозга у возрастных животных. В совокупности эти данные указывают на специфичную для региона восприимчивость к регуляции этанолом нейровоспалительных молекул и молекул, связанных с зависимостью, у возрастных мышей. Эти исследования, как заключают авторы, могут иметь большое значение в отношении невропатологии, вызванной алкоголем, и алкогольной зависимости у пожилых людей [92].

Основным маркером нейровоспаления является полученный из микроглии CCL2 в животных моделях расстройства, связанного с употреблением алкоголя, при котором этанол вводится принудительно. Однако имеются противоречивые данные о том, повышается ли уровень CCL2 при добровольном приеме этанола, что ставит под сомнение его ключевую роль в стимулировании мотивации к потреблению этанола. В исследовании Berríos-Cárcamo et al. [93] изучены уровни мРНК CCL2 в областях, связанных с мотивацией к потреблению алкоголя, в частности, в префронтальной коре, гиппокампе и полосатом теле, а также в мозжечке, области мозга очень чувствительной к этанолу, у мышей линии C57BL/6, которые периодически в течение двух месяцев добровольно употребляли этанол. Обнаружено значительное повышение уровня мРНК CCL2 в мозжечке

мышей, употреблявших этанол, по сравнению с контролем, в то время как в префронтальной коре, гиппокампе, полосатом теле и в микроглии, выделенной из гиппокампа и полосатого тела, существенных изменений не наблюдалось. Эти результаты свидетельствуют о том, что для интенсивного добровольного потребления этанола мышами C57BL/6 не требуется возникновения нейровоспаления в областях, связанных с мотивацией. Кроме того, восприимчивость мозжечка к нейровоспалению может быть причиной дегенерации мозжечка, которая возникает у людей после хронического употребления этанола [93].

**CXC-хемокины.** В недавнем исследовании на мышах выявлено, что сверхэкспрессия CXCL14, оцененная с помощью qPCR и ELISA, усиливает алкогольное повреждение печени, о чем свидетельствуют измерения уровней АЛТ (аланинаминотрансферазы) и АСТ (аспартатаминотрансферазы) в плазме, а также триглицеридов в печени [94]. Кроме того, в данном исследовании было обнаружено, что совместная экспрессия BRG1 (Brahma-related gene 1) и CXCL14 положительно коррелирует с инфильтрацией нейтрофилов. Исследование Kusumanchi et al. [95] определило новую роль гена FKBP5 (кодирует FK506-связывающий белок 51) в патогенезе алкогольного заболевания печени. Потеря FKBP5 облегчает вызванное алкоголем повреждение печени через передачу сигналов CXCL1, что указывает на его потенциальную роль в качестве мишени для лечения алкогольного повреждения печени.

Вызванные алкоголем изменения в циркулирующих хемокинах также были изучены на доклинических моделях употребления алкоголя – на крысах-самцах линии Wistar [59]. Крысы, подвергшиеся повторному введению этанола (3 г/кг, через зонд), имели более низкие концентрации CXCL12 и более высокие концентрации CCL11 по сравнению с крысами контрольной группы. Кроме того, повышенные концентрации CCL11 у крыс, подвергшихся воздействию этанола, были усилены предшествующим воздействием стресса. Соответственно, острое воздействие этанола вызывало изменения в CXCL12 и CCL11, так же как и повторное воздействие. Другое исследование показало, что умеренное пренатальное воздействие этанола стимулирует хемокиновую систему CXCL12/CXCR4 в клетках-предшественниках радиальной глии в гипоталамическом нейроэпителии и пептидных нейронах в латеральном гипоталамусе эмбриона и постнатального потомства у крыс [96].

В исследовании, проведенном на взрослых самцах яванских макак, оценивались уровни белков плазмы крови в течение 32-месячного экспериментального протокола: на исходном уровне,

во время индукции воды и добровольного приема этанола (4% (*w/v*) в воде), через 4 месяца и через 12 месяцев одновременного 22-часового ежедневного доступа к этанолу и воде [97]. Было показано, что хроническое потребление этанола у приматов приводит к аллостатическому состоянию физиологического компромисса в отношении циркулирующих белков, связанных с иммунитетом и стрессом, в путях, связанных с NF-кВ и STAT/JAK, что коррелирует с измененной эндокринной активностью.

На другой животной модели, рыбках *Danio rerio*, изучено участие хемокиновой системы CXCL2a/CXCR4b в опосредовании стимулирующего эффекта воздействия этанола на плотность нейронов в гипоталамусе эмбрионов. Полученные результаты дают четкое свидетельство того, что стимулирующие эффекты этанола в малых и умеренных дозах на количество нейронов гипоталамуса на ранних стадиях развития опосредованы частично усилением транскрипции и внутриклеточной активацией хемокиновой системы CXCL2a/CXCR4b, вероятно, из-за аутокринной передачи сигналов CXCL2a на рецептор CXCR4b на нейронах [98].

**CX3C-хемокины.** В исследовании García-Marchena et al. [59] не выявлено существенных различий в концентрациях хемокина CX3CL1 в плазме крыс-самцов линии Wistar между группой, подвергшейся повторному введению этанола (3 г/кг, через зонд), и контрольной группой крыс.

Исследование гендерных различий в профилях воспалительных хемокинов, вызванных чрезмерным употреблением этанола в подростковом возрасте, показало, что у самок мышей-подростков дикого типа периодическое введение этанола повышало уровни хемокинов CCL2, CCL3 и CX3CL1 в префронтальной коре головного мозга и в сыворотке крови (CCL2 и CCL3), но значимые различия в уровнях CX3CL1 в префронтальной коре наблюдались только у мышей-самцов. У мышей, получавших этанол, самцов или самок с генетическим нокаутом *TLR4*, не было отмечено никаких изменений в уровнях хемокинов в сыворотке крови или префронтальной коре головного мозга. Данные результаты показали, что самки более уязвимы к воспалительным эффектам чрезмерного употребления этанола, чем самцы, и позволили предположить, что *TLR4* является важной мишенью индуцированного этанолом воспаления и нейровоспаления в подростковом возрасте [99].

В исследовании Pascual et al. [100] показано, что хроническое употребление этанола увеличивает уровень хемокина CX3CL1 у мышей дикого типа в полосатом теле и в сыворотке. Через 24 часа после отмены этанола сохранялся высокий уровень CX3CL1 в полосатом теле. Авторы

связывают это с увеличением тревожного поведения, оцененным с помощью тестов «темная/светлая камера» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Примечательно, что мыши, у которых отсутствуют рецепторы *TLR4* или *TLR2*, в значительной степени защищены от индуцированного этанолом высвобождения хемокинов, а также от поведенческих эффектов во время воздержания от алкоголя. Эти данные подтверждают роль *TLR4*- и *TLR2*-ответов в нейровоспалении и в связанных с тревогой поведенческих эффектах во время депривации этанола, а также доказывают, что хемокины могут являться биомаркерами индуцированного этанолом нейроиммунного ответа [100].

Таким образом, результаты представленных исследований на животных моделях свидетельствуют о вовлеченностии хемокинов в механизмы расстройств, связанных с употреблением алкоголя. Наибольшее число исследований затрагивает хемокин CCL2 и его рецептор. Показано, что передача сигналов посредством CCR2 играет важную роль в нейротоксичности этанола. Результаты представленных работ подтверждают общую нейроиммунную гипотезу зависимости. Индуцированная алкоголем выработка хемокинов может модулировать эффекты алкоголя на регуляцию хронического воспаления.

## ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ХЕМОКИНОВ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ АЛКОГОЛЯ

В литературе представлено достаточно данных, подтверждающих участие ряда хемокинов в патогенезе алкогольной зависимости. При этом основная часть работ посвящена исследованиям на животных моделях, и отдельные исследования – на биоматериале пациентов с алкогольной зависимостью.

Показано, что алкоголь может стимулировать воспалительные пути, активируя микроглию в ЦНС как во взрослом, так и в развивающемся мозге [101]. Исследования последних лет свидетельствуют о том, что ключевыми медиаторами индуцированного этанолом нейроиммунного ответа и нейроадаптивных изменений в ЦНС, наряду с такими цитокинами, как интерферон IFN-2α [102], TNF-α, интерлейкинами IL-1β, IL-6, IL-10, являются хемокины [103].

Так, исследование постмортального материала головного мозга 5 человек с алкоголизмом показало, что у пациентов с алкогольной зависимостью увеличена концентрация CCL2 вентральной покрышке, черной субстанции, гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга по сравнению с контрольной группой [69].

Еще одно исследование постмортального материала головного мозга 10 мужчин с алкогольной зависимостью [104] показало увеличение экспрессии хемокинов CCL8, CCL7, CCL13, CCL5, CXCL8, CXCL12 и их рецепторов CCR1 и CCR2, CXCR3 и CXCR4 в орбитофронтальной коре пациентов по сравнению с контрольной группой. Хотя размер выборок в этих двух исследованиях достаточно мал, продемонстрированные данные позволяют предположить, что индуцированное этанолом повышение экспрессии хемокинов и их рецепторов в головном мозге может модулировать эффекты воздействия/отмены алкоголя на синаптическую функцию, а также способствовать развитию алкогольной зависимости [105]. В исследовании ряда хемокинов (CXCL8 и -12, CX3CL1, CCL2, -3 и -11) García-Marchena et al. [59] продемонстрировали статистически значимую ассоциацию всего нескольких хемокинов с алкогольной зависимостью: концентрации хемокинов CXCL12 и CX3CL1 в плазме были ниже у пациентов по сравнению с контрольной группой.

В этой же работе была затронута тема гендерных различий в иммунном ответе на чрезмерное употребление алкоголя. Так, концентрация CCL11 в плазме была сильно ниже у женщин с алкоголизмом, чем у мужчин [59]. Результаты работы Pascual et al. [99], проведенной на подростках (на людях и мышах), также показали, что женщины более уязвимы к воспалительным эффектам чрезмерного употребления этанола, чем мужчины: при эквивалентном уровне алкоголя в крови у женщин-подростков уровень цитокинов и хемокинов (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, CX3CL1, CCL2 и CCL3) в плазме крови оказался выше, чем у подростков-мужчин после острой алкогольной интоксикации. Таким образом, хотя в воздействии этанола на мозг подростков могут существовать структурные и функциональные гендерные различия [106], новые данные свидетельствуют о половых различиях также и в иммунных, и нейроиммунных реакциях, индуцируемых этанолом [107].

Исследование плазмы крови 151 пациента с алкогольной зависимостью показало, что уровни CCL11 были выше у пациентов, чем в контрольной группе, и снижались во время детоксикации, а также, что уровни CCL11 положительно коррелировали с тяжестью алкоголизма, оцененной по шкале SADQ (The Severity of Alcohol Dependence Questionnaire) [90]. В другом исследовании сыворотки крови мужчин с чрезмерным употреблением алкоголя, наряду с IL-6 и IFN- $\gamma$ , наблюдались более высокие уровни CCL2, а также более низкие уровни трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$ 1 по сравнению с контрольной группой [108]. Кроме того, показана связь концентрации CCL2 в плазме

крови пациентов с клинической ремиссией: увеличение количества дней с момента последнего употребления алкоголя связано с более низкой концентрацией CCL2 [109], а более высокие уровни CCL2 ассоциировались с более сильной тягой к алкоголю [110], с плохим сном, более высокими показателями тревоги и депрессии, а также с большим количеством дней употребления алкоголя, средним количеством выпитого алкоголя в день, количеством дней чрезмерного употребления алкоголя и общим количеством выпитого алкоголя [111].

При исследовании спинномозговой жидкости 28 людей с алкогольной зависимостью и 13 здоровых добровольцев исследователями выявлено, что концентрация CCL2 у пациентов была значительно выше как на 4-й, так и на 25-й день после детоксикации, а также, что она положительно коррелировала с ферментами печени: ГГТ (гамма-глютамилтранспептидазой) и АСТ [112]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что CCL2-обусловленное нейровоспаление может быть связано с зависимым от алкоголя воспалением печени.

В связи с этим становится обоснованным, что в случае расстройств, связанных с употреблением алкоголя, хемокины чаще всего оцениваются исключительно в контексте алкогольного гепатита [113–115]. И более того, в настоящее время, наряду с ингибиторами IL-1 и панкаспазами, ингибиторы CCL2 рассматриваются как новые терапевтические препараты при лечении алкогольного гепатита [116].

Так, в клетках печени у пациентов с алкогольным гепатитом наблюдалась повышенная экспрессия хемокинов членов подсемейств CXС (CXCL8, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL10 и CXCL4) и CC (CCL2, но не CCL5) по сравнению с контролем [115]. Кроме того, более высокие уровни экспрессии CXCL8, CXCL5, CXCL2 и CXCL6 были связаны с худшим прогнозом заболевания [115]. В другом исследовании, проведенном с помощью метода РНК-секвенирования, также показано, что в печени пациентов с алкогольным гепатитом активность хемокинов семейства CXCL (CXCL1, CXCL6 и CXCL8) повышена [117]. Анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов (WGCNA) показал, что отдельные члены семейств CXС-хемокинов (CXCL8) и CC-хемокинов (CCL20) были в высокой степени связаны с алкогольным гепатитом, по сравнению с контрольной группой, но не связаны с заболеваниями печени другой этиологии [118].

В совокупности эти результаты предполагают потенциальные механизмы, с помощью которых нейровоспаление, вызванное этанолом, может способствовать развитию нейропатологии как в развивающемся, так и во взрослом организме.



**Рис. 1.** Вклад хемокинов в развитие нейровоспаления при интоксикации алкоголем. Этанол (EtOH) своим действием на клетки печени и ЦНС приводит к увеличению (↑) экспрессии одних хемокинов и их рецепторов (CCL2, 11, C3AR1, CXCL1, -2, -4, -5, -6, -8, -10) и снижению (↓) экспрессии других (CXCL12, CX3CL1). Хемокины, в свою очередь, взаимодействуя со своими GPCR-рецепторами на поверхности микроглии и нейронов, способствуют активации (!) микроглии, хемотаксису и инфильтрации нейтрофилов и макрофагов в очаг воспаления, активации окислительного стресса и экспрессии ряда провоспалительных факторов. Измененная экспрессия хемокинов в ЦНС также приводит к активации дофаминовой системы и увеличению потребления алкоголя, что, в свою очередь, ведет к еще большему изменению экспрессии хемокинов. Таким образом, развитие нейровоспаления приводит к нарушению нейрогенеза, нейродегенерации и апоптозу нейронов

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день в литературе представлено не так много работ, посвященных изучению хемокинов в контексте алкогольной зависимости. Большая их часть включает исследования на животных моделях, а изучению пациентов с алкогольной зависимостью посвящены единичные работы.

На основе представленных данных мы предлагаем схему, иллюстрирующую вклад этанол-индукцированной активации системы хемокинов в развитие нейровоспаления (рис. 1).

В целом, в контексте алкогольной зависимости большинство хемокинов недостаточно изучены и мало представлены в литературе, особенно это касается исследований, выполненных с участием пациентов. Возможность использования этих белков в качестве патологически значимых биомаркеров или терапевтических мишеней дол-

жна быть рассмотрена в будущих клинических и трансляционных исследованиях.

**Вклад авторов.** С.А. Иванова – концепция, написание первичного текста; Е.В. Михалицкая, Н.М. Вялова – поиск и анализ данных литературы; Н.А. Бохан – концепция, редактирование статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00338): «Сравнительное изучение роли иммуновоспаления и нейропротекции в патогенезе и клинике аффективных расстройств и алкогольной зависимости».

**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

- Teixeira, A. L., Gama, C. S., Rocha, N. P., and Teixeira, M. M. (2018) Revisiting the role of eotaxin-1/CCL11 in psychiatric disorders, *Front. Psychiatry*, **9**, <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00241>.
- Parsadaniantz, S. M., Rivat, C., Rostène, W., and Goazigo, A. R.-L. (2015) Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**, 69–78, <https://doi.org/10.1038/nrn3858>.
- Rostène, W., Kitabgi, P., and Parsadaniantz, S. M. (2007) Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 895–903, <https://doi.org/10.1038/nrn2255>.

4. Ahearn, O. C., Watson, M. N., and Rawls, S. M. (2021) Chemokines, cytokines and substance use disorders, *Drug Alcohol Depend.*, **220**, 108511, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108511>.
5. Bachtell, R. K., Jones, J. D., Heinzerling, K. G., Beardsley, P. M., and Comer, S. D. (2017) Glial and neuroinflammatory targets for treating substance use disorders, *Drug Alcohol Depend.*, **180**, 156-170, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.08.003>.
6. Ermakov, E. A., Mednova, I. A., Boiko, A. S., Buneva, V. N., and Ivanova, S. A. (2023) Chemokine dysregulation and neuroinflammation in schizophrenia: a systematic review, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2215, <https://doi.org/10.3390/ijms24032215>.
7. Coller, J. K., and Hutchinson, M. R. (2012) Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence, *Pharmacol. Ther.*, **134**, 219-245, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.008>.
8. Stuart, M. J., Singhal, G., and Baune, B. T. (2015) Systematic review of the neurobiological relevance of chemokines to psychiatric disorders, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 357, <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00357>.
9. Salim, S., Chugh, G., and Asghar, M. (2012) Inflammation in anxiety, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **88**, 1-25, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398314-5.00001-5>.
10. Huber, A. K., Giles, D. A., Segal, B. M., and Irani, D. N. (2018) An emerging role for eotaxins in neurodegenerative disease, *Clin. Immunol.*, **189**, 29-33, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.09.010>.
11. Cui, L.-Y., Chu, S.-F., and Chen, N.-H. (2020) The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis, *Int. Immunopharmacol.*, **83**, 106314, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106314>.
12. Westin, K., Buchhave, P., Nielsen, H., Minthon, L., Janciauskiene, S., and Hansson, O. (2012) CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease, *PLoS One*, **7**, e30525, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030525>.
13. Bettcher, B. M., Fitch, R., Wynn, M. J., Lalli, M. A., Elofson, J., Jastrzab, L., Mitic, L., Miller, Z. A., Rabinovici, G. D., Miller, B. L., Kao, A. W., Kosik, K. S., and Kramer, J. H. (2016) MCP-1 and eotaxin-1 selectively and negatively associate with memory in MCI and Alzheimer's disease dementia phenotypes, *Alzheimers Dement.*, **3**, 91-97, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.05.004>.
14. Araos, P., Pedraz, M., Serrano, A., Lucena, M., Barrios, V., García-Marchena, N., Campos-Clouete, R., Ruiz, J. J., Romero, P., Suárez, J., Baixeras, E., de la Torre, R., Montesinos, J., Guerri, C., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., Martínez-Riera, R., Torrens, M., Chowen, J. A., Argente, J., Mason, B. J., et al. (2015) Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity, *Addict. Biol.*, **20**, 756-772, <https://doi.org/10.1111/adb.12156>.
15. Magalhaes, P. V. S., Jansen, K., Stertz, L., Ferrari, P., Pinheiro, R. T., da Silva, R. A., and Kapczinski, F. (2014) Peripheral eotaxin-1 (CCL11) levels and mood disorder diagnosis in a population-based sample of young adults, *J. Psychiatric Res.*, **48**, 13-15, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.10.007>.
16. Ogłodek, E. A., Szota, A., Just, M. J., Moś, D., and Araszkiewicz, A. (2014) Comparison of chemokines (CCL-5 and SDF-1), chemokine receptors (CCR-5 and CXCR-4) and IL-6 levels in patients with different severities of depression, *Pharmacol. Rep.*, **66**, 920-926, <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.06.001>.
17. Simon, N. M., McNamara, K., Chow, C. W., Maser, R. S., Papakostas, G. I., Pollack, M. H., Nierenberg, A. A., Fava, M., and Wong, K. K. (2008) A detailed examination of cytokine abnormalities in major depressive disorder, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **18**, 230-233, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2007.06.004>.
18. Grassi-Oliveira, R., Brieztke, E., Teixeira, A., Pezzi, J. C., Zanini, M., Lopes, R. P., and Bauer, M. E. (2012) Peripheral chemokine levels in women with recurrent major depression with suicidal ideation, *Braz. J. Psychiatry*, **34**, 71-75, <https://doi.org/10.1590/S1516-44462012000100013>.
19. Leighton, S. P., Nerurkar, L., Krishnadas, R., Johnman, C., Graham, G. J., and Cavanagh, J. (2018) Chemokines in depression in health and in inflammatory illness: a systematic review and meta-analysis, *Mol. Psychiatry*, **23**, 48-58, <https://doi.org/10.1038/mp.2017.205>.
20. Ogłodek, E. A., Szota, A. M., Just, M. J., Moś, D. M., and Araszkiewicz, A. (2015) The MCP-1, CCL-5 and SDF-1 chemokines as pro-inflammatory markers in generalized anxiety disorder and personality disorders, *Pharmacol. Rep.*, **67**, 85-89, <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.08.006>.
21. Прохоров А. С., Голыгина С. Е., Сахаров А. В. (2022) Хемокины в центральной нервной системе, возможная патогенетическая роль при шизофрении (обзор литературы), *Психическое здоровье*, **17**, 100-110.
22. Teixeira, A. L., Reis, H. J., Nicolato, R., Brito-Melo, G., Correa, H., Teixeira, M. M., and Romano-Silva, M. A. (2008) Increased serum levels of CCL11/eotaxin in schizophrenia, *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **32**, 710-714, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.11.019>.
23. Saoud, H., Inoubli, O., Ben Fredj, S., Hassine, M., Ben Mohamed, B., Gaha, L., and Hadj Jrad, B. B. (2019) Protective effect of the MCP-1 gene haplotype against schizophrenia, *BioMed Res. Int.*, **2019**, 1-8, <https://doi.org/10.1155/2019/4042615>.

24. Stuart, M. J., and Baune, B. T. (2014) Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: a systematic review of biomarker studies, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **42**, 93-115, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.02.001>.
25. Asevedo, E., Gadelha, A., Noto, C., Mansur, R. B., Zugman, A., Belanger, S. I. N., Berberian, A. A., Scarpato, B. S., Leclerc, E., Teixeira, A. L., Gama, C. S., Bressan, R. A., and Brietzke, E. (2013) Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition in individuals with schizophrenia, *J. Psychiatr. Res.*, **47**, 1376-1382, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.05.032>.
26. Gilchrist, A. (2020) Chemokines and bone, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **262**, 231-258, [https://doi.org/10.1007/164\\_2020\\_349](https://doi.org/10.1007/164_2020_349).
27. Ransohoff, R. M. (2009) Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology, *Immunity*, **31**, 711-721, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.010>.
28. Murphy, P. M. (2002) International union of pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature, *Pharmacol. Rev.*, **54**, 227-229, <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.227>.
29. Murphy, P. M., Baggolini, M., Charo, I. F., Hébert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., and Power, C. A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors, *Pharmacol. Rev.*, **52**, 145-76.
30. Zheng, J., Thylin, M. R., Ghorpade, A., Xiong, H., Persidsky, Y., Cotter, R., Niemann, D., Che, M., Zeng, Y.-C., Gelbard, H. A., Shepard, R. B., Swartz, J. M., and Gendelman, H. E. (1999) Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1-associated dementia, *J. Neuroimmunol.*, **98**, 185-200, [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00049-1).
31. Calì, C., and Bezzini, P. (2010) CXCR4-mediated glutamate exocytosis from astrocytes, *J. Neuroimmunol.*, **224**, 13-21, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.004>.
32. Khan, M. Z., Brandimarti, R., Patel, J. P., Huynh, N., Wang, J., Huang, Z., Fatatis, A., and Meucci, O. (2004) Apoptotic and antiapoptotic effects of CXCR4: is it a matter of intrinsic efficacy? Implications for HIV neuropathogenesis, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **20**, 1063-1071, <https://doi.org/10.1089/aid.2004.20.1063>.
33. Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A. A., Bushell, T. J., Gray, P. W., and Miller, R. J. (1998) Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and Gp120 neurotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14500-14505, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14500>.
34. Van der Vorst, E. P. C., Döring, Y., and Weber, C. (2015) Chemokines, *Arterioscler. Thrombos. Vasc. Biol.*, **35**, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306359>.
35. De Timar, P., Stärkel, P., Delzenne, N. M., and Leclercq, S. (2017) A role for the peripheral immune system in the development of alcohol use disorders? *Neuropharmacology*, **122**, 148-160, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.013>.
36. Banks, W. (2005) Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology, *Curr. Pharmaceut. Design*, **11**, 973-984, <https://doi.org/10.2174/1381612053381684>.
37. Ubogu, E. E., Cossoy, M. B., and Ransohoff, R. M. (2006) The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation, *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, 48-55, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.11.002>.
38. Laing, K. (2004) Chemokines, *Dev. Compar. Immunol.*, **28**, 443-460, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.09.006>.
39. Janssen, K., Rickert, M., Clarner, T., Beyer, C., and Kipp, M. (2016) Absence of CCL2 and CCL3 ameliorates central nervous system grey matter but not white matter demyelination in the presence of an intact blood-brain barrier, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 1551-1564, <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9113-6>.
40. Zhang, K., and Luo, J. (2019) Role of MCP-1 and CCR2 in alcohol neurotoxicity, *Pharmacol. Res.*, **139**, 360-366, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.030>.
41. Banisadr, G., Gosselin, R., Mechighel, P., Rostène, W., Kitabgi, P., and Mélik Parsadaniantz, S. (2005) Constitutive neuronal expression of CCR2 chemokine receptor and its colocalization with neurotransmitters in normal rat brain: functional effect of MCP-1/CCL2 on calcium mobilization in primary cultured neurons, *J. Compar. Neurol.*, **492**, 178-192, <https://doi.org/10.1002/cne.20729>.
42. De Haas, A. H., van Weering, H. R. J., de Jong, E. K., Boddeke, H. W. G. M., and Biber, K. P. H. (2007) Neuronal chemokines: versatile messengers in central nervous system cell interaction, *Mol. Neurobiol.*, **36**, 137-151, <https://doi.org/10.1007/s12035-007-0036-8>.
43. Mélik-Parsadaniantz, S., and Rostène, W. (2008) Chemokines and neuromodulation, *J. Neuroimmunol.*, **198**, 62-68, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.022>.
44. Banisadr, G., Gosselin, R., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostène, W., and Parsadaniantz, S. M. (2005) Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides, *J. Compar. Neurol.*, **489**, 275-292, <https://doi.org/10.1002/cne.20598>.
45. Gosselin, R. D., Varela, C., Banisadr, G., Mechighel, P., Rostene, W., Kitabgi, P., and Melik-Parsadaniantz, S. (2005) Constitutive expression of CCR2 chemokine receptor and inhibition by MCP-1/CCL2 of GABA-

- induced currents in spinal cord neurons, *J. Neurochem.*, **95**, 1023-1034, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03431.x>.
46. Galimberti, D., Fenoglio, C., Lovati, C., Venturelli, E., Guidi, I., Corrà, B., Scalabrin, D., Clerici, F., Mariani, C., Bresolin, N., and Scarpini, E. (2006) Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **27**, 1763-1768, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.10.007>.
47. Mahad, D. J., and Ransohoff, R. M. (2003) The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), *Semin. Immunol.*, **15**, 23-32, [https://doi.org/10.1016/S1044-5323\(02\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S1044-5323(02)00125-2).
48. Minami, M., and Satoh, M. (2003) Chemokines and their receptors in the brain: pathophysiological roles in ischemic brain injury, *Life Sci.*, **74**, 321-327, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.019>.
49. Wu, D., Zhou, J., Bi, H., Li, L., Gao, W., Huang, M., Adcock, I. M., Barnes, P. J., and Yao, X. (2014) CCL11 as a potential diagnostic marker for asthma? *J. Asthma*, **51**, 847-854, <https://doi.org/10.3109/02770903.2014.917659>.
50. Baruch, K., Ron-Harel, N., Gal, H., Deczkowska, A., Shifrut, E., Ndifon, W., Mirlas-Neisberg, N., Cardon, M., Vaknin, I., Cahalon, L., Berkutzki, T., Mattson, M. P., Gomez-Pinilla, F., Friedman, N., and Schwartz, M. (2013) CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2264-2269, <https://doi.org/10.1073/pnas.1211270110>.
51. Erickson, M. A., Morofuji, Y., Owen, J. B., and Banks, W. A. (2014) Rapid transport of CCL11 across the blood-brain barrier: regional variation and importance of blood cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **349**, 497-507, <https://doi.org/10.1124/jpet.114.213074>.
52. Krathwohl, M. D., and Kaiser, J. L. (2004) Chemokines promote quiescence and survival of human neural progenitor cells, *Stem Cells*, **22**, 109-118, <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-1-109>.
53. Parajuli, B., Horiuchi, H., Mizuno, T., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2015) CCL11 enhances excitotoxic neuronal death by producing reactive oxygen species in microglia, *Glia*, **63**, 2274-2284, <https://doi.org/10.1002/glia.22892>.
54. Cunha, G. R., Asevedo, E., Mansur, R. B., Zugman, A., Pan, P. M., Gadelha, A., Belanger, S. I., Rizzo, L. B., Coelho, R., Stertz, L., Cogo-Moreira, H., Grassi-Oliveira, R., Teixeira, A. L., Kauer-Sant'Anna, M., Mari, J. J., Miguel, E. C., Bressan, R. A., and Brietzke, E. (2016) Inflammation, neurotrophism and oxidative stress and childhood psychopathology in a large community sample, *Acta Psychiatr. Scand.*, **133**, 122-132, <https://doi.org/10.1111/acps.12453>.
55. Masi, A., Quintana, D. S., Glazier, N., Lloyd, A. R., Hickie, I. B., and Guastella, A. J. (2015) Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis, *Mol. Psychiatry*, **20**, 440-446, <https://doi.org/10.1038/mp.2014.59>.
56. Tokac, D., Tuzun, E., Gulec, H., Yilmaz, V., Bireller, E. S., Cakmakoglu, B., and Kucukali, C. I. (2016) Chemokine and Chemokine receptor polymorphisms in bipolar disorder, *Psychiatry Invest.*, **13**, 541, <https://doi.org/10.4306/pi.2016.13.5.541>.
57. Ho, P.-S., Yen, C.-H., Chen, C.-Y., Huang, S.-Y., and Liang, C.-S. (2017) Changes in cytokine and chemokine expression distinguish dysthymic disorder from major depression and healthy controls, *Psychiatry Res.*, **248**, 20-27, <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.12.014>.
58. Fontenelle, L. F., Barbosa, I. G., Luna, J. V., de Sousa, L. P., Abreu, M. N. S., and Teixeira, A. L. (2012) A cytokine study of adult patients with obsessive-compulsive disorder, *Comprehensive Psychiatry*, **53**, 797-804, <https://doi.org/10.1016/j.comppsych.2011.12.007>.
59. García-Marchena, N., Araos, P. F., Barrios, V., Sánchez-Marín, L., Chowen, J. A., Pedraz, M., Castilla-Ortega, E., Romero-Sanchiz, P., Ponce, G., Gavito, A. L., Decara, J., Silva, D., Torrens, M., Argente, J., Rubio, G., Serrano, A., de Fonseca, F. R., and Pavón, F. J. (2017) Plasma chemokines in patients with alcohol use disorders: association of CCL11 (eotaxin-1) with psychiatric comorbidity, *Front. Psychiatry*, **7**, <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00214>.
60. Kuo, H.-W., Liu, T.-H., Tsou, H.-H., Hsu, Y.-T., Wang, S.-C., Fang, C.-P., Liu, C.-C., Chen, A. C. H., and Liu, Y.-L. (2018) Inflammatory chemokine eotaxin-1 is correlated with age in heroin dependent patients under methadone maintenance therapy, *Drug Alcohol Depend.*, **183**, 19-24, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.10.014>.
61. Panizzutti, B., Gubert, C., Schuh, A. L., Ferrari, P., Bristot, G., Fries, G. R., Massuda, R., Walz, J., Rocha, N. P., Berk, M., Teixeira, A. L., and Gama, C. S. (2015) Increased serum levels of eotaxin/CCL11 in late-stage patients with bipolar disorder: an accelerated aging biomarker? *J. Affect. Disord.*, **182**, 64-69, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.12.010>.
62. Kim, K.-W., Vallon-Eberhard, A., Zigmond, E., Farache, J., Shezen, E., Shakhar, G., Ludwig, A., Lira, S. A., and Jung, S. (2011) *In vivo* structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine, *Blood*, **118**, e156-e167, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348946>.

63. Vukovic, J., Colditz, M. J., Blackmore, D. G., Ruitenberg, M. J., and Bartlett, P. F. (2012) Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging, *J. Neurosci.*, **32**, 6435-6443, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5925-11.2012>.
64. Sheridan, G. K., and Murphy, K. J. (2013) Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage, *Open Biol.*, **3**, 130181, <https://doi.org/10.1098/rsob.130181>.
65. Blauth, K., Zhang, X., Chopra, M., Rogan, S., and Markovic-Plese, S. (2015) The role of fractalkine (CX3CL1) in regulation of CD4<sup>+</sup> cell migration to the central nervous system in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis, *Clin. Immunol.*, **157**, 121-132, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.01.001>.
66. Aurelian, L., and Balan, I. (2019) GABAAR A2-activated neuroimmune signal controls binge drinking and impulsivity through regulation of the CCL2/CX3CL1 balance, *Psychopharmacology*, **236**, 3023-3043, <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05220-4>.
67. Kalinin, S., González-Prieto, M., Scheiblich, H., Lisi, L., Kusumo, H., Heneka, M. T., Madrigal, J. L. M., Pandey, S. C., and Feinstein, D. L. (2018) Transcriptome analysis of alcohol-treated microglia reveals downregulation of beta amyloid phagocytosis, *J. Neuroinflamm.*, **15**, 141, <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1184-7>.
68. Blednov, Y., Bergeson, S., Walker, D., Ferreira, V., Kuziel, W., and Harris, R. (2005) Perturbation of chemokine networks by gene deletion alters the reinforcing actions of ethanol, *Behav. Brain Res.*, **165**, 110-125, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.026>.
69. He, J., and Crews, F. T. (2008) Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain, *Exp. Neurol.*, **210**, 349-358, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.017>.
70. Holloway, K. N., Douglas, J. C., Rafferty, T. M., Majewska, A. K., Kane, C. J. M., and Drew, P. D. (2023) Ethanol-induced cerebellar transcriptomic changes in a postnatal model of fetal alcohol spectrum disorders: focus on disease onset, *Front. Neuroscience*, **17**, <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1154637>.
71. Blednov, Y. A., Ponomarev, I., Geil, C., Bergeson, S., Koob, G. F., and Harris, R. A. (2012) Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies, *Addict. Biol.*, **17**, 108-120, <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00284.x>.
72. Ren, Z., Wang, X., Yang, F., Xu, M., Frank, J. A., Wang, H., Wang, S., Ke, Z., and Luo, J. (2017) Ethanol-induced damage to the developing spinal cord: the involvement of CCR2 signaling, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 2746-2761, <https://doi.org/10.1016/j.bbadiis.2017.07.035>.
73. Chang, G.-Q., Karatayev, O., Boorgu, D. S. S. K., and Leibowitz, S. F. (2020) CCL2/CCR2 System in neuroepithelial radial glia progenitor cells: involvement in stimulatory, sexually dimorphic effects of maternal ethanol on embryonic development of hypothalamic peptide neurons, *J. Neuroinflamm.*, **17**, 207, <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01875-5>.
74. Holloway, K. N., Douglas, J. C., Rafferty, T. M., Kane, C. J. M., and Drew, P. D. (2023) Ethanol induces neuroinflammation in a chronic plus binge mouse model of alcohol use disorder via TLR4 and MyD88-dependent signaling, *Cells*, **12**, 2109, <https://doi.org/10.3390/cells12162109>.
75. Guyon, A., Skrzypdelski, D., De Giry, I., Rovère, C., Conductier, G., Trocello, J. M., Daugé, V., Kitabgi, P., Rostène, W., Nahon, J. L., and Mélik Parsadaniantz, S. (2009) Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release, *Neuroscience*, **162**, 1072-1080, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.048>.
76. June, H. L., Liu, J., Warnock, K. T., Bell, K. A., Balan, I., Bollino, D., Puche, A., and Aurelian, L. (2015) CRF-amplified neuronal TLR4/MCP-1 signaling regulates alcohol self-administration, *Neuropsychopharmacology*, **40**, 1549-1559, <https://doi.org/10.1038/npp.2015.4>.
77. Zhang, K., Wang, H., Xu, M., Frank, J. A., and Luo, J. (2018) Role of MCP-1 and CCR2 in ethanol-induced neuroinflammation and neurodegeneration in the developing brain, *J. Neuroinflammation*, **15**, 197, <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1241-2>.
78. Yang, G., Meng, Y., Li, W., Yong, Y., Fan, Z., Ding, H., Wei, Y., Luo, J., and Ke, Z. (2011) Neuronal MCP-1 mediates microglia recruitment and neurodegeneration induced by the mild impairment of oxidative metabolism, *Brain Pathol.*, **21**, 279-297, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00445.x>.
79. Drew, P. D., Johnson, J. W., Douglas, J. C., Phelan, K. D., and Kane, C. J. M. (2015) Pioglitazone blocks ethanol induction of microglial activation and immune responses in the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **39**, 445-454, <https://doi.org/10.1111/acer.12639>.
80. Kane, C. J. M., Phelan, K. D., Douglas, J. C., Wagoner, G., Johnson, J. W., Xu, J., Phelan, P. S., and Drew, P. D. (2014) Effects of ethanol on immune response in the brain: region-specific changes in adolescent versus adult mice, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **38**, 384-391, <https://doi.org/10.1111/acer.12244>.
81. Chastain, L. G., and Sarkar, D. K. (2014) Role of microglia in regulation of ethanol neurotoxic action, *Int. Rev. Neurobiol.*, **118**, 81-103, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801284-0.00004-X>.

82. Ren, Z., Wang, X., Xu, M., Frank, J. A., and Luo, J. (2019) Minocycline attenuates ethanol-induced cell death and microglial activation in the developing spinal cord, *Alcohol*, **79**, 25-35, <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.12.002>.
83. Niedzwiedz-Massey, V. M., Douglas, J. C., Rafferty, T., Johnson, J. W., Holloway, K. N., Berquist, M. D., Kane, C. J. M., and Drew, P. D. (2023) Effects of chronic and binge ethanol administration on mouse cerebellar and hippocampal neuroinflammation, *Am. J. Drug Alcohol Abuse*, **49**, 345-358, <https://doi.org/10.1080/00952990.2022.2128361>.
84. Qin, L., He, J., Hanes, R. N., Pluzarev, O., Hong, J.-S., and Crews, F. T. (2008) increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment, *J. Neuroinflammation*, **5**, 10, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-10>.
85. Rankine, E. L., Hughes, P. M., Botham, M. S., Perry, V. H., and Felton, L. M. (2006) Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment, *Eur. J. Neurosci.*, **24**, 77-86, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04891.x>.
86. Valenta, J. P., and Gonzales, R. A. (2016) Chronic intracerebroventricular Infusion of monocyte chemoattractant protein-1 leads to a persistent increase in sweetened ethanol consumption during operant self-administration but does not influence sucrose consumption in Long-Evans rats, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **40**, 187-195, <https://doi.org/10.1111/acer.12928>.
87. Bray, J. G., Roberts, A. J., and Gruol, D. L. (2017) Transgenic mice with increased astrocyte expression of CCL2 show altered behavioral effects of alcohol, *Neuroscience*, **354**, 88-100, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.009>.
88. Lowe, P. P., Morel, C., Ambade, A., Iracheta-Vellve, A., Kwiatkowski, E., Satishchandran, A., Furi, I., Cho, Y., Gyongyosi, B., Catalano, D., Lefebvre, E., Fischer, L., Seyedkazemi, S., Schafer, D. P., and Szabo, G. (2020) Chronic alcohol-induced neuroinflammation involves CCR2/5-dependent peripheral macrophage infiltration and microglia alterations, *J. Neuroinflamm.*, **17**, 296, <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01972-5>.
89. Lowe, P. P., Gyongyosi, B., Satishchandran, A., Iracheta-Vellve, A., Cho, Y., Ambade, A., and Szabo, G. (2018) Reduced gut microbiome protects from alcohol-induced neuroinflammation and alters intestinal and brain inflammasome expression, *J. Neuroinflamm.*, **15**, 298, <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1328-9>.
90. Huang, M.-C., Chung, R.-H., Lin, P.-H., Kuo, H.-W., Liu, T.-H., Chen, Y.-Y., Chen, A. C. H., and Liu, Y.-L. (2022) Increase in plasma CCL11 (eotaxin-1) in patients with alcohol dependence and changes during detoxification, *Brain Behav. Immun.*, **99**, 83-90, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.09.016>.
91. Ruggiero, M. J., Boschen, K. E., Roth, T. L., and Klintsova, A. Y. (2018) Sex differences in early postnatal microglial colonization of the developing rat hippocampus following a single-day alcohol exposure, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **13**, 189-203, <https://doi.org/10.1007/s11481-017-9774-1>.
92. Kane, C. J., Phelan, K. D., Douglas, J. C., Wagoner, G., Johnson, J. W., Xu, J., and Drew, P. D. (2013) Effects of ethanol on immune response in the brain: region-specific changes in aged mice, *J. Neuroinflammation*, **10**, 834, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-66>.
93. Berriós-Cárcamo, P., Núñez, S., Castañeda, J., Gallardo, J., Bono, M. R., and Ezquer, F. (2024) Two-month voluntary ethanol consumption promotes mild neuroinflammation in the cerebellum but not in the prefrontal cortex, hippocampus, or striatum of mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 4173, <https://doi.org/10.3390/ijms25084173>.
94. Li, N., Liu, H., Xue, Y., Xu, Z., Miao, X., Guo, Y., Li, Z., Fan, Z., and Xu, Y. (2023) Targetable Brg1-CXCL14 axis contributes to alcoholic liver injury by driving neutrophil trafficking, *EMBO Mol. Med.*, **15**, <https://doi.org/10.15252/emmm.202216592>.
95. Kusumanchi, P., Liang, T., Zhang, T., Ross, R. A., Han, S., Chandler, K., Oshodi, A., Jiang, Y., Dent, A. L., Skill, N. J., Huda, N., Ma, J., Yang, Z., and Liangpunsakul, S. (2021) Stress-responsive gene FK506-binding protein 51 mediates alcohol-induced liver injury through the hippo pathway and chemokine (C-X-C Motif) ligand 1 signaling, *Hepatology*, **74**, 1234-1250, <https://doi.org/10.1002/hep.31800>.
96. Chang, G., Collier, A. D., Karatayev, O., Gulati, G., Boorgu, D. S. S. K., and Leibowitz, S. F. (2020) Moderate prenatal ethanol exposure stimulates CXCL12/CXCR4 chemokine system in radial glia progenitor cells in hypothalamic neuroepithelium and peptide neurons in lateral hypothalamus of the embryo and postnatal offspring, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **44**, 866-879, <https://doi.org/10.1111/acer.14296>.
97. Helms, C. M., Messaoudi, I., Jeng, S., Freeman, W. M., Vrana, K. E., and Grant, K. A. (2012) A longitudinal analysis of circulating stress-related proteins and chronic ethanol self-administration in cynomolgus macaques, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **36**, 995-1003, <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01685.x>.
98. Collier, A. D., Khalizova, N., Chang, G., Min, S., Campbell, S., Gulati, G., and Leibowitz, S. F. (2020) Involvement of Cxcl12a/Cxcr4b chemokine system in mediating the stimulatory effect of embryonic ethanol exposure on neuronal density in zebrafish hypothalamus, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **44**, 2519-2535, <https://doi.org/10.1111/acer.14482>.
99. Pascual, M., Montesinos, J., Marcos, M., Torres, J., Costa-Alba, P., García-García, F., Laso, F., and Guerri, C. (2017) Gender differences in the inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge ethanol drinking in adolescence, *Addict. Biol.*, **22**, 1829-1841, <https://doi.org/10.1111/adb.12461>.

100. Pascual, M., Baliño, P., Aragón, C. M. G., and Guerri, C. (2015) Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2, *Neuropharmacology*, **89**, 352-359, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.014>.
101. Melbourne, J. K., Chandler, C. M., Van Doorn, C. E., Bardo, M. T., Pauly, J. R., Peng, H., and Nixon, K. (2021) Primed for addiction: a critical review of the role of microglia in the neurodevelopmental consequences of adolescent alcohol drinking, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **45**, 1908-1926, <https://doi.org/10.1111/acer.14694>.
102. Mednova, I. A., Levchuk, L. A., Boiko, A. S., Roschina, O. V., Simutkin, G. G., Bokhan, N. A., Loonen, A. J. M., and Ivanova, S. A. (2023) Cytokine level in patients with mood disorder, alcohol use disorder and their comorbidity, *World J. Biol. Psychiatry*, **24**, 243-253, <https://doi.org/10.1080/15622975.2022.2095439>.
103. Roberto, M., Patel, R. R., and Bajo, M. (2017) Ethanol and cytokines in the central nervous system, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **248**, 397-431, [https://doi.org/10.1007/164\\_2017\\_77](https://doi.org/10.1007/164_2017_77).
104. Vetreno, R. P., Qin, L., Coleman, L. G., and Crews, F. T. (2021) Increased Toll-like receptor-MyD88-NFκB-proinflammatory neuroimmune signaling in the orbitofrontal cortex of humans with alcohol use disorder, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **45**, 1747-1761, <https://doi.org/10.1111/acer.14669>.
105. Bray, J. G., Reyes, K. C., Roberts, A. J., and Gruol, D. L. (2018) Altered hippocampal synaptic function in transgenic mice with increased astrocyte expression of CCL2 after withdrawal from chronic alcohol, *Neuropharmacology*, **135**, 113-125, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.02.031>.
106. Mineur, Y. S., Garcia-Rivas, V., Thomas, M. A., Soares, A. R., McKee, S. A., and Picciotto, M. R. (2022) Sex differences in stress-induced alcohol intake: a review of preclinical studies focused on amygdala and inflammatory pathways, *Psychopharmacology*, **239**, 2041-2061, <https://doi.org/10.1007/s00213-022-06120-w>.
107. Cruz, B., Borgonetti, V., Bajo, M., and Roberto, M. (2023) Sex-dependent factors of alcohol and neuroimmune mechanisms, *Neurobiol. Stress*, **26**, 100562, <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2023.100562>.
108. Bjørkhaug, S. T., Neupane, S. P., Bramness, J. G., Aanes, H., Skar, V., Medhus, A. W., and Valeur, J. (2020) Plasma cytokine levels in patients with chronic alcohol overconsumption: relations to gut microbiota markers and clinical correlates, *Alcohol*, **85**, 35-40, <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2019.10.002>.
109. Monnig, M. A., and Negash, S. (2024) Immune biomarkers in non-treatment-seeking heavy drinkers who used a probiotic supplement for 30 days: an open-label pilot study, *Alcohol*, **114**, 43-50, <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2023.08.007>.
110. Monnig, M. A., Lamb, P. S., Parra, J. M., Cioe, P. A., Martone, C. M., Monti, P. M., and Szabo, G. (2020) Immune response to an acute moderate dose of alcohol in healthy young adults, *Alcohol Alcohol.*, **55**, 616-623, <https://doi.org/10.1093/alc/alc079>.
111. Kazmi, N., Wallen, G. R., Yang, L., Alkhateib, J., Schwandt, M. L., Feng, D., Gao, B., Diazgranados, N., Ramchandani, V. A., and Barb, J. J. (2022) An exploratory study of pro-inflammatory cytokines in individuals with alcohol use disorder: MCP-1 and IL-8 associated with alcohol consumption, sleep quality, anxiety, depression, and liver biomarkers, *Front. Psychiatry*, **13**, <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2022.931280>.
112. Umhau, J. C., Schwandt, M., Solomon, M. G., Yuan, P., Nugent, A., Zarate, C. A., Drevets, W. C., Hall, S. D., George, D. T., and Heilig, M. (2014) Cerebrospinal fluid monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholics: support for a neuroinflammatory model of chronic alcoholism, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **38**, 1301-1306, <https://doi.org/10.1111/acer.12367>.
113. Hayashi, H., and Sakai, T. (2011) Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knock-out mouse models, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **300**, G729-G738, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00013.2011>.
114. Gao, B., and Bataller, R. (2011) Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets, *Gastroenterology*, **141**, 1572-1585, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.002>.
115. Dominguez, M., Miquel, R., Colmenero, J., Moreno, M., García-Pagán, J., Bosch, J., Arroyo, V., Ginès, P., Caballería, J., and Bataller, R. (2009) Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis, *Gastroenterology*, **136**, 1639-1650, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.056>.
116. Wakil, A., Niazi, M., Meybodi, M. A., and Pyrsopoulos, N. T. (2023) Emerging pharmacotherapies in alcohol-associated hepatitis, *J. Clin. Exp. Hepatol.*, **13**, 116-126, <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.06.012>.
117. Liu, M., Cao, S., He, L., Gao, J., Arab, J. P., Cui, H., Xuan, W., Gao, Y., Sehrawat, T. S., Hamdan, F. H., Ventura-Cots, M., Argemi, J., Pomerantz, W. C. K., Johnsen, S. A., Lee, J.-H., Gao, F., Ordog, T., Mathurin, P., Revzin, A., Bataller, R., Yan, H., and Shah, V. H. (2021) Super enhancer regulation of cytokine-induced chemokine production in alcoholic hepatitis, *Nat. Commun.*, **12**, 4560, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24843-w>.
118. Poulsen, K. L., Fan, X. D., Kibler, C. D., Huang, E., Wu, X., McMullen, M. R., Leng, L., Bucala, R., Ventura-Cots, M., Argemi, J., Bataller, R., and Nagy, L. E. (2021) Role of MIF in coordinated expression of hepatic chemokines in patients with alcohol-associated hepatitis, *JCI Insight*, **6**, e141420, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.141420>.

## ALCOHOL-INDUCED ACTIVATION OF THE CHEMOKINE SYSTEM AND THE ACTIVATION OF NEUROINFLAMMATION

### Review

E. V. Mikhalkina\*, N. M. Vyalova, N. A. Bokhan, and S. A. Ivanova

*Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center  
of the Russian Academy of Sciences, 634014 Tomsk, Russia; e-mail: Uzen63@mail.ru*

Chemokines are immunoregulatory proteins with pleiotropic functions involved in processes of neuromodulation, neurogenesis and neurotransmission. The chemokines effect on the central nervous system plays an important role in modulating various conditions. It can have negative consequences for central nervous system functions, including the development of alcohol-related disorders. In the review we analyzed the available literature data devoted to the problem of chemokines participation in the pathogenesis, formation of the clinical picture and remission of alcohol use disorder both in animal models and in the study of patients with alcoholism. Presented data confirm the hypothesis that alcohol-induced chemokine production can modulates the processes of chronic neuroinflammation. Thus, the data summarized and presented in this review are devoted to the current direction of research in the field of psychiatry, which will be in demand by both scientists and clinical specialists.

*Keywords:* alcohol use disorder, addiction, chemokines, neuroinflammation

## АССОЦИАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА С КЛИНИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ И ФАКТОРАМИ ВОСПАЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ

© 2024 В.Д. Прокопьева<sup>1\*</sup>, Т.П. Ветлугина<sup>1</sup>, Е.В. Епимахова<sup>1</sup>,  
А.С. Бойко<sup>1</sup>, Н.А. Бохан<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН,  
Научно-исследовательский институт психического здоровья,  
634014 Томск, Россия; электронная почта: valyaprok@mail.ru

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

Поступила в редакцию 29.05.2024

После доработки 26.07.2024

Принята к публикации 24.08.2024

Фундаментальной проблемой наркологии является уточнение механизмов развития алкогольной зависимости (АЗ), в патогенезе которой важную роль играют нарушения окислительно-восстановительных процессов и воспаление. Выявление ассоциаций биологических и клинических показателей проясняет молекулярные механизмы патогенеза заболевания. Целью работы было изучение периферических маркеров окислительного стресса (ОС) у больных АЗ в ранний период постабstinентного состояния и выявление их взаимосвязи с клиническими характеристиками заболевания и факторами воспаления. Определяли показатели 84 больных АЗ мужчин (средний возраст – 44,3 ± 8,2 года). Анализировали клинические характеристики: возраст пациента, возраст формирования алкогольного абстинентного синдрома (ААС), давность заболевания, продолжительность ААС. В плазме крови определяли маркеры ОС – продукты окисления белков (карбонилы белков, КБ) с использованием 2,4-динитрофенилгидразина; липидов (продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), ТБК-РП); ДНК (8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, 8-OH-dG). В сыворотке крови определяли медиаторы воспаления – провоспалительные цитокины (ИФН $\gamma$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17А, ФНО $\alpha$ ). Контроль при биологических исследованиях – образцы крови 80 условно здоровых мужчин (средний возраст – 40,9 ± 9,6 года). У больных АЗ выявлено повышение КБ, ТБК-РП и всех цитокинов по сравнению с контролем; концентрация 8-OH-dG не отличалась от контроля. Обнаружены: прямая связь ТБК-РП с давностью заболевания; обратная связь КБ с возрастом формирования и продолжительностью ААС. КБ имели обратную связь с ИЛ-6. Между 8-OH-dG и ИЛ-6, ТБК-РП и ИЛ-8, ТБК-РП и ФНО $\alpha$  выявлены положительные корреляции. Таким образом, ранний период постабstinентного состояния у больных АЗ характеризуется выраженным ОС и воспалением. Полученные результаты расширяют знания об интегративном вкладе факторов ОС и воспаления в патогенез АЗ и могут быть применены для разработки новых методов лечения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** маркеры окислительного стресса, провоспалительные цитокины, алкогольная зависимость.

DOI: 10.31857/S0320972524110042 EDN: IKUKUM

### ВВЕДЕНИЕ

Современные исследования в области биологической наркологии показывают, что течение алкоголизма (алкогольной зависимости, АЗ), как и многих патологических состояний, сопровождается окислительным стрессом (ОС). При алкого-

лизме, помимо общих механизмов формирования и развития ОС, имеются специфические, которые связаны с дополнительными источниками генерации свободных радикалов, в том числе и активных форм кислорода (АФК), в результате трансформации этанола и его основного метаболита ацетальдегида в организме [1–3].

Алкоголь преодолевает гематоэнцефалический барьер, вызывая активацию микроглии,

\* Адресат для корреспонденции.

приводя к усилению продукции провоспалительных цитокинов, нейровоспалению в центральной нервной системе, нарушению нейроиммунной коммуникации, что отражается на поведенческих реакциях пациентов [4–6]. Кроме того, длительное употребление алкоголя ослабляет кишечный барьер, способствуя выходу в кровь бактериальных компонентов, таких как липополисахариды (ЛПС), которые активируют иммунную систему главным образом через рецепторы иммунных клеток (TLR4), с повышением уровня циркулирующих цитокинов, развитием воспалительного процесса и опосредованым алкоголем поражением внутренних органов [7].

Активированные клетки иммунной системы генерируют АФК, воспалительный процесс всегда сопровождается окислительным стрессом [8, 9]. Нарушения антиоксидантной и иммунной защиты при длительном потреблении алкоголя способствуют формированию у пациентов сопутствующей соматической патологии, в существенной мере снижающей эффективность стандартной терапии. На основе данных о молекулярных механизмах повреждающего действия этанола на клетки системы и органы разрабатываются и внедряются в практику новые вспомогательные терапевтические подходы, которые заключаются в дополнительном назначении к стандартной терапии различных препаратов, направленных на молекулярные мишени токсического воздействия этанола, что позволяет существенно повысить эффективность лечения [10]. Важная информация о фундаментальных процессах, вовлеченных в патогенез АЗ, необходимая для совершенствования существующих и разработки новых методов лечения, может быть получена при изучении особенностей ОС на разных этапах течения заболевания и выявлении клинико-биологических ассоциаций.

Целью настоящей работы было изучение периферических маркеров окислительного стресса у больных алкогольной зависимостью в ранний период постабstinентного состояния и выявление их взаимосвязи с клиническими характеристиками заболевания и факторами воспаления.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализировали показатели 84 больных алкоголизмом мужчин в возрасте 30–60 лет (средний возраст –  $44,3 \pm 8,2$  года), поступивших на

лечебие в клинику НИИ психического здоровья с диагнозом по МКБ-10 «Психические и поведенческие расстройства в результате употребления алкоголя (синдром зависимости – F10.21 и синдром отмены – F10.30)», с давностью заболевания  $13,6 \pm 8,0$  лет. Диагностическую оценку и клиническую верификацию диагноза проводили врачи-наркологи отделения аддиктивных состояний (научный руководитель отделения – академик РАН Н.А. Боян). На каждого пациента заполняли «Карту стандартизованного описания обследуемого», в которую, кроме общих идентифицирующих данных, вносили клинические характеристики заболевания, среди них – возраст на момент обследования; возраст формирования алкогольного абстинентного синдрома (AAC); давность заболевания, которую исчисляли от возраста формирования AAC до возраста пациента на дату обследования; продолжительность AAC после отмены приема алкоголя. Контролем при биологических исследованиях служили образцы крови 80 условно здоровых мужчин (средний возраст –  $40,9 \pm 9,6$  года), не имеющих проблем с употреблением алкоголя, а также хронических соматических заболеваний в стадии обострения и признаков перенесенных острых инфекционных заболеваний. Из 37 образцов крови здоровых мужчин была получена плазма, которую затем использовали для определения маркеров ОС. Кровь других 43 условно здоровых мужчин использовали для получения сыворотки крови, в которой определяли медиаторы воспаления.

Кровь у пациентов брали на 3–5 день их поступления в стационар после алкогольной детоксикации, направленной на удаление из токсических веществ и редукцию AAC. Периферическую венозную кровь у больных АЗ и лиц группы контроля отбирали утром натощак с использованием стерильной системы однократного применения Vacutainer («Becton Dickinson», США) в пробирки, покрытые гепарином (для получения плазмы крови) и активатором свертывания крови (для получения сыворотки крови). Кровь центрифугировали, сыворотку и плазму разливали по аликовотам и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  до использования.

В плазме крови определяли продукты окисления белков по концентрации карбонилов белков (КБ) с использованием метода, основанного на реакции взаимодействия карбонильных производных белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов [11].

Принятые сокращения: AAC – алкогольный абстинентный синдром; АЗ – алкогольная зависимость; ИЛ – интерлейкин; ИФН $\gamma$  – интерферон гамма; КБ – карбонилы белков; ОС – окислительный стресс; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ТБК – тиобарбитуровая кислота; ТБК-РП – ТБК-реактивные продукты; ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа; 8-OH-dG – 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин(8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин).

Использовали 2,4-динитрофенилгидразин («Rapigreac», Испания). Концентрацию КБ выражали в нмоль/мг белка. Общий белок определяли с помощью набора Total Protein 120 («Cormay», Польша), выражали в мг/мл. Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по концентрации реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) реактивных продуктов (ТБК-РП) с использованием набора ТВА AGAT («Агат-Мед», Россия), концентрацию ТБК-РП выражали в нмоль/мл. Измерение концентрации продукта окислительного повреждения ДНК – 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OH-dG) – проводили иммуноферментным методом с использованием набора DNA Damage Competitive Elisa Kit («Thermo Fisher Scientific», США), концентрацию 8-OH-dG выражали в нг/мл. Измерение оптической плотности проб и расчет концентраций окисленных продуктов макромолекул плазмы крови осуществляли на приборе EPOCH («Bio Tek Instruments», США).

Факторы воспаления оценивали по уровню провоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Определяли концентрацию интерферона гамма (ИФН $\gamma$ ); интерлейкина 1 бета (ИЛ-1 $\beta$ ); интерлейкина 6 (ИЛ-6); интерлейкина 8 (ИЛ-8); интерлейкина 17А (ИЛ-17А) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ) – на мультиплексном анализаторе MAGPIX («Luminex», США) (ЦКП «Медицинская геномика», Томский НИМЦ) с использованием наборов реагентов MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel («Merck», Германия), выражали в пг/мл.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS, версия 23.0 для Windows. Описательная статистика представлена медианой и межквартильным интервалом Me [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>]. Возраст участников исследования и длительность заболевания представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ( $M \pm \sigma$ ). Проверку на нормальность распределения значений переменных проводили по критерию Шапиро–Уилка. Для межгруппового сравнения использовали критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена.

**Таблица 2.** Периферические маркеры окислительного стресса в плазме крови больных алкоголизмом и здоровых лиц; Me [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>]

Показатель	Больные алкоголизмом, n = 84	Контроль, n = 37	p между группами
КБ, нмоль/мг белка	0,42 [0,35–0,49]	0,33 [0,27–0,39]	<0,001
ТБК-РП, нмоль/мл	2,97 [2,50–3,55]	2,40 [2,10–2,80]	<0,001
8-OH-dG, нг/мл	13,30 [9,84–16,08]	12,84 [11,16–16,45]	0,908

Примечание. n – Количество обследованных лиц; КБ – карбонилы белков; ТБК-РП – ТБК-реактивные продукты; 8-OH-dG – продукт окислительной модификации ДНК.

Корреляционные взаимосвязи и различия между группами считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 1 приведены данные клинического обследования пациентов.

Биологические исследования у больных алкоголизмом проведены в ранний период постабstinентного состояния после алкогольной детоксикации.

В табл. 2 представлены результаты сравнительного изучения периферических маркеров ОС у больных АЗ и здоровых лиц.

В табл. 3 приведены результаты исследования периферических цитокинов – медиаторов воспаления – у больных алкоголизмом.

Основной целью нашего исследования явилось выявление взаимосвязей маркеров ОС с клиническими характеристиками заболевания и факторами воспаления. Проведенный корреляционный анализ выявил статистически значимые взаимосвязи, представленные в табл. 4.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение периферических маркеров окислительного стресса – продуктов окисления липидов

**Таблица 1.** Клинические характеристики больных алкоголизмом (n = 84); Me [Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>]

Возраст, лет	44,50 [38,00–50,00]
Возраст формирования ААС, лет	30,00 [25,00–35,00]
Давность заболевания, лет	12,50 [7,00–19,00]
Продолжительность ААС, сутки	4,00 [2,00–4,00]

Примечание. n – Количество обследованных лиц; ААС – алкогольный абстинентный синдром.

**Таблица 3.** Концентрация провоспалительных цитокинов у больных алкоголизмом и здоровых лиц; Me [Q<sub>L</sub>–Q<sub>U</sub>]

Показатель	Больные алкоголизмом, n = 31	Контроль, n = 43	p между группами
ИФН $\gamma$ , пг/мл	32,46 [29,36–35,44]	3,07 [0,88–5,47]	p < 0,001
ИЛ-1 $\beta$ , пг/мл	5,56 [4,91–6,41]	0,68 [0,25–2,46]	p < 0,001
ИЛ-6, пг/мл	5,96 [4,74–10,47]	1,26 [0,35–4,06]	p < 0,001
ИЛ-8, пг/мл	26,38 [19,72–40,53]	8,59 [5,69–13,78]	p < 0,001
ИЛ-17А, пг/мл	24,27 [22,53–27,82]	2,83 [1,07–5,17]	p < 0,001
ФНО $\alpha$ , пг/мл	30,03 [28,55–38,67]	9,75 [7,00–12,49]	p < 0,001

Примечание. n – Количество обследованных лиц; ИФН $\gamma$  – интерферон гамма; ИЛ-1 $\beta$  – интерлейкин 1 бета; ИЛ-6 – интерлейкин 6; ИЛ-8 – интерлейкин 8; ИЛ-17А – интерлейкин 17А; ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа.

**Таблица 4.** Корреляционные связи периферических маркеров окислительного стресса с клиническими характеристиками и факторами воспаления у больных алкоголизмом

Параметры	Коэффициент Спирмена (rs)	p
ТБК-РП и давность заболевания	0,201	0,049
КБ и возраст формирования ААС	-0,245	0,025
КБ и продолжительность ААС	-0,246	0,024
КБ и ИЛ-6	-0,620	0,003
8-OH-dG и ИЛ-6	0,433	0,044
ТБК-РП и ИЛ-8	0,457	0,049
ТБК-РП и ФНО $\alpha$	0,468	0,037

Примечание. КБ – Карбонилы белков; ТБК-РП – ТБК-реактивные продукты; 8-OH-dG – продукт окислительной модификации ДНК; ААС – алкогольный абстинентный синдром; ИЛ-6 – интерлейкин 6; ИЛ-8 – интерлейкин 8; ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа.

дов, белков и ДНК плазмы крови – у больных алкоголизмом в ранний период постабstinентного состояния показало наличие у пациентов выраженного окислительного стресса. Это следует из статистически значимо повышенных концентраций карбонилов белков и ТБК-реактивных продуктов плазмы крови у пациентов по сравнению с контролем (табл. 2). О значительном увеличении периферических маркеров ОС – продукта ПОЛ малонового диальдегида и карбонилов белков в сыворотке крови больных алкоголизмом, по сравнению со здоровыми лицами, сообщается в работах других авторов [12, 13].

В то же время концентрация продукта окислительной модификации ДНК у больных АЗ не отличалась от контроля (табл. 2). Ранее мы сообщали о повышении концентрации 8-OH-dG в образцах плазмы крови, полученных у больных АЗ при поступлении в стационар в состоянии ААС [14]. В литературе есть данные о повышении уровня 8-OH-dG у больных алкоголизмом как в состоянии ААС, так и после 1-недельной детоксикации [15]. Разные результаты можно объяснить этапами заболевания, на которых проводились исследования, а также большим разнообразием механизмов, которые в организме человека могут влиять на уровень продуктов окисления ДНК в плазме крови. Анализ литературных данных о биомедицинских свойствах, механизмах действия и возможных терапевтических эффектах таких метаболитов ДНК проведен в обзоре Черникова и др. [16]. Известно более 30 продуктов окислительной модификации азотистых оснований нуклеиновых кислот, среди которых наиболее изучены 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-око-G) и 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OH-dG). Образование 8-око-G является наиболее распространенным видом окислительного повреждения нуклеиновых кислот [17], а 8-OH-dG считаются одними из основных биомаркеров окислительного стресса [15, 18]. Показано, что свободный 8-око-G играет роль медиатора стрессовой сигнализации в клетке, запуская и потенцируя воспалительные и иммунные реакции с целью поддержания гомеостаза при действии внешних агентов, в то время как 8-OH-dG может проявлять выраженные противовоспалительные и антиоксидантные свойства [16]. В другой работе – обзоре литературных источников, касающихся биологической роли 8-оксо-2'-dG [19], – при рассмотрении антиоксидантных и противовоспалительных свойств этого соединения отмечается, что в ряде работ показано повышение содержания этого продукта

окисления ДНК в первое время действия стрессового фактора, а затем – возвращение к нормальным или даже пониженным значениям. Отмечается, что в период компенсации происходит резкий рост активности антиоксидантных и репаративных ферментов. Вопрос, сам ли продукт окисления ДНК вызывает усиление экспрессии генов этих ферментов или это происходит в результате действия других факторов, остается нерешенным. Однако, кроме того, что 8-OH-dG довольно давно и успешно используется в качестве биомаркера ОС, есть данные, свидетельствующие об участии этого соединения в регуляции экспрессии генов, в процессах репарации ДНК, контроле воспалительных и аутоиммунных реакций, запуске антиоксидантных систем [19]. Таким образом, факт отсутствия различий в уровне продукта окисления ДНК 8-OH-dG в плазме крови больных АЗ, по сравнению с контролем, в нашем исследовании вполне объясним, поскольку этот метаболит не только накапливается в организме во время ОС, но и активно включается в регуляцию метаболических процессов, которые, в свою очередь, могут влиять на его концентрацию в плазме крови.

Определение провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных алкоголизмом показало, что концентрация всех исследованных медиаторов воспаления существенно выше контроля ( $p < 0,001$  во всех случаях). Наибольшее повышение концентрации (более чем на порядок) обнаружено у ИФН $\gamma$  (табл. 3). Ранее, при изучении спонтанной продукции цитокинов (ИФН $\gamma$ , ИЛ-17А, ИЛ-1Р $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО $\alpha$ ) иммунокомпетентными клетками, было выявлено значительное повышение спонтанной продукции цитокинов в супернатантах культур образцов крови больных АЗ по сравнению со здоровыми лицами [20]. Установлены корреляционные взаимосвязи между спонтанной продукцией цитокинов клетками крови больных АЗ и продуктами окисления белков и липидов плазмы крови этих больных [21]. Обнаруженные корреляции косвенно свидетельствуют о стимулирующем влиянии этанола и продуктов его метаболизма на иммунокомпетентные клетки *in vivo*. При этом продукты окисления этанола могут по-разному модулировать синтез цитокинов, что было продемонстрировано на модели потребления алкоголя (на крысах) при оценке роли алкоголь-индукции окислительного стресса в модуляции выработки цитокинов в гепатоцитах и клетках Купфера печени [22]. Выявлено, что продукты окисления по-разному модулируют синтез провоспалительных цитокинов/хемокинов через транскрипционный фактор NF-кB, ацетилирование гистонов, нарушение стабильности мРНК. Так, пероксид

водорода ( $H_2O_2$ ) стимулировал ЛПС-индукционное производство цитокинов/хемокинов в клетках Купфера, в то время как 4-гидроксиненаль оказывал ингибирующее действие.

Изучение корреляционных связей маркеров окислительного стресса и клинических характеристик заболевания выявило отрицательные ассоциации концентрации КБ с возрастом формирования ААС, а также с продолжительностью ААС после отмены алкоголя (табл. 4). В механизмах формирования и развития алкогольной зависимости задействованы многие молекулярные пути, и однозначно объяснить выявленные взаимосвязи не представляется возможным. Тем не менее можно определенно говорить о том, что карбонилы белков вовлечены в эти механизмы.

Выявлена также прямая связь уровня продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-РП) с давностью заболевания. Известно, что старение связано с увеличением количества продуктов окисления биомакромолекул [23–25]. В работе Spiteller [25] приводятся доказательства того, что продукты ПОЛ образуются в результате процессов, индуцированных изменениями структуры клеточной мембранны, которые происходят при старении, а также при действии неблагоприятных факторов, к которым можно отнести и систематическое длительное потребление алкоголя. Структурные изменения биомембран при действии этанола приводят к активации мембраносвязанных фосфолипаз, что индуцирует приток ионов  $Ca^{2+}$  и активацию липоксигеназ, превращающих полиненасыщенные жирные кислоты в гидроперекиси липидов, которые могут разлагаться под действием ферментов до сигнальных соединений. Индуцируются процессы неферментативного ПОЛ, продолжается накопление продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой – ТБК-РП [24]. Выявленная в нашей работе корреляция ТБК-РП с давностью заболевания может быть связана с этим механизмом накопления продуктов ПОЛ у больных алкогольной зависимостью.

Обнаруженные в настоящем исследовании корреляционные связи параметров окислительного стресса и провоспалительных цитокинов подтверждают тесную взаимосвязь воспаления и ОС [8, 9]. Особенно значимой является связь маркеров ОС с ИЛ-6 – важнейшим медиатором воспаления, индуцирующим синтез белков острой фазы. Отметим наиболее сильную из всех выявленных ассоциаций обратную связь КБ с ИЛ-6 и прямую связь умеренной силы 8-OH-dG с этим цитокином (табл. 4). Как уже упоминалось, есть данные, что 8-OH-dG проявляет выраженные антиоксидантные свойства [16, 19]. Одним из объяснений полученных ассоциаций может быть

следующее: в результате воспалительного процесса при нарастании ИЛ-6 происходит окисление макромолекул плазмы крови с повышением, в том числе продуктов окисления ДНК (8-OH-dG), отсюда прямая связь ИЛ-6 с 8-OH-dG. Поскольку 8-OH-dG может оказывать антиоксидантный эффект, его накопление в крови может препятствовать окислению белков, снижать концентрацию карбонилов белков крови. Это, в свою очередь, может приводить к выявленной в нашей работе отрицательной корреляции между ИЛ-6 и концентрацией КБ.

Приведенные объяснения ассоциаций маркеров ОС с клиническими характеристиками заболевания и медиаторами воспаления являются лишь гипотетическими. Необходимы дальнейшие исследования и накопление данных для выявления взаимовлияния метаболических путей на разных этапах течения алкогольной зависимости.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что ранний период постабstinентного состояния у больных с алкогольной зависимостью сопровождается выраженным окислительным стрессом с накоплением в крови продуктов окислительной модификации белков и липидов.

Выявлены взаимосвязи маркеров ОС с давностью заболевания, возрастом формирования алкогольного абстинентного синдрома, продолжительностью ААС. Обнаружены корреляции между КБ, ТБК-РП, 8-OH-dG и провоспалительными цитокинами, концентрация которых статистически значимо повышена у пациентов с АЗ.

В совокупности показано, что исследуемые периферические биомаркеры отражают интегративный вклад окислительного стресса и воспаления в патогенез алкогольной зависимости. Полученные результаты расширяют имеющиеся знания о патогенезе алкоголизма и могут быть применены при разработке новых методов лечения пациентов с дополнительным включением препаратов, действие которых направлено на нормализацию оксидативного статуса и снижение процессов воспаления.

**Вклад авторов.** В.Д. Прокопьева, Т.П. Ветлугина, Н.А. Бохан – концепция и руководство работой; Е.В. Епимахова, А.С. Бойко – проведение экспериментов; В.Д. Прокопьева, Т.П. Ветлугина, Е.В. Епимахова – обсуждение результатов исследования и написание текста; Т.П. Ветлугина, Н.А. Бохан – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет бюджетного финансирования ГЗ № 075-00712-24-00, тема НИР № 122020200053-1.

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

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом при НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (протокол № 147 от 22 ноября 2021 г., дело № 147/5.2021).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zima, T., Albano, E., Ingelman-Sundberg, M., Arteel, G. E., Thiele, G. M., Klassen, L. W., and Sun A. Y. (2005) Modulation of oxidative stress by alcohol, *Alcoholism*, **29**, 1060-1065, <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000168168.43419.54>
2. Huang, M. C., Chen, C. H., Peng, F. C., Tang, S. H., and Chen C. C. (2009) Alterations in oxidative stress status during early alcohol withdrawal in alcoholic patients, *J. Formos. Med. Assoc.*, **108**, 560-569, [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60374-0](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60374-0).
3. Прокопьева В. Д., Ветлугина Т. П. (2023) Особенности окислительного стресса при алкоголизме (обзор), *Биомед. Хим.*, **69**, 83-96, <https://doi.org/10.18097/PBMC20236902083>.
4. Coleman, L. G. Jr., and Crews, F. T. (2018) Innate immune signaling and alcohol use disorders, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **248**, 369-396, [https://doi.org/10.1007/164\\_2018\\_92](https://doi.org/10.1007/164_2018_92).
5. Crews, F. T., Lawrimore, C. J., Walter, T. J., and Coleman, L. G. Jr. (2017) The role of neuroimmune signaling in alcoholism, *Neuropharmacology*, **122**, 56-73, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.01.031>.
6. Airapetov, M., Eresko, S., Lebedev, A., Bychkov, E., and Shabanov, P. (2021) The role of Toll-like receptors in neurobiology of alcoholism, *Biosci. Trends.*, **15**, 74-82, <https://doi.org/10.5582/bst.2021.01041>.
7. Erickson, E. K., Grantham, E. K., Warden, A. S., and Harris, R. A. (2019) Neuroimmune signaling in alcohol use disorder, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **177**, 34-60, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.12.007>.

8. Agita, A., and Alsagaff, M. T. (2017) Inflammation, immunity, and hypertension, *Acta Med. Indone.*, **49**, 158-165.
9. Yan, C., Hu, W., Tu, J., Li, J., Liang, Q., and Han, S. (2023) Pathogenic mechanisms and regulatory factors involved in alcoholic liver disease, *J. Transl. Med.*, **21**, 300, <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04166-8>.
10. Ветлугина Т. П., Прокопьева В. Д., Бохан Н. А. (2023) *Биологические основы адъювантной терапии алкоголизма*, Томск, Изд-во Томского государственного университета, 208 с.
11. Levine, R. L. (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease, *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 790-796.
12. Yildirim, T., Armutcu, F., Hasgul, R., Yuksel, R. N., Sengezer, T., and Erdamar, H. (2013) Oxidative stress markers, alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein-L3 levels of alcohol dependent subjects, *Oxid. Antioxid. Med. Sci.*, **2**, 303-307, <https://doi.org/10.5455/oams.031013.or.053>.
13. Galicia-Moreno, M., Rosique-Oramas, D., Medina-Avila, Z., Álvarez-Torres, T., Falcón, D., Higuera-de la Tijera, F., Béjar, Y. L., Cordero-Pérez, P., Muñoz-Espinosa, L., Pérez-hernández, J. L., Kershenobich, D., and Gutierrez-Reyes, G. (2016) Behavior of oxidative stress markers in alcoholic liver cirrhosis patients, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **9370565**, <https://doi.org/10.1155/2016/9370565>.
14. Прокопьева В. Д., Ярыгина Е. Г., Плотников Е. В., Ветлугина Т. П. (2019) Исследование эффектов солей лития в присутствии этанола на продукт окислительного повреждения ДНК плазмы крови здоровых лиц и больных алкоголизмом, *Сиб. Вестн. Психиатр. Наркол.*, **1**, 5-11, [https://doi.org/10.26617/1810-3111-2019-1\(102\)-5-11](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2019-1(102)-5-11).
15. Chen, C. H., Pan, C. H., Chen, C. C., and Huang, M. C. (2011) Increase oxidative DNA damage in patients with alcohol dependence and its correlation with alcohol withdrawal severity, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **35**, 338-344, <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01349>.
16. Черников А. В., Гудков С. В., Усачева А. М., Брусков В. И. (2017) Экзогенный 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезокси-гуанозин: биомедицинские свойства, механизмы действия, терапевтический потенциал, *Усп. Биол. Хим.*, **57**, 267-302, <https://doi.org/10.1134/S0006297917130089>.
17. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.*, **17**, 1195-1214.
18. Kasai, H. (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutat. Res.*, **387**, 147-163.
19. Мармий Н. В., Есипов Д. С. (2015) Биологическая роль 8-оксо-2'-дезоксикуанозина, *Вестник Моск. Универ. Сер. Биол.*, **4**, 19-23.
20. Ветлугина Т. П., Никитина В. Б., Мандель А. И., Бойко А. С., Прокопьева В. Д., Бохан Н. А. (2019) Факторы иммуноэндокринной регуляции при алкогольной зависимости на этапе формирования терапевтической ремиссии, *Росс. Иммунол. Журн.*, **13**, 183-186, <https://doi.org/10.31857/S102872210006447-6>.
21. Ветлугина Т. П., Прокопьева В. Д., Епимахова Е. В., Бойко А. С., Никитина В. Б., Бохан Н. А. (2022) Продукция цитокинов в культуре клеток крови больных алкогольной зависимостью и маркеры окислительного стресса аутологичной плазмы, *Клет. Технол. Биол. Мед.*, **1**, 45-48, <https://doi.org/10.47056/1814-3490-2022-1-45-48>.
22. Dong, D., Zhong, W., Sun, Q., Zhang, W., Sun, X., and Zhou, Z. (2016) Oxidative products from alcohol metabolism differentially modulate pro-inflammatory cytokine expression in Kupffer cells and hepatocytes, *Cytokine*, **85**, 109-119, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.06.014>.
23. Jacob, K. D., Noren Hooten, N., Trzeciak, A. R., and Evans, M. K. (2013) Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease, *Mech. Ageing Dev.*, **134**, 139-157, <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.02.008>.
24. Gladyshev, V. N., Kritchevsky, S. B., Clarke, S. G., Cuervo, A. M., Fiehn, O., de Magalhães, J. P., Mau, T., Maes, M., Moritz, R., Niedernhofer, L. J., Van Schaftingen, E., Tranah, G. J., Walsh, K., Yura, Y., Zhang, B., and Cummings, S. R. (2021) Molecular damage in aging, *Nat. Aging*, **1**, 1096-1106, <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00150-3>.
25. Spiteller, G. (2001) Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases, *Exp. Gerontol.*, **36**, 1425-1457, [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(01\)00131-0](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(01)00131-0).

## ASSOCIATIONS OXIDATIVE STRESS PERIPHERAL MARKERS WITH CLINICAL CHARACTERISTICS AND INFLAMMATORY FACTORS IN ALCOHOLIC PATIENTS

V. D. Prokopieva<sup>1\*</sup>, T. P. Vetlugina<sup>1</sup>, E. V. Epimakhova<sup>1</sup>,  
A. S. Boiko<sup>1</sup>, and N. A. Bokhan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,  
634014 Tomsk, Russia, e-mail: valyaprok@mail.ru

<sup>2</sup> Tomsk State University, 634050 Tomsk, Russia

A fundamental problem in narcology is to clarify the mechanisms of development of alcohol dependence (AD), in the pathogenesis of which disturbances in redox processes and inflammation play an important role. Identification of associations between biological and clinical parameters clarifies the molecular mechanisms of disease pathogenesis. The aim of the work was to study peripheral markers of oxidative stress (OS) in patients with AD in the early period of post-abstinence state and to identify their relationship with the clinical characteristics of the disease and inflammatory factors. The parameters of 84 male AD patients were determined; the average age was  $44.3 \pm 8.2$  years. Clinical characteristics were analyzed: patient age, age of alcohol withdrawal syndrome (AWS) formation, duration of the disease, duration of AWS. OS markers were determined in blood plasma – protein oxidation products (carbonyl proteins, CP) using 2,4-dinitrophenylhydrazine; lipids (products reacting with thiobarbituric acid (TBA), TBA-RP); DNA (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OH-dG). Inflammatory mediators – proinflammatory cytokines (IFNy, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A, TNF $\alpha$ ) were determined in blood serum. Control for biological studies – blood samples of 80 conditionally healthy men, average age  $40.9 \pm 9.6$  years. In patients with AD, an increase in CP, TBA-RP and all cytokines was detected compared to controls ( $p < 0.001$ ); the concentration of 8-OH-dG did not differ from the control. The following were found: a direct connection between TBA-RP and the duration of the disease; inverse relationship between CP and the age of formation and duration of AWS. CP had an inverse relationship with IL-6. Positive correlations were found between 8-OH-dG and IL-6, TBA-RP and IL-8, TBA-RP and TNF $\alpha$ . Thus, the early period of the post-withdrawal state in AD patients is characterized by pronounced OS and inflammation. The results obtained expand knowledge about the integrative contribution of OS and inflammation factors to the pathogenesis of AD and can be used in the development of new treatment methods.

**Keywords:** oxidative stress markers, proinflammatory cytokines, alcohol dependence

## ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ АЗИТРОМИЦИНОМ: НОВЫЕ ДАННЫЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ НА БУДУЩЕЕ

© 2024 М.И. Айрапетов<sup>1,2\*</sup>, С.О. Ереско<sup>1,3</sup>, С.А. Шамаева<sup>1</sup>, Е.Р. Бычков<sup>1</sup>,  
А.А. Лебедев<sup>1</sup>, П.Д. Шабанов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,

197376 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: interleukin1b@gmail.com

<sup>2</sup> Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, 194044 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет  
информационных технологий, механики и оптики, 197022 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 02.06.2024

После доработки 07.10.2024

Принята к публикации 09.10.2024

При длительном поступлении этанола в организм развиваются нарушения в эмоциональном спектре, отмечаются проблемы с памятью. Эти симптомы могут быть опосредованы развитием нейрохимических изменений в гиппокампе головного мозга. Несмотря на наличие данных, свидетельствующих об уязвимости гиппокампа при хронической алкогольной интоксикации и развитии в этой области мозга нейровоспаления и нейродегенерации, ключевые молекулярные механизмы не определены. Цель исследования заключалась в изучении изменений со стороны иммунной системы на периферии, а также в гиппокампе головного мозга крыс при воздействии этанола и при фармакологической коррекции этих изменений азитромицином (АЗМ). Моделирование длительного воздействия этанола было выполнено путем введения крысам 20%-ного раствора этанола (4 г/кг) на протяжении 4-х недель. Был выполнен общий биохимический и клинический анализ крови у животных. В гиппокампе оценивали уровень экспрессии генов цитокинов (*Il1β*, *Ccl2*, *Il6*, *Il11*, *Tnfa*, *Tgfb*) и генов системы toll-подобных рецепторов (*Tlr3*, *Tl4*, *Tlr7*, *Nfkb1*, *Hmgb1*) и связанных с системой TLR молекул микроРНК (miR-182, miR-155-5p, miR-96-5p, miR-let-7b). Также оценивали в гиппокампе содержание белка IL-1β. Длительная алкоголизация вызвала повышение уровня мРНК и белка IL-1β, снижение уровня мРНК TNFa, IL11, TLR3 и TLR7. Содержание miR-let-7b, miR-96, miR-155 было понижено в гиппокампе при длительной алкоголизации. В условиях отмены этанола сохранялся повышенный уровень мРНК и белка IL-1β и уровень мРНК *Hmgb1*. Уровень мРНК *Tlr3* при отмене был снижен. Введение АЗМ позволило снизить в условиях отмены этанола уровни мРНК *Il1β*, *Tlr3* и *Hmgb1*, а при более высоких дозировках препарата было отмечено снижение уровня белка IL-1β в гиппокампе мозга крыс. Таким образом, наше исследование позволило получить новые сведения о механизмах развития нейровоспаления в гиппокампе мозга при длительном воздействии этанола и при его отмене. Полученные результаты позволили наметить ряд задач для последующих исследований в этом направлении.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** этанол, гиппокамп, toll-подобные рецепторы, цитокины, IL-1β, микроРНК, азитромицин.

DOI: 10.31857/S0320972524110052 EDN: IKUDLY

### ВВЕДЕНИЕ

С некоторой периодичностью в свет выходят новые публикации, которые позволяют расши-

рить современные знания о нейровоспалительной теории алкоголизма, которая развивается уже более 20 лет, и ее суть заключается в том, что длительное поступление этанола в организм

Принятые сокращения: АЗМ – азитромицин; TLR – toll-подобные рецепторы.

\* Адресат для корреспонденции.

активирует механизмы нейровоспаления, которые ведут к развитию нейродегенерации в головном мозге и, как следствие, к нарушению согласованного исполнительного контроля над высшими психическими функциями мозга, что усугубляет течение заболевания [1–4]. То, что хроническое поступление алкоголя вызывает гибель нервных клеток, на данный момент мы можем признать установленным фактом [1–8], однако первые наблюдения в этом направлении мы встречаем еще в работах С.С. Корсакова [9]. Позже эти наблюдения были названы синдромом Корсакова (или корсаковский синдром алкогольный), который возникает вследствие хронической алкогольной интоксикации. При данном состоянии развиваются малообратимые нарушения памяти, лекарственная терапия неэффективна, и реабилитация при корсаковском синдроме направлена, прежде всего, на адаптацию больного к жизнедеятельности при ограниченных возможностях памяти [6, 8–10]. В эмоциональном плане у больных могут преобладать эйфория и благодушие или, наоборот, безразличие и вялость [11]. Такой синдром является тяжелым проявлением нейродегенерации, которая может развиваться на фоне хронического поступления этанола в организм, однако в работах последних лет имеются сведения о развитии признаков нейродегенерации при более коротких и легких формах воздействия этанола в эксперименте, т.е. значительно чаще, чем только при корсаковском синдроме алкогольном [8, 9]. Имеется предположение, что такие патогенетические процессы могут стоять на пути перехода от любителей алкоголя (пьянство) к алкоголизму в ранней его стадии, а далее, приводить к более тяжелым формам алкоголизма [8, 9]. Связано это, вероятно, с тем, что гибель клеток в различных структурах головного мозга при хроническом поступлении этанола нарушает согласованную работу головного мозга, внося изменения в психофизиологические механизмы контроля поведения организма, что формирует те симптомы, которые характерны для алкоголизма – непреодолимое желание к употреблению алкоголя, когнитивные и эмоциональные расстройства [1, 2, 12, 13].

Полученные данные при изучении посмертных образцов головного мозга у пациентов с хроническим употреблением алкоголя показали наличие нейровоспалительного процесса, который развивается в коре головного мозга [8, 9]. Такие сведения навели исследователей на предположение о том, что формирование алкогольной зависимости может быть сопряжено не только с дисфункциями в нейромедиаторных и нейропептидных системах, но также опосредовано различными факторами нейровоспаления [8–11]. Система toll-подобных рецепторов (TLR), являясь

ключевым звеном врожденного иммунитета, участвует в регуляции синтеза многих факторов воспаления [1, 2, 14, 15]. Она включает в себя эндогенные агонисты TLR (например, Hmgb1 и ряд микроРНК), TLR-рецепторы и внутриклеточные адаптерные белки (в том числе MyD88, TRIF, IRF, NF-кB1 и др.), которые инициируют активацию генов нейровоспаления [1, 2, 14, 15].

Моделирование длительного воздействия этанола как *in vitro*, так и *in vivo* позволило получить сведения о том, что система toll-подобных рецепторов действительно реагирует в клетках нервной ткани на поступление этанола – отмечается рост экспрессии генов и белков TLR, их эндогенных агонистов, а также повышается уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов [1–4]. Однако, несмотря на наличие таких сведений, все еще не существует полного понимания того, как оказывает влияние длительно поступающий этанол на данную систему в разных структурах головного мозга. В первую очередь представляют интерес те структуры, которые являются элементами так называемой системы подкрепления и ассоциированы с развитием алкогольной аддикции [16–18]. Одной из таких ключевых структур является гиппокамп [16–18]. Представляется интересным оценить уровень экспрессии элементов системы TLR и связанных с ней молекул в гиппокампе при моделировании длительного воздействия этанола, а также в состоянии отмены этанола и при фармакологической коррекции с помощью азитромицина (АЗМ), который, по данным литературы, зарекомендовал себя эффективным соединением для снижения нейровоспаления [19–22], что и послужило целью нашей работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** В эксперименте использовали 56 взрослых самцов крыс породы Вистар (средняя масса тела – 250–300 г, возраст – 3 месяца), которые были приобретены в питомнике «Рапполово» (Россия). Перед началом эксперимента животные были разделены на группы (по 8 животных в каждой группе): контрольная группа, группа длительного воздействия этанола, пять групп животных с отменой длительного воздействия этанола («отмена этанола, 7-е сутки»; «отмена этанола + вода»; «отмена этанола + АЗМ, 40 мг/кг»; «отмена этанола + АЗМ, 80 мг/кг»; «отмена этанола + АЗМ, 160 мг/кг»). Животные получали свободный доступ к стандартному корму для крыс.

**Моделирование длительного воздействия этанола и состояния отмены.** Способ моделирования был нами использован на основе имеющихся

в литературе с некоторыми модификациями [23–25]. Длительное воздействие этанола выполнялось путем внутрижелудочного введения 20%-ного раствора этанола с помощью желудочно-го зонда из расчета 4 г/кг чистого этанола с понедельника по пятницу в течение 4-х недель (всего 20 введений). Контрольные животные получали эквивалентные объемы воды по такой же схеме. При этом все животные имели свободный доступ к воде. Декапитацию животных производили на последний день алкоголизации через 2 часа после последнего введения этанола (группа «этанол»). Для моделирования состояния отмены этанола животным прекращалось введение этанола, и на 7-е сутки отмены этанола животных выводили из эксперимента (группа «отмена этанола, 7-е сутки»).

**Инъекции фармакологических средств.** По окончании длительного воздействия этанола животным три дня внутрижелудочно через зонд вводили азитромицин (40 мг/кг, 80 мг/кг, 160 мг/кг; «Хемомицин», порошок для приготовления суспензии для приема внутрь («Hemofarm»,

Сербия)). Крысам контрольной группы вводили соответствующий объем воды (группа «отмены этанола + вода»). Декапитацию животных производили во всех группах на 7-е сутки отмены этанола.

**Забор биоматериала.** Границы необходимых структур мозга были определены в соответствии с атласом мозга крысы [26]. Образцы мозга немедленно замораживали и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Кровь извлекали в момент декапитации животных в специально подготовленные пробирки для проведения биохимического и клинического анализа крови.

**Анализ крови.** Измерение клинических показателей крови проводили в первые 2 часа после ее забора на ветеринарном гематологическом анализаторе («Mindray», Китай). Определение биохимических показателей в сыворотке крови было выполнено по стандартной методике на автоматическом биохимическом анализаторе («Erba mannheim xl-100», Германия).

**Выделение РНК из образцов мозга.** Выделение тотальной РНК выполняли, используя

Таблица 1. Последовательность праймеров

Ген	Праймеры	
	Прямой (5'→3')	Обратный (5'→3')
<i>Tlr3</i>	AACTGGAGAACCTCCAAGA	CACCTGGAGAAAACCTTTT
<i>Tlr4</i>	ACTCTGATCATGGCATTGTT	GTCTCAATTCACACCTGGA
<i>Tlr7</i>	TGAAAATGGTATTCATGTG	TAAGGTAAGGTTGGTGGTA
<i>NfkB1</i>	ATACTGCTTGACTCACTCC	AGGTATGGGCCATCTGTT
<i>Hmgb1</i>	CTCTGATGCAGCTTATACGA	AAAAGACTAGCTTCCCCTTG
<i>Il1β</i>	TGTCTGACCCATGTGAGCTG	TTTGGGATCCACACTCTCCAG
<i>Ccl2</i>	AAGATGATCCCAATGAGTCG	TGGTGACAAATACTACAGCTT
<i>Tnfa</i>	CACGTCGTAGCAAACAC	TATGAAATGGCAAATCGGCT
<i>Il13</i>	TGTAACCAAAAGGCCTCGGA	TGGCCATAGCGAAAAGTTG
<i>Tgfb</i>	GGACTACTACGCCAAAGAAG	GGACTACTACGCCAAAGAAG
<i>Il11</i>	GGGACATGAACGTGTTGT	GGTAGGTAGGGAGTCCAGAT
<i>Il6</i>	ACTTCACAAGTCGGAGGCTT	AATTGCCATTGCAACAACCTTTTC
<i>miR-182</i>	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACCG	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-155-5p</i>	TTAATGCTAATTGTGATAGGGGT	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-96-5p</i>	TTTGGCACTAGCACATTTTGCT	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-let-7b</i>	GC GGCGCTATACAAACCTACTGC	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>U6</i>	TGCTCGGCAGCACATATAC	AGGGGCCATGCTAATCTTCT
<i>Gapdh</i>	GCCAGCCTCGTCTCATA	GTGGGTAGAGTCATACTGGA

реагент ExtractRNA («Евроген», Россия), в полном соответствии с инструкцией производителя. Чистоту выделения и концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330 («Implen», Германия); по отношению A260/A280 (в норме  $\geq 1,8$ ) оценивали чистоту выделенного продукта.

**ОТ-ПЦР.** Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 20 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit («Евроген») в полном соответствии с инструкцией производителя. Перед проведением ОТ для микроРНК было выполнено полиаденилирование микроРНК с помощью полиг(A)-полимеразы *Escherichia coli* («New England Biolabs Inc.», США) по ранее описанной методике [27]. ОТ для микроРНК проводили в 10 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit и специфического PolyT-адаптера (5'-GCGAGCACAGAATTAAATCGACTCACTATAGGTTT-TTTTTTTTVN-3').

Концентрацию полученной кДНК в ходе ОТ измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени проводили в амплификаторе Mx3005P («Stratagene», США) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green («Евроген») и смесь специфических прямых и обратных праймеров (табл. 1) («Beagle», Россия). Относительный уровень содержания мРНК и мiР рассчитывался методом  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , содержание мРНК нормировали к уровню экспрессии гена *Gapdh*, уровень мiР нормировали к уровню экспрессии гена *U6*. Все реакции проводили в трех повторах.

**Иммуноферментный анализ.** Замороженные образцы гиппокампа мозга до проведения иммуноферментного анализа (ИФА) гомогенизировали на криомельнице («CRYOMILL», Китай); далее, полученный замороженный порошок ткани растворяли в 1 мл PBS (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4) и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g. Собираемые супернатанты аликвотировали по 100 мкл и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения ИФА. Измерение белка IL-1 $\beta$  выполнено с помощью коммерческого набора для проведения ИФА («CloudClone Corp.», США) по протоколу. По окончании реакции поглощение измеряли на планшетном фотометре Synergy 2 («Bio Tek», США). Общий белок определяли методом Бредфорда с использованием готового набора Bio-Rad Protein Assay Kit («Bio-Rad», США). Измерение проводили в трех повторах.

**Статистическая обработка.** Для статистической обработки полученных данных использовалась программа Graph Pad Prism v.6. Все данные были представлены как среднее  $\pm$  стандартное

отклонение. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна–Уитни для малых независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при значении  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Биохимические и клинические показатели крови при длительном воздействии этанола.** Для оценки общего состояния организма животных при моделировании длительного воздействия этанола мы посчитали целесообразным оценить биохимические и клинические показатели параметров крови у животных.

Результаты анализа позволили выявить повышенные уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) и альбумина в сыворотке крови у экспериментальных животных (табл. 2). Повышение уровня альбумина может отражать изменения в степени дегидратации организма, что характерно для пациентов с хроническим алкоголизмом, а повышение уровня АЛТ служит признаком возможного поражения гепатоцитов у животных в эксперименте, что также характерно для состояния организма с длительной алкогольной интоксикацией [8, 28, 29].

Результаты клинического анализа крови показали снижение уровня лимфоцитов и повышение уровня моноцитов у животных с длительным потреблением этанола (табл. 3).

Данные показатели отражают наличие ответной реакции со стороны иммунной системы,

**Таблица 2.** Показатели биохимического анализа сыворотки крови крыс при длительном воздействии этанола

Показатель	Контроль (n = 8)	Этанол (n = 8)
АЛТ, МЕ/литр	$18,63 \pm 2,91$	$28,14 \pm 5,64^*$
Глюкоза, ммоль/литр	$4,39 \pm 0,43$	$4,01 \pm 1,08$
Креатинин, мкмоль/литр	$25,43 \pm 7,65$	$28,16 \pm 3,58$
Мочевина, ммоль/литр	$3,48 \pm 0,54$	$4,07 \pm 0,36$
Альбумин, г/литр	$44,87 \pm 3,99$	$55,43 \pm 4,86^*$
АСТ, МЕ/литр	$69,53 \pm 14,67$	$64,44 \pm 6,35$
Общий белок, г/литр	$59,30 \pm 8,59$	$67,38 \pm 4,48$

Примечание. АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартатаминотрансфераза; \*  $p \leq 0,05$  – по отношению к контрольной группе.

**Таблица 3.** Показатели клинического анализа крови крыс при длительном воздействии этанола

Показатель	Контроль (n = 8)	Этанол (n = 8)
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /литр	8,52 ± 1,82	6,12 ± 2,22
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /литр	0,61 ± 0,51	0,98 ± 0,53
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /литр	7,37 ± 2,10	4,01 ± 1,76*
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /литр	0,5 ± 0,46	1,10 ± 0,69*
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /литр	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /литр	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /литр	8,04 ± 0,41	7,73 ± 0,51
Гемоглобин, г/литр	141,5 ± 8,10	145,0 ± 8,74
Гематокрит, %	41,4 ± 1,84	41,9 ± 2,44
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /литр	977,33 ± 156,42	754,01 ± 265,26

Примечание. \* p ≤ 0,05 – по отношению к контрольной группе.

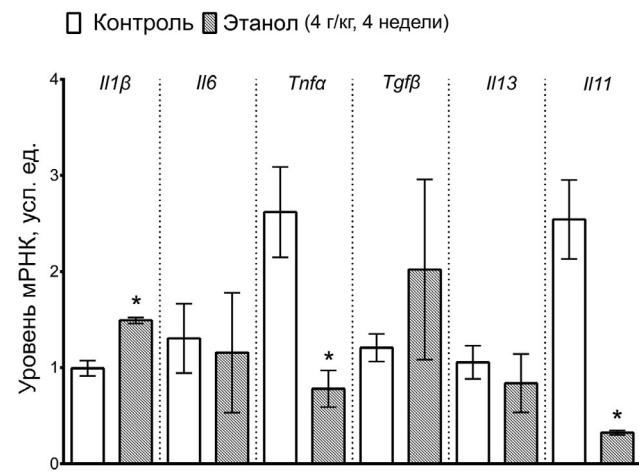
которая вызвана длительным поступлением этанола в организм животных. Повышение уровня моноцитов может отражать наличие в той или иной мере хронического периферического воспалительного ответа, а снижение уровня лимфоцитов может быть показателем общего снижения активности адаптивной иммунной системы, что нередко отмечается в условиях длительного поступления этанола в организм [29–31].

Таким образом, выполненное нами моделирование длительного воздействия этанола на организм привело к ряду изменений в параметрах крови у животных, что является признаком развития патологического состояния. Стоит отметить тот факт, что масса тела животных не имела значимых различий между экспериментальной и контрольной группами животных на протяжении всего эксперимента, а животные, которые проявляли признаки той или иной болезни (например, приобретенная травма в ходе эксперимента), были выведены из эксперимента.

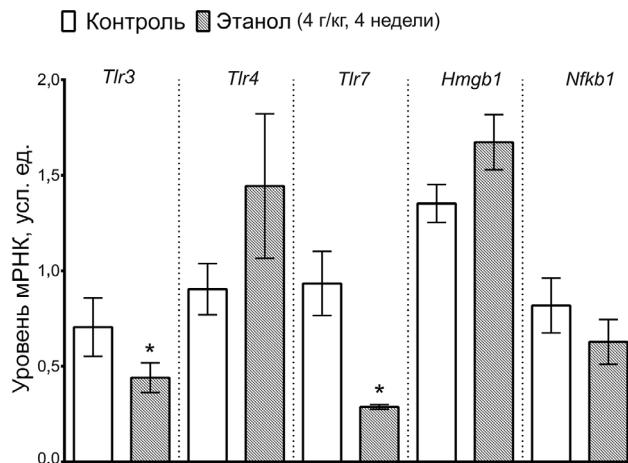
**Экспрессия генов цитокинов и генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс при длительном воздействии этанола.** Длительное воздействие этанола вызвало повышение уровня экспрессии

гена *Il1β* и снижение уровня экспрессии генов *Tnfα* и *Il11* в гиппокампе мозга крыс (рис. 1). Нами не выявлено значимых изменений на уровне мРНК в экспрессии генов *Il6*, *Tgfβ* и *Il13* (рис. 1). Продукт гена *Il1β* является ключевым провоспалительным цитокином, и его повышение часто ассоциируют с развитием нейровоспаления. Ранее исследователи указывали на повышение уровня его экспрессии в головном мозге при длительном воздействии этанола [12, 32, 33]. Полученные нами данные о повышенном уровне экспрессии этого гена в гиппокампе мозга крыс при длительном воздействии этанола имеют сходный характер с имеющимися ранее результатами, которые были получены другими исследователями в структурах мозга, а также в гиппокампе, но в других условиях моделирования длительного воздействия этанола [12, 32, 33]. Уровень экспрессии гена *Il6* в нашем эксперименте не был изменен в гиппокампе, а экспрессия гена *Tnfα* снижена (рис. 1). Оба цитокина, по данным последних лет, обладают двойственными эффектами в отношении развития воспалительных событий – при одних состояниях они выступают как провоспалительные, а при других – могут проявлять противонейровоспалительные эффекты [15, 34]. Таким образом, относительно снижения уровня экспрессии гена *Tnfα* делать однозначные выводы не представляется возможным, здесь потребуются дополнительные наблюдения в будущем.

Интересным для нас наблюдением служит сниженная экспрессия гена *Il11* (рис. 1). Имеются сведения, что этот цитокин в нервной ткани проявляет противовоспалительные эффекты, что было показано в исследованиях при моделировании различных патологий [35]. Возможно, мы наблюдаем проявление сниженных механизмов сдерживания провоспалительных процессов,



**Рис. 1.** Содержание мРНК цитокинов в гиппокампе мозга у крыс с длительным потреблением этанола; \* p ≤ 0,05 – по отношению к контрольной группе



**Рис. 2.** Относительный уровень содержания мРНК генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс с длительным потреблением этианола; \*  $p \leq 0,05$  – по отношению к контрольной группе

которые развиваются на фоне хронического поступления этианола в организм. Сниженный уровень экспрессии гена *P11* может являться одной из причин дисфункций в этих механизмах, и изучение этого цитокина в будущем может позволить найти новую молекулярную мишень для коррекции нейровоспаления. Эти предположения требуют дальнейших исследований.

Кроме цитокинов, мы оценивали экспрессию некоторых генов системы toll-подобных рецепторов. Нами не было выявлено значимых изменений в экспрессии генов *Tlr4*, *Hmgb1* и *NfkB1*, однако мы выявили пониженные уровни экспрессии генов *Tlr3* и *Tlr7* (рис. 2). Ранее в работах исследователей сообщалось о повышении уровня экспрессии гена *Tlr7*, и это повышение было связано с проявлениями нейродегенеративного процесса [1, 5]. Возможно, получение результата, отличающегося от ранее описанных, характеризует региональную особенность экспрессии данного гена или используемая нами модель длительного воздействия этианола умеренными дозами позволила получить иные сведения.

В предыдущих наших работах также был замечен тот факт, что в условиях длительного воздействия этианола система TLR подвержена минимальным изменениям, однако отмена длительной алкоголизации вызывает резкий дисбаланс в их экспрессии [36–38]. Так, например, подобные результаты мы получили в прилежащем ядре головного мозга крыс в аналогичной модели длительного воздействия этианола [37]. Таким образом, представляется интересным изучение содержания мРНК и белков цитокинов и других компонентов TLR-сигнализации в гиппокампе не только в условиях длительной алкоголизации, но и при отмене.

**Таблица 4.** Относительный уровень экспрессии миРНК в гиппокампе мозга крыс в эксперименте, усл. ед.

miR	Контроль (n = 8)	Этанол (n = 8)
miR-let-7b	0,78 ± 0,13	0,43 ± 0,19*
miR-96	1,08 ± 0,34	0,38 ± 0,15*
miR-155	0,96 ± 0,37	0,51 ± 0,25*
miR-182	1,01 ± 0,25	0,79 ± 0,17

Примечание. \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе.

**Изучение содержания миРНК в гиппокампе головного мозга крыс при длительном воздействии этианола.** Анализ относительного содержания молекул миРНК в гиппокампе головного мозга крыс показал, что miR-let-7b, miR-96 и miR-155 были значимо изменены в группе животных с длительным воздействием этианола – уровень miR-let-7b понизился в 1,8 раза, miR-96 – понизился в 2,8 раза, miR-155 – понизился в 1,9 раза (табл. 4).

Исследуемые в работе молекулы miR были нами отобраны из тех соображений, что они имеют функциональную связь с TLR-сигнальными путями [39–43]. Известно, что miR-let-7b является эндогенным агонистом TLR7 [1, 12]. Сообщается, что изменение экспрессии miR-let-7b может иметь функциональную связь с TLR7-сигнальным каскадом реакций [5, 12].

При повышении активности TLR4-сигнализации наблюдается повышение miR-155 в клетках микроглии головного мозга мышей, тогда как у нокаутных мышей по гену *Tlr4* (TLR4-KO) этого не отмечается [41]. У мышей TLR4-KO не изменяется содержание miR-96 в коре головного мозга, тогда как длительная алкоголизация у мышей дикого типа снижала уровень miR-96 [42, 43]. Имеются данные на примере miR-182-5p, где сообщается о наличии функциональных взаимодействий класса miR-183C (в него входят miR-96 и miR-182) с белком TLR4 [42, 43]. Стоит отметить и тот факт, что не только miR-let7b (эндогенный агонист TLR7) был снижен в нашем эксперименте, но и уровень мРНК *Tlr7*, что вызывает интерес к дальнейшим исследованиям для установления возможной функциональной связи между наблюдаемыми изменениями.

**Экспрессия генов цитокинов и генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс в условиях отмены длительного воздействия этианола.** О состоянии исследуемой нами системы генов в условиях отмены этианола практически ничего не известно. Имеющиеся небольшие сведения в этом

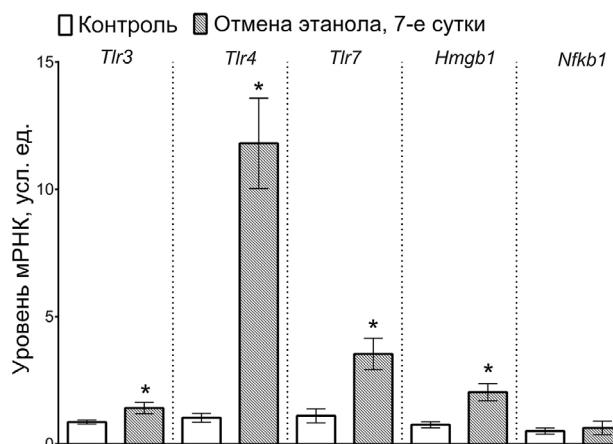


Рис. 3. Содержание мРНК цитокинов и генов системы TLR в гиппокампе мозга у крыс при отмене этанола; \*  $p \leq 0,05$  – по отношению к контрольной группе

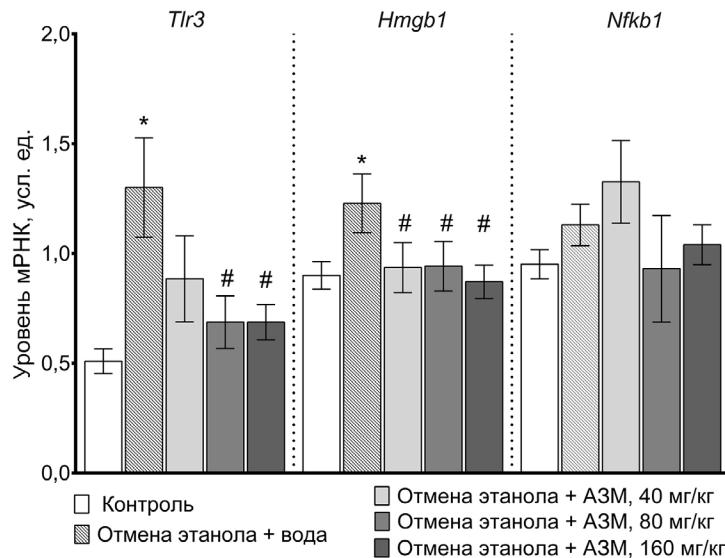
направлении в основном получены при моделировании хронических и субхронических форм воздействия этанола либо на следующий день после отмены [2, 13]. В текущем эксперименте мы выполнили анализ экспрессии исследуемых генов через 7 дней после отмены длительной алкоголизации (рис. 3).

Результаты позволили получить сведения о том, что через 7 дней после отмены уровни экспрессии генов *Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr7* и *Hmgb1* были повышенны, уровень экспрессии гена *Nfkbl* не был подтвержден изменениям (рис. 3). Наиболее значимое повышение экспрессии было характерно для гена *Tlr4*. Полученные сведения позволяют сделать предположение о вовлеченностии системы toll-подобных рецепторов в патогенетические механизмы в гиппокампе мозга, развивающиеся на фоне длительного поступления этанола в организм. Нами были получены данные, что в группе животных с длительным воздействием этанола уровни экспрессии генов *Tlr3* и *Tlr7* были понижены (рис. 2), тогда как в условиях отмены этанола наблюдается повышение уровня их экспрессии (рис. 3). Полученные результаты согласуются с теми данными, что были ранее получены исследователями в других структурах головного мозга, а также на аутопсийном материале от пациентов с хронической алкогольной интоксикацией [2, 13, 24]. В серии работ, целью которых служило определение функционального значения таких изменений, были получены сведения о том, что повышение экспрессии генов *Tlr4* и *Hmgb1* приводит к активации генов провоспалительных цитокинов и, как следствие, к развитию нейровоспаления [12, 13, 24, 33, 41]. Повышение активности генов *Hmgb1* и *Tlr7* ведет к активации механизмов запограммированной клеточной гибели в нейрональных культурах (в исследова-

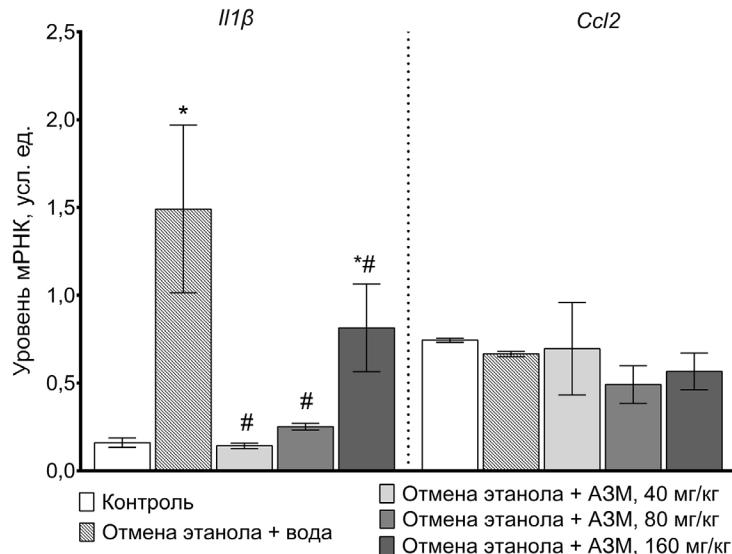
ниях *in vitro*), т.е. к проявлению признаков нейродегенерации [5]. Что касается гена *Tlr3*, то имеются сведения о том, что активация продукта экспрессии данного гена, эндосомального белка-рецептора TLR3, специфическими агонистами ведет к повышению уровня добровольного потребления этанола у животных [2]. Таким образом, отмеченное нами изменение в экспрессии данных генов свидетельствует о наличии стойких патологических процессов в гиппокампе мозга крыс через 7 дней после отмены этанола, и система исследуемых нами генов участвует в их реализации. Полученные данные еще раз указывают на значимость проведения исследований в этом направлении.

**Применение азитромицина для коррекции экспрессии генов цитокинов и генов системы toll-подобных рецепторов в условиях отмены длительного воздействия этанола.** Мы представляем результаты своих первых наблюдений, в задачи которых входила оценка экспрессии генов цитокинов и генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс в условиях отмены длительного воздействия этанола и при фармакологической коррекции азитромицином. На различных моделях патологических состояний нервной системы АЗМ зарекомендовал себя как эффективный нейропротектор, который снижает уровень факторов воспаления и замедляет процесс гибели нервных клеток [19–22]. Точный механизм остается не известен. Так, например, существуют предположения, что эффект может реализовываться через белковый комплекс NF-кБ [19–22], который является ключевым на путях передачи внеклеточных сигнальных путей от TLR [14, 15]. Мы поставили задачу оценить возможное нейропротекторное влияние АЗМ на исследуемую нами систему генов TLR в гиппокампе мозга в условиях отмены длительного воздействия этанола.

В данном исследовании нами также были получены данные по экспрессии генов *Tlr3*, *Hmgb1* и *Nfkbl* на 7-е сутки отмены длительного воздействия этанола – экспрессия генов *Tlr3* и *Hmgb1* повышена, а уровень экспрессии гена *Nfkbl* не изменен (рис. 4). Выполненное введение АЗМ позволило скорректировать уровень экспрессии генов *Tlr3* и *Hmgb1* (рис. 4). По отношению к гену *Hmgb1* положительным эффектом обладали все три используемые дозировки препарата, однако по отношению к гену *Tlr3* АЗМ в самой низкой дозировке (40 мг/кг) не оказал эффекта (рис. 4). На уровень экспрессии гена *Nfkbl* препарат не оказал влияния (рис. 4). Кроме того, мы оценили влияние АЗМ на уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов *P1β* и *Ccl2* в условиях отмены этанола (рис. 5). Ранее эффект АЗМ исследовали по отношению к этим цитокинам



**Рис. 4.** Содержание мРНК генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс при фармакологической коррекции азитромицином в условиях отмены этанола; \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе; #  $p < 0,05$  – по отношению к группе «отмена этанола + вода»



**Рис. 5.** Содержание мРНК цитокинов в гиппокампе мозга крыс при фармакологической коррекции азитромицином в условиях отмены этанола; \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе; #  $p < 0,05$  – по отношению к группе «отмена этанола + вода»

при других патологических состояниях, были получены сведения о способности АЗМ корректировать уровень содержания этих цитокинов [19–22]. В более ранней нашей работе мы также представили результаты наблюдений за экспрессией генов этих цитокинов на 7-е сутки отмены этанола, однако там были получены иные сведения о состоянии их экспрессии – было выявлено повышение уровня экспрессия гена *Ccl2*, а экспрессия гена *Il1β* была без значимых изменений [36]. Можем предполагать, что такие расхождения могут быть вызваны разными способами моделирования длительного воздействия этанола. Результаты

анализа данного эксперимента показали повышенное уровня экспрессии гена *Il1β* и отсутствие значимых изменений в экспрессии гена *Ccl2* (рис. 5). Выполненное введение АЗМ позволило снизить повышенный уровень экспрессии гена *Il1β* при всех используемых нами дозировках (рис. 5).

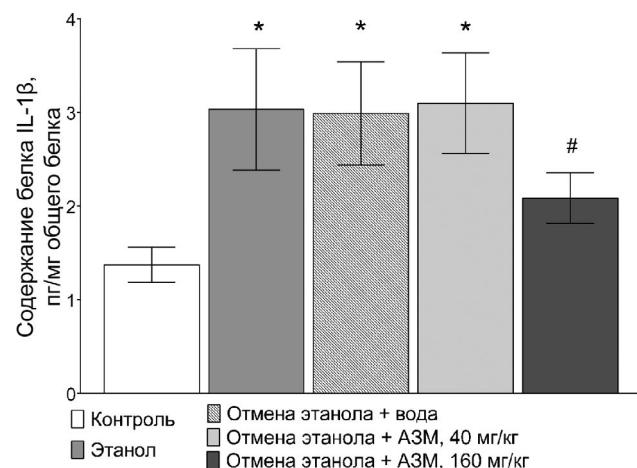
**Уровень белка IL-1β при длительном воздействии этанола, отмене этанола и фармакологической коррекции азитромицином в гиппокампе мозга крыс.** Мы сосредоточили свое внимание на измерении уровня белка IL-1β в гиппокампе мозга крыс. Данный белок является ключевым провоспалительным цитокином – при развитии

нейровоспаления уровень белка повышается в тканях мозга [1, 2, 13].

Роль белка IL-1 $\beta$ , опосредующего развитие дисфункций со стороны когнитивных и эмоциональных проявлений, исследуется при различных патологиях. Так, в эксперименте у мышей, подвергнутых психосоциальному стрессу, наблюдалось снижение социального взаимодействия и нарушение рабочей памяти, но эти изменения были предотвращены нокаутом *L1r1* (ген белка-рецептора к IL-1), а вирусно-опосредованная селективная делеция *L1r1* в нейронах гиппокампа также показала, что этот рецептор в гиппокампе имеет решающее значение для стресс-индуцированных поведенческих дисфункций. Кроме того, показано даже то, что вызванный стрессом транспорт моноцитов в мозг блокируется нокаутом *L1r1* [44]. В другом исследовании использовали лентивирусную конструкцию для индукции гиперэкспрессии IL-1 $\beta$  в дорсальном гиппокампе крыс. Наблюдалось снижение нейрогенеза в гиппокампе наряду со снижением уровня ветвления нейритов на нейронах [45]. Имеются сведения, что провоспалительные цитокины подавляют долговременную потенциацию в гиппокампе, тем самым внося изменения в ключевые механизмы формирования памяти. Используя синаптосомы и культуры нейронов, исследователи выявили, что IL-1 $\beta$  напрямую подавляют пластичность гиппокампа через нейрон-специфические механизмы. В исследовании также сообщается, что IL-1 $\beta$  может подавлять долговременную потенциацию непосредственно в синапсах у мышей [46]. Кроме того, известно, что нейроны гиппокампа экспрессируют высокие уровни IL-1R1 [46]. Эти данные указывают на вовлеченность цитокина в нарушение механизмов функционирования памяти. Имеется еще целый ряд исследований в подтверждение этих предположений, полученных на различных моделях в экспериментах на животных [46].

Результаты нашего исследования показали, что как в группе длительного воздействия этанола, так и в группе отмены этанола на 7-е сутки отмечаются повышенные уровни белка IL-1 $\beta$  (рис. 6). Таким образом, исходя из имеющихся сведений об IL-1 $\beta$ , можем делать выводы, что наблюдаемое нами повышение данного белка в гиппокампе (более чем в 2 раза) при длительном поступлении этанола в организм может быть причиной развития эмоциональных и когнитивных расстройств, а также проблем со стороны функционирования механизмов памяти.

Кроме того, в эксперименте нами были применены две дозировки азитромицина для проверки его эффективности в отношении коррекции содержания белка IL-1 $\beta$ . Использование азитро-



**Рис. 6.** Содержание белка IL-1 $\beta$  в гиппокампе мозга крыс; \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе; #  $p < 0,05$  – по отношению к группе «отмена этанола + вода»

мицина в дозировке 40 мг/кг не оказалось значимого эффекта, но в дозировке 160 мг/кг снизился уровень белка (почти до уровня контрольных значений), как по отношению к группе отмены этанола, так и по отношению к группе длительно алкоголизированных животных (рис. 6). При этом выполненный нами анализ на уровне мРНК показал эффективность при обоих использованных дозировках (40 мг/кг и 160 мг/кг) препарата (рис. 5). Таким образом, дозировка 40 мг/кг, которая достаточна для снижения уровня экспрессии гена *L1β*, является недостаточной для снижения уровня белкового продукта. Наблюдаемый эффект может быть опосредован влиянием азитромицина на механизмы созревания или деградации белка IL-1 $\beta$ . Белок IL-1 $\beta$  образуется в ходе протеолиза из своего предшественника про-IL-1 $\beta$ , и, несмотря на наблюдаемое нами снижение уровня продуктов транскрипции его гена в конкретный момент времени, повышенный уровень белка IL-1 $\beta$  может поддерживаться за счет его образования из молекул про-IL-1 $\beta$  в ходе посттрансляционных механизмов. Кроме того, известно, что механизмы деградации белка IL-1 $\beta$  также имеют сложный путь регуляции, которая опосредуется, в частности, белками матриксными металло-протеиназами [47, 48]. В будущем представляется интересным исследовать возможный вклад азитромицина в регуляцию путей, направленных на скорость деградации белка IL-1 $\beta$ . Можем предположить, что наблюдаемое сохранение повышенных уровней белка IL-1 $\beta$  при снижении уровня экспрессии его гена может быть объяснено активацией путей, ведущих к снижению скорости деградации белка. Имеются корреляционные данные в динамике, которые также свидетельствуют о наличии в расхождении со временем в уровнях

мРНК и белка IL-1 $\beta$  – при снижении уровня мРНК наблюдается тенденция к повышению уровня его белка [49].

Резюмируя полученные результаты по содержанию белка ключевого провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , мы наблюдаем наличие элементов нейровоспаления в гиппокампе мозга крыс при длительном воздействии этанола и при его отмене. Используемое нами соединение азитромицин, как и в работах других исследователей, при определенных дозировках обладает положительным эффектом в отношении снижения уровня нейровоспалительного медиатора IL-1 $\beta$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное нами моделирование длительного воздействия этанола умеренными дозами вызвало ряд изменений как в биохимических (повышение уровня АЛТ и альбуминов), клинических (повышение уровня моноцитов и снижение уровня лимфоцитов) параметрах крови, так и в системе нейровоспаления в гиппокампе мозга крыс. Мы анализировали уровень активности генов системы toll-подобных рецепторов, а также функционально связанные с этой системой молекулы миРНК (miR-let-7b, miR-96, miR-155, miR-182) и цитокины. Длительная алкоголизация послужила причиной повышенных уровней мРНК и белка цитокина IL-1 $\beta$ , пониженных уровней мРНК *Tnfa*, *Il11*, *Tlr3* и *Tlr7*. На 7-е сутки отмены этанола сохраняется повышенный уровень мРНК и белка цитокина IL-1 $\beta$ , а также уровень мРНК *Hmgb1*. Уровень мРНК *Tlr3* при отмене этанола, напротив, был повышен. Выполненное пероральное введение азитромицина позволило скорректировать некоторые биохимические изменения, развивающиеся при отмене этанола – были снижены повышенные уровни мРНК *Il11 $\beta$* , *Tlr3* и *Hmgb1*, а при более высоких дозировках было достигнуто снижение повышенного уровня белка IL-1 $\beta$  в гиппокампе мозга крыс. Содержание miR-let-7b, miR-96, miR-155 было понижено в гиппокампе в результате длительной алкоголизации. Данные молекулы функционально связаны с TLR, и изменения в их

содержании могут отражать или опосредовать (что первично, на данный момент не установлено) дисфункции в молекулярных механизмах функционирования toll-подобных рецепторов.

Изучение биохимических изменений в гиппокампе головного мозга крыс при моделировании длительного воздействия этанола и состояния отмены представляет большой интерес по причине наличия у пациентов с алкогольной аддикцией нарушений в механизмах запоминания и в эмоциональном спектре. Гиппокамп в этих процессах играет, несомненно, значимую роль, а оценка биохимических изменений может позволить получить новые сведения, которые пополнят понимание патофизиологических механизмов, развивающихся в этой структуре мозга при длительном поступлении этанола в организм.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, С.А. Шамаева, Е.Р. Бычков – получение и анализ данных, подготовка и написание статьи; А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов – разработка общей концепции исследования, подготовка финальной версии статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «ИЭМ» FGWG-2024-0015: «Нейробиологические механизмы патогенеза социально-значимых заболеваний и посттравматических расстройств. Новые подходы к моделированию патологических процессов и коррекции нарушений».

**Конфликт интересов.** Автор заявляет 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 правовым актам РФ и международных организаций. Работа рассмотрена и одобрена Этическим комитетом в области исследований на животных СПбГУ (заключение № 131-03-8 от 29.04.2024 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crews, F. T., Lawrimore, C. J., Walter, T. J., and Coleman, L. G. Jr. (2017) The role of neuroimmune signaling in alcoholism, *Neuropharmacology*, **122**, 56-73, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.01.031>.
2. Airapetov, M., Eresko, S., Lebedev, A., Bychkov, E., and Shabanov, P. (2021) The role of Toll-like receptors in neurobiology of alcoholism, *Biosci. Trends*, **15**, 74-82, <https://doi.org/10.5582/bst.2021.01041>.
3. Guerri, C., and Pascual, M. (2019) Impact of neuroimmune activation induced by alcohol or drug abuse on adolescent brain development, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **77**, 89-98, <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.11.006>.

4. Anand, S. K., Ahmad, M. H., Sahu, M. R., Subba, R., and Mondal, A. C. (2023) Detrimental effects of alcohol-induced inflammation on brain health: from neurogenesis to neurodegeneration, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **43**, 1885-1904, <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01308-2>.
5. Coleman, L. G., Zou, J., and Crews, F. T. (2017) Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7, *J. Neuroinflamm.*, **14**, 1-15, <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0799-4>.
6. Arts, N. J., Walvoort, S. J., and Kessels, R. P. (2017) Korsakoff's syndrome: a critical review, *Neuropsychi. Dis. Treat.*, **13**, 2875-2890, <https://doi.org/10.2147/NDT.S130078>.
7. Шабанов, П. Д. (1985) Экспериментальные нарушения памяти и их фармакологическая коррекция, *Вестн. АМН СССР*, **9**, 31-38.
8. Григоренко А. Я., Афанасьев В. В., Бабаханян Р. В. (2007) *Хроническая алкогольная интоксикация*, Издательство Р. Асланова «Юридический центр Пресс», СПб.
9. Корсаков С. С. (1887) *Об алкогольном параличе*, Диссертация, Москва.
10. Шабанов П. Д., Бородкин Ю. С. (1989) *Нарушения памяти и их коррекция*, Наука, Ленинград.
11. Цыганков Б. Д., Овсянников С. А. (2011) *Психиатрия*, ГЭОТАР-Медиа, Москва.
12. Crews, F. T., Qin, L., Sheedy, D., Vetreno, R. P., and Zou, J. (2013) HMGB1/TLR receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence, *Biol. Psychiatry*, **73**, 602-612, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.09.030>.
13. Crews, F. T., Walter, T. J., Coleman, L. G., and Vetreno, R. P. (2017) Toll-like receptor signaling and stages of addiction, *Psychopharmacology (Berl)*, **234**, 1483-1498, <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4560-6>.
14. Кокряков В. Н. (2006) *Очерки о врожденном иммунитете*, Наука, СПб.
15. Лебедев К. А., Понякина И. Д. (2017) *Иммунология образраспознающих рецепторов*, Ленанд, Москва.
16. Ноздрачев А. Д., Лебедев А. А., Шабанов П. Д. (2000) Организация подкрепляющих систем мозга, *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология*, **4**, 62-76.
17. Шабанов П. Д., Лебедев А. А. (2001) Подкрепляющие системы мозга: локализация, нейрохимическая организация, участие в формировании зависимости от психостимуляторов, *Психофармакология и биологическая наркология*, **1**, 13-26.
18. Becker H. C. (2014) *Alcohol and the Nervous System*, Handbook of Clinical Neurology, Elsevier, Amsterdam.
19. Ramarao, S., Pang, Y., Carter, K., and Bhatt, A. (2022) Azithromycin protects oligodendrocyte progenitor cells against lipopolysaccharide-activated microglia-induced damage, *Dev. Neurosci.*, **44**, 1-12, <https://doi.org/10.1159/000519874>.
20. Lin, S. J., Kuo, M. L., Hsiao, H. S., and Lee, P. T. (2016) Azithromycin modulates immune response of human monocyte-derived dendritic cells and CD4<sup>+</sup> T cells, *Int. Immunopharmacol.*, **40**, 318-326, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.09.012>.
21. Barks, J. D. E., Liu, Y., Wang, L., Pai, M. P., and Silverstein, F. S. (2019) Repurposing azithromycin for neonatal neuroprotection, *Pediatr. Res.*, **86**, 444-451, <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0408-6>.
22. Kopper, T. J., and Gensel, J. C. (2021) Continued development of azithromycin as a neuroprotective therapeutic for the treatment of spinal cord injury and other neurological conditions, *Neural Regen. Res.*, **16**, 508-509, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.293146>.
23. McMahan, R. H., Najarro, K. M., Mullen, J. E., Paul, M. T., Orlicky, D. J., Hulsebus, H. J., and Kovacs, E. J. (2021) A novel murine model of multi-day moderate ethanol exposure reveals increased intestinal dysfunction and liver inflammation with age, *Immun. Ageing*, **18**, 37, <https://doi.org/10.1186/s12979-021-00247-8>.
24. Coleman, L. G. Jr., Zou, J., Qin, L., and Crews, F. T. (2018) HMGB1/IL-1 $\beta$  complexes regulate neuroimmune responses in alcoholism, *Brain Behav. Immun.*, **72**, 61-77, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.027>.
25. Tucker, A. E., Alicea Pauneto, C. D. M., Barnett, A. M., and Coleman, L. G. Jr. (2022) Chronic ethanol causes persistent increases in Alzheimer's tau pathology in female 3xTg-AD mice: a potential role for lysosomal impairment, *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 886634, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.886634>.
26. Paxinos G., and Watson C. (2017) *The Rat brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Sydney.
27. Shi, R., Sun, Y. H., Zhang, X. H., Chiang, V. L. (2012) Poly(T) adaptor RT-PCR, *Methods Mol. Biol.*, **822**, 53-66, [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-427-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-427-8_4).
28. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. (1985) *Нейрохимия и фармакология алкоголизма*, Медицина, Москва.
29. Ветлугина Т. П., Прокопьева В. Д., Бояхан Н. А. (2023) *Биологические основы адъювантной терапии алкоголизма*, Издательство Томского государственного университета, Томск.
30. Газатова Н. Д., Юррова К. А., Гаврилов Д. В., Литвинова Л. С. (2018) Алкоголь и иммунитет, *Гены Клетки*, **13**, 47-55.
31. Цыган В. Н., Акперов Э. К., Востриков В. В., Шабанов П. Д. (2007) Иммунные дисфункции у наркозависимых и способы их коррекции, *Обзоры Клин. Фармакол. Лек. Тер.*, **5**, 2-81.

32. Priyanka, S. H., Thushara, A. J., Rauf, A. A., and Indira, M. (2019) Alcohol induced NLRP3 inflammasome activation in the brain of rats is attenuated by ATRA supplementation, *Brain Behav. Immun. Health*, **2**, 100024, <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2019.100024>.
33. Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A. M., Sanchez-Vera, I., and Guerri, C. (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage, *J. Neurosci.*, **30**, 8285-8295, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010>.
34. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. (2008) *Цитокины*, Фолиант, СПб.
35. Airapetov, M., Eresko, S., Ignatova, P., Lebedev, A., Bychkov, E., and Shabanov, P. (2022) A brief summary regarding the roles of interleukin-11 in neurological diseases, *Biosci. Trends*, **16**, 367-370, <https://doi.org/10.5582/bst.2022.01331>.
36. Airapetov, M. I., Eresko, S. O., Kochkin, D. V., Bychkov, E. R., Lebedev, A. A., and Shabanov, P. D. (2022) Ginsenosides affect the system of Toll-like receptors in the brain of rats under conditions of long-term alcohol withdrawal, *Biomed. Khim.*, **68**, 459-469, <https://doi.org/10.18097/PBMC20226806459>.
37. Airapetov, M., Eresko, S., Ignatova, P., Lebedev, A., Bychkov, E., and Shabanov, P. (2024) Effect of rifampicin on TLR4-signaling pathways in the nucleus accumbens of the rat brain during abstinence of long-term alcohol treatment, *Alcohol Alcohol.*, **59**, agae016, <https://doi.org/10.1093/alcalc/agae016>.
38. Айрапетов М. И., Ереско С. О., Бычков Е. Р., Лебедев А. А., Шабанов П. Д. (2020) Уровень экспрессии toll-подобных рецепторов изменяется в эмоциогенных структурах мозга крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене этанола, *Мед. Иммунол.*, **22**, 77-86, <https://doi.org/10.15789/1563-0625-EOT-1836>.
39. Lim, Y., Beane-Ebel, J. E., and Tanaka, Y. (2021) Exploration of alcohol use disorder-associated brain miRNA-mRNA regulatory networks, *Transl. Psychiatry*, **11**, 504, <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01635-w>.
40. Lehmann, S. M., Krüger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Trimbuch, T., Eom, G., Hinz, M., Kaul, D., Habbel, P., Kälin, R., Franzoni, E., Rybak, A., Nguyen, D., Veh, R., Ninnemann, O., Peters, O., Nitsch, R., Heppner, F. L., Golenbock, D., Schott, E., Ploegh, H. L., Wulczyn, F. G., and Lehnhardt, S. (2012) An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration, *Nat. Neurosci.*, **15**, 827-835, <https://doi.org/10.1038/nn.3113>.
41. Lippai, D., Bala, S., Csak, T., Kurt-Jones, E. A., and Szabo, G. (2013) Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice, *PLoS One*, **8**, e70945, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070945>.
42. Ureña-Peralta, J. R., Alfonso-Loeches, S., Cuesta-Díaz, C. M., García-García, F., and Guerri, C. (2018) Deep sequencing and miRNA profiles in alcohol-induced neuroinflammation and the TLR4 response in mice cerebral cortex, *Sci. Rep.*, **8**, 15913, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34277-y>.
43. Ureña-Peralta, J. R., Pérez-Moraga, R., García-García, F., and Guerri, C. (2020) Lack of TLR4 modifies the miRNAs profile and attenuates inflammatory signaling pathways, *PLoS One*, **15**, 0237066, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237066>.
44. DiSabato, D. J., Nemeth, D. P., Liu, X., Witcher, K. G., O'Neil, S. M., Oliver, B., Bray, C. E., Sheridan, J. F., Godbout, J. P., and Quan, N. (2021) Interleukin-1 receptor on hippocampal neurons drives social withdrawal and cognitive deficits after chronic social stress, *Mol. Psychiatry*, **26**, 4770-4782, <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0788-3>.
45. Pawley, L. C., Hueston, C. M., O'Leary, J. D., Kozareva, D. A., Cryan, J. F., O'Leary, O. F., and Nolan, Y. M. (2020) Chronic intrahippocampal interleukin-1 $\beta$  overexpression in adolescence impairs hippocampal neurogenesis but not neurogenesis-associated cognition, *Brain Behav. Immun.*, **83**, 172-179, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.10.007>.
46. Prieto, G. A., Tong, L., Smith, E. D., and Cotman, C. W. (2019) TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  but not IL-18 suppresses hippocampal long-term potentiation directly at the synapse, *Neurochem. Res.*, **44**, 49-60, <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2517-8>.
47. Vijayaraj, S. L., Feltham, R., Rashidi, M., Frank, D., Liu, Z., Simpson, D. S., Ebert, G., Vince, A., Herold, M. J., Kueh, A., Pearson, J. S., Dagley, L. F., Murphy, J. M., Webb, A. I., Lawlor, K. E., and Vince, J. E. (2021) The ubiquitylation of IL-1 $\beta$  limits its cleavage by caspase-1 and targets it for proteasomal degradation, *Nat. Commun.*, **12**, 2713, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22979-3>.
48. Tong, Z., Yang, X., and Li, J. (2022) Research progress on the mechanism of interleukin-1 $\beta$  on epiphyseal plate chondrocytes, *Eur. J. Med. Res.*, **27**, 313, <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00893-8>.
49. Kalb, D. M., Adikari, S. H., Hong-Geller, E., and Werner, J. H. (2019) Single-cell correlations of mRNA and protein content in a human monocytic cell line after LPS stimulation, *PLoS One*, **14**, e0215602, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215602>

**STUDY OF NEUROINFLAMMATION  
IN THE RAT HIPPOCAMPUS DURING ETHANOL EXPOSURE  
AND PHARMACOLOGIC CORRECTION WITH AZITHROMYCIN:  
NEW DATA AND FUTURE PERSPECTIVES**

**M. I. Airapetov<sup>1,2\*</sup>, S. O. Eresko<sup>1,3</sup>, S. A. Shamaeva<sup>1</sup>, E. R. Bychkov<sup>1</sup>,  
A. A. Lebedev<sup>1</sup>, and P. D. Shabanov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Experimental Medicine,  
197376 St. Petersburg, Russia; e-mail: interleukin1b@gmail.com*

<sup>2</sup> *Military medical academy of S.M. Kirov, 194044 St. Petersburg, Russia*

<sup>3</sup> *Saint-Petersburg National Research University  
of Information Technologies, Mechanics and Optics, 197022 St. Petersburg, Russia*

With prolonged ethanol ingestion, disturbances in the emotional spectrum develop, and memory problems are noted. These symptoms may be mediated by the development of neurochemical changes in the hippocampus of the brain. Although there is evidence that the hippocampus is vulnerable to chronic alcohol intoxication and the development of neuroinflammation and neurodegeneration in this brain region, the key molecular mechanisms have not been identified. The aim of the study was to investigate changes in the immune system in the periphery as well as in the hippocampus of the rat brain during ethanol exposure and during pharmacological correction with azithromycin (AZM). Long-term ethanol exposure was modeled by injecting rats with a 20% ethanol solution (4 g/kg) for 4 weeks. General biochemical and clinical blood analysis was performed in animals. The expression levels of cytokine genes (*Il1 $\beta$* , *Ccl2*, *Il6*, *Il11*, *Il13*, *Tnfa*, *Tgfb $\beta$* ) and toll-like receptor system genes (*Tlr3*, *Tl4*, *Tlr7*, *NfkB1*, *Hmgb1*) and TLR system-related microRNA molecules (miR-182, miR-155-5p, miR-96-5p, miR-let-7b) were evaluated in the hippocampus. IL-1 $\beta$  protein content was also assessed in the hippocampus. Prolonged alcoholization caused an increase in mRNA and protein levels of IL-1 $\beta$ , and a decrease in mRNA levels of *Tnfa*, *Il11*, *Tlr3*, and *Tlr7*. The contents of miR-let-7b, miR-96, and miR-155 were downregulated in the hippocampus during long-term alcoholization. Elevated *Il1 $\beta$*  mRNA and protein levels and *Hmgb1* mRNA levels were maintained under conditions of ethanol withdrawal. *Tlr3* mRNA levels were decreased under withdrawal. Administration of AZM reduced IL-1 $\beta$ , TLR3 and HMGB1 mRNA levels under conditions of ethanol withdrawal, and at higher doses of the drug, a decrease in IL-1 $\beta$  protein levels in the hippocampus of rat brain was observed. Thus, the study provided new insights into the mechanisms of neuroinflammation in the brain hippocampus during prolonged exposure to ethanol and upon withdrawal. The results obtained allowed us to outline a number of tasks for further studies in this direction.

**Keywords:** ethanol, hippocampus, toll-like receptors, cytokines, IL-1 $\beta$ , microRNAs, azithromycin

## НЕЙРОИММУННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖИВОТНЫХ С ПРЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

© 2024 И.Ю. Шамакина<sup>1\*</sup>, П.К. Анохин<sup>1,2</sup>, Р.А. Агельдинов<sup>3</sup>, В.С. Кохан<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России, 119002 Москва, Россия; электронная почта: shamakina.i@serbsky.ru

<sup>2</sup> Институт Искусственного Интеллекта (AIRI), 121170 Москва, Россия

<sup>3</sup> Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, 143442 пос. Светлые горы, Россия

Поступила в редакцию 28.05.2024

После доработки 22.07.2024

Принята к публикации 29.07.2024

Факторы нейровоспаления могут быть важными регуляторами функций мозга в норме и патологии, в том числе при отставленных нарушениях, связанных с пренатальным действием алкоголя – когнитивной дисфункции, аффективных расстройствах и аддиктивном поведении потомства в подростковом и взрослом возрасте. В данной работе мы использовали экспериментальную модель пренатальной алкоголизации (потребление 10%-ного раствора этанола самкой крыс Wistar на всём протяжении беременности), мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ содержания интерлейкинов (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-9 и IL-12), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и хемокина CCL5, а также количественную ПЦР в режиме реального времени для оценки уровня мРНК цитокинов в префронтальной коре половозрелого (PND60) потомства – самцов и самок крыс с пренатальной алкогольной интоксикацией и контрольных животных. Установлено достоверное снижение содержания TNF- $\alpha$  и интерлейкинов IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-9 в префронтальной коре самцов, но не самок, перенесших пренатальную алкоголизацию. У пренатально алкоголизированных самцов показано снижение уровня мРНК TNF- $\alpha$  в префронтальной коре на 45% по сравнению с самцами контрольной группы, что может лежать в основе обнаруженного снижения его содержания. Полученные данные и, прежде всего, значимость фактора пола необходимо учитывать при проведении дальнейших трансляционных исследований механизмов нарушений фетального алкогольного спектра и разработке средств их профилактики и терапии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** пренатальная алкогольная интоксикация, нейровоспаление, префронтальная кора, интерлейкины, фактор некроза опухоли, экспрессия мРНК.

DOI: 10.31857/S0320972524110062 EDN: IKSBEQ

### ВВЕДЕНИЕ

Употребление женщиной алкоголя во время беременности приводит к развитию у потомства целого ряда физиологических, психических, поведенческих и интеллектуальных нарушений, обозначенных единым термином «нарушения фетального алкогольного спектра» (Fetal alcohol spectrum disorder, FASD) [1]. Согласно усреднённым эпидемиологическим данным последних лет, 10% женщин употребляли алкоголь во время беременности [2, 3], а частота встречаемости

FASD у детей в разных регионах мира варьирует от 3 до 31% [4–6]. Выраженность нарушений, возникающих в результате пренатального воздействия этанола (пренатальная алкоголизация, ПА), зависит от дозы, продолжительности и частоты употребления алкоголя в течение беременности, а также от особенностей материнского метаболизма [7]. Наиболее тяжёлая форма – фетальный алкогольный синдром – проявляется у детей в раннем постнатальном периоде в дефектах развития лицевого отдела, замедлении роста, нарушениях функций центральной нервной системы (ЦНС) [7].

Принятые сокращения: ПА – пренатальная алкоголизация; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$ .

\* Адресат для корреспонденции.

Вместе с тем наиболее многочисленная группа нарушений не связана с краинцефальной дисморфией или отставанием в росте и развитии, а проявляется в виде поведенческих и когнитивных нарушений, а также высокого риска злоупотребления психоактивными веществами в подростковом и взрослом возрасте [8]. Манифестация симптомов этих нарушений обычно связана с началом обучения в школе, стрессом, проблемами социального взаимодействия [9].

Многочисленными исследованиями показано, что центральное место в механизмах зависимости принадлежит процессам нейроадаптации в мезокортиолимбической дофаминовой (DA) системе мозга, которая берёт начало вентральной покрышке среднего мозга (VTA) и проецируется на лимбические структуры, включая прилежащее ядро (NAc), миндалевидное тело, гиппокамп и префронтальную кору [10]. Вместе с тем дофамин помимо нейротрансмиттерной функции обладает способностью к активации дофаминовых рецепторов, локализованных на астроцитах, микроглиальных клетках в ЦНС и клетках периферической иммунной системы [11, 12]. Показано, что дофамин модулирует уровень активности микроглиальных клеток [13–15], и, наоборот, цитокины играют важную роль в регуляции функций дофаминовой системы мозга [16]. Можно предположить, что одним из механизмов нарушений дофамин-зависимого поведения у ПА животных является изменение функционального состояния микроглиальных клеток и экспрессии факторов нейровоспаления. Целью данной работы было сравнительное изучение экспрессии факторов нейровоспаления в префронтальной коре ПА и интактных (контрольных) животных. Префронтальная кора считается одной из наиболее сложных функциональных структур мозга млекопитающих, основная роль которой состоит в интеграции и интерпретации входных данных от корковых и подкорковых структур и обеспечении целенаправленных поведенческих реакций, в том числе ориентированных как на получение вознаграждения, так и на подавление поведения риска [17]. Учитывая, что баланс про- и противовоспалительных цитокинов критически важен для обеспечения нейронных функций [18], мы предположили, что изменения в этом балансе у животных, перенесших ПА, могут быть одним из факторов нарушения поведения. Мы провели одновременное измерение содержания шести ключевых белков-цитокинов семейства интерлейкинов (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-9 и IL-2), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) и хемокина CCL5 в префронтальной коре половозрелых (PND60) самцов и самок крыс с ПА интоксикацией и контрольных животных. IL-1 пред-

ставляет собой провоспалительные цитокины с широко распространённым влиянием на функции нервной системы в норме [19]. Цитокины семейства IL-1 состоят из двух основных родственных членов семейства (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), которые демонстрируют клеточно-специфические паттерны экспрессии и высвобождения и синтезируются как глией, так и нейронами. Традиционно считавшиеся провоспалительными такие цитокины, как интерлейкины IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2 и TNF- $\alpha$ , играют важную роль в развитии мозга [20]. Показано, что нарушение функций IL-6 в мозге ассоциировано с аномалией формы, длины и характера распределения дендритных отростков [21]. TNF- $\alpha$  является ключевым медиатором, влияющим на синаптическое ремоделирование, процессы долговременной потенциации (LTP) и долговременной депрессии (LTD) в мозге [22, 23]. Помимо того, что IL-2 является ключевым цитокином в иммунной регуляции, он может играть роль в развитии и регуляции нейронов головного мозга, участвующих в пространственном обучении и памяти. Показано, что у нокаутных по IL-2 мышей нарушено пространственное обучение, что сопровождалось уменьшением длины гиппокампальных мицеллярных волокон [24].

IL-3, IL-9 и CCL5, согласно данным литературы, могут обладать нейропротективным действием [25–27]. Было показано, что IL-3 широко экспрессируется в ЦНС и оказывает трофическое действие на холинергические нейроны прозрачной перегородки (Septum pellucidum) *in vitro* и *in vivo* [25], однако механизмы, лежащие в основе нейротрофического действия IL-3, до конца не выяснены. IL-9 и его рецептор также активно экспрессируются в нервных клетках и специфически контролируют программируемую клеточную гибель нейронов неокортекса новорожденных мышей [26]. Авторы предполагают, что сигнальный путь IL-9/IL-9R представляет собой эндогенный антиапоптотический механизм для корковых нейронов [26]. Хемокин CCL5 и его рецепторы выполняют в ЦНС множество функций, включая нейромодуляцию синаптической активности и защиту от нейротоксинов [27]. Наиболее высокий уровень экспрессии мРНК CCL5 обнаружен в олигодендроцитах, астроцитах и микроглии коры головного мозга, хвостатого ядра/скорлупы, гиппокампа и таламуса [27]. Интересно, что в среднем мозге мРНК CCL5 обнаруживается в тирозин-гидроксилазе (TH)-положительных клетках вентральной покрышки, указывая на то, что CCL5 экспрессируется субпопуляцией дофаминергических нейронов мезолимбической системы [27]. Предполагают, что этот хемокин может участвовать в обеспечении взаимодействия нейронов и клеток глии [27].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Экспериментальные животные.** Эксперименты проводились на аутбредных крысах Wistar обоих полов (питомник лабораторных животных «Столбовая» ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Животных содержали в условиях естественной освещённости при температуре  $22 \pm 2$  °C и свободном доступе к пище и воде.

**Модельпренатальной алкоголизации.** Для получения потомства двух половозрелых самок (PND60) крыс подсаживали к самцу на 3 суток. Общее количество самцов – 10, самок – 20. Срок беременности фиксировали, определяя наличие сперматозоидов в вагинальном мазке самки. Самки, спаривавшиеся с одним самцом, случайным образом были поделены на две группы: самки опытной группы на протяжении всей беременности (с 1-го по 21-й дни) получали 10%-ный раствор этанола в качестве единственного источника жидкости, контрольные самки во время беременности содержались в условиях водного режима. Потребление алкоголя самками измеряли ежедневно на всём протяжении беременности. В данной серии среднесуточное потребление алкоголя самками составило  $13,6 \pm 2,1$  г/кг. Объём потребляемой жидкости в опытной группе –  $31,0 \pm 4,2$  мл, в контрольной группе –  $35,1 \pm 2,7$  мл. Достоверных различий в среднесуточных объёмах потребляемой жидкости выявлено не было. Масса самок контрольной и опытной групп достоверно не отличалась в начале ( $210,0 \pm 23,8$  г и  $207,0 \pm 15,7$  г соответственно) и в конце эксперимента ( $325,0 \pm 28,4$  г и  $331,0 \pm 32,1$  г соответственно). После рождения детёнышей на период вскармливания все самки переводились на водный режим. Таким образом, полученное потомство было алкоголизировано только в пренатальном периоде, соответствующем 1–2 триместрам беременности у человека [28]. На 30-й день жизни детёнышей отделяли от матери, разделяли по половому признаку и в дальнейшем содержали по 6 крысят в одной клетке (тип T/4B) при свободном доступе к пище и воде.

Для биохимических и молекулярно-биологических исследований случайным образом было отобрано 18 ПА крыс (группа «Alc», 9 самцов и 9 самок) и 18 контрольных (группа «K», 9 самцов и 9 самок) крыс. В возрасте 60 дней (PND60) крыс декапитировали, префронтальную кору выделили на уровне от 4,2 мм до 2,8 мм относительно Брегмы, согласно атласу мозга крыс Paxinos and Watson [29]. Выделенные образцы ткани замораживали и хранили при  $-70$  °C.

**Выделение белка для иммунофлуоресцентного анализа.** Пробы гомогенизировали с исполь-

зованием стеклянных шариков на гомогенизаторе MagNA Lyser 230B («Roche», Швейцария) в буферном растворе: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,05%-ного (v/v) Tween-20 и 1%-ного (v/v) коктейля ингибиторов протеаз II (ab201116, «Abcam», США). Гомогенаты центрифугировали 15 мин при  $12\,000$  g и  $3$  °C и отбирали супернатант для дальнейшего анализа. Содержание белка определяли методом Бредфорда с использованием коммерчески доступного набора Quick Start Bradford Protein Assay («Bio-Rad», США).

**Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ** с использованием микросфер (технология xMAP) проводили с помощью коммерчески доступных наборов для определения цитокинов в тканях мозга крысы («Cloud-Clone Corp.», Китай), согласно инструкции производителя. Анализ выполняли на системе Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader с системой промывки Bio-Plex Pro Wash Station («Bio-Rad»). Концентрацию цитокинов в исследуемых образцах определяли автоматически с помощью стандартных калибровочных разведений, используя компьютерную программу Bio-Plex Manager Software v.6.1 и Bio-Plex Data Pro Software v.1.2 («Bio-Rad»). Содержание целевых белков нормировали на общий белок в образце.

**Выделение тотальной РНК** проводили стандартным гуанидин-изотиоцианатным методом с использованием фенол-хлороформной экстракции (PureZOL RNA Isolation Reagent, «Bio-Rad»). Образцы ткани гомогенизировали в 1 мл лизирующего буфера, к гомогенату добавляли 200 мкл хлороформа («Fluka», США) и центрифугировали в течение 15 мин при  $4$  °C и  $12\,000$  g (Eppendorf 5804R, «Eppendorf», Германия). К супернатанту добавляли равный объём изопропанола, инкубировали при  $-20$  °C (2 ч), центрифугировали при  $6\,000$  g 5 мин, осадок промывали 70%-ным EtOH, высушивали и растворяли в воде (RNAase-free). Аликвоты РНК замораживали и хранили при  $-70$  °C. Количество выделенной тотальной РНК определяли спектрофотометрически (Eppendorf BioPhotometer, «Eppendorf»). Полученную РНК обрабатывали ДНКазой («Thermo Fisher Scientific», США), в соответствии с инструкцией производителя. кДНК синтезировали с использованием набора Mint revertase («Евроген», Россия) и использовали в качестве матрицы для количественной ПЦР.

**ПЦР в режиме реального времени.** Для подбора праймеров использовали онлайн-ресурс Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Были использованы следующие последовательности олигонуклеотидных праймеров («ДНК-синтез», Россия):  
TNF- $\alpha$  (прямой 5'-AAATGGGCTCCCTCATCAGGTTTC-3', обратный 5'-TCTGCTGGTGTTGCTACGAC-3');  
IL-1 $\beta$  (прямой 5'-CACCTCTCAAGCAGAGCACAG-3',

**Таблица 1.** Содержание цитокинов в префронтальной коре пренатально алкоголизированных и контрольных животных

Группа	Содержание цитокинов в префронтальной коре (пг/мг общего белка) среднее арифметическое ± SD							
	IL-1α	IL-1β	IL-2	IL-3	IL-6	IL-9	TNF-α	CCL5
M_K (n = 9)	58 ± 21,2	9,1 ± 2	175,1 ± 27,5	3,4 ± 1	3,4 ± 1	3,3 ± 1,1	38,5 ± 19,9	58,6 ± 23
M_PA (n = 9)	36,5 ± 16	6,4 ± 2,7* p = 0,01	135 ± 57,9	2,1 ± 0,8 p = 0,009	1,9 ± 1,09 p = 0,002	1,9 ± 0,9 p = 0,005	21,4 ± 8,7* p = 0,03	36 ± 6,4
F_K (n = 9)	45,9 ± 27,2	5,9 ± 2## p = 0,005	138,6 ± 64,8	1,8 ± 0,4## p = 0,003	2 ± 0,7## p = 0,003	1,7 ± 0,4## p = 0,002	26,8 ± 16,7	45,8 ± 20
F_PA (n = 9)	57,9 ± 41,9	5,9 ± 2	116,4 ± 26,6	2,5 ± 1,3	1,4 ± 0,9	2,5 ± 1,2	21,7 ± 12	55,4 ± 33,4

Примечание. M\_K – самцы, контрольная группа; M\_PA – самцы, пренатальная алкоголизация; F\_K – самки, контрольная группа; F\_PA – самки, пренатальная алкоголизация.

\* p < 0,05 (M\_PA относительно M\_K); ## p < 0,01 (F\_K относительно M\_K); апостериорный тест Дункана.

обратный 5'-GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC-3');  
β-актин (прямой 5'-CACTGCCGCATCCTCTTCCT-3',  
обратный 5'-AACCGCTCATGCCGATAGTG-3').

Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 25 нг матрицы (кДНК), праймеры в конечной концентрации 0,4 мКМ и 5 мкл реакционной смеси 5X qPCRmix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR Green I («Евроген») на амплификаторе CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler («Bio-Rad») в следующем режиме: исходная денатурация матрицы – 3 мин при 95 °C; денатурация – 95 °C, 15 с; отжиг праймеров – 60 °C, 15 с; элонгация – 72 °C, 30 с. Реакцию проводили в течение 40 циклов с последующим анализом кривых плавления полученных ПЦР-продуктов. Для нормализации данных использовали β-актин в качестве референсного гена. Показатели Ct β-актина между экспериментальной и контрольной группой достоверно не различались (20,2 ± 2,0 и 19,7 ± 3,3 соответственно). Количественную оценку относительного уровня экспрессии мРНК проводили методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [30].

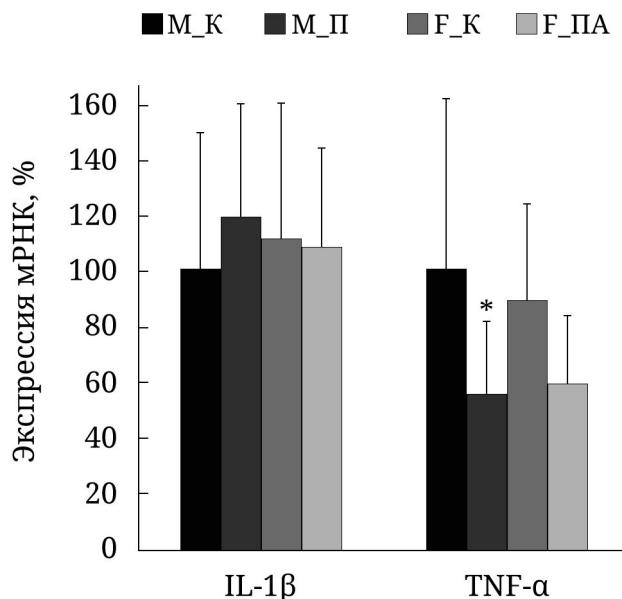
**Статистическую обработку данных** проводили с помощью программного обеспечения Statistica v.12 («StatSoft Inc.», США). Проверка нормальности распределения данных в выборке осуществлялась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Так как все данные подчинялись Гауссову распределению, использовали параметрический метод анализа – двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA), факторы: пол × ПА. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение (SD). Post hoc обработка проводилась при наличии достоверных различий между группами. Достоверными считались различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Содержание цитокинов в префронтальной коре.** Процессинг данных о содержании цитокинов/хемокинов, суммированных в табл. 1, показал: значимое влияние фактора ПА ( $F_{1,32} = 4,9$ ;  $p = 0,03$ ) на TNF-α, фактора пола ( $F_{1,32} = 6,7$ ;  $p = 0,01$ ) на IL-1β, взаимодействие факторов ПА × пол при анализе IL-3 ( $F_{1,32} = 10$ ;  $p = 0,003$ ), фактора ПА ( $F_{1,32} = 12,8$ ;  $p = 0,001$ ) и фактора пола ( $F_{1,32} = 9,9$ ;  $p = 0,004$ ) на IL-6, взаимодействие факторов ПА × пол ( $F_{1,32} = 13$ ;  $p = 0,001$ ) при анализе IL-9 и взаимодействие факторов ПА × пол ( $F_{1,32} = 4,5$ ;  $p = 0,04$ ) при анализе CCL5. Важно отметить, что наиболее высокие показатели концентрации в префронтальной коре отмечаются для интерлейкинов IL-2 и IL-1α и хемокина CCL5.

Результаты мультиплексного анализа показали достоверные различия содержания ряда интерлейкинов в префронтальной коре мозга между самцами и самками контрольной группы: у самок (группа F\_K) было снижено содержание интерлейкинов IL-1β ( $p < 0,01$ ), IL-3 ( $p < 0,001$ ), IL-6 ( $p < 0,01$ ) и IL-9 ( $p < 0,001$ ) по сравнению с самцами (группа M\_K) (табл. 1). Примечательно, что ПА не повлияла на уровень цитокинов у самок, также не было обнаружено значимых различий между полами групп ПА животных.

В префронтальной коре ПА самцов наблюдалось значимое снижение IL-1β – на 29%, IL-3 – на 38%, IL-6 – на 45%, IL-9 – на 42%, а также TNF-α – на 45% по сравнению с контрольной группой самцов. Следует отметить, что несмотря на обнаружение в ходе дисперсионного анализа значимого отличия между группами в отношении содержания хемокина CCL5, результаты апостериорного



**Рис. 1.** Относительный уровень экспрессии мРНК IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в префронтальной коре контрольных и пренатально алкоголизированных самок и самцов крыс. M\_K – самцы, контрольная группа; M\_PA – самцы, пренатальная алкоголизация; F\_K – самки, контрольная группа; F\_PA – самки, пренатальная алкоголизация. \*  $p < 0,05$  (M\_PA относительно M\_K, апостериорный тест Дункана)

анализа были неоднозначны: было обнаружено снижение у ПА самцов на 39% ( $p = 0,06$ , тест Дункана; тенденция) по сравнению с самцами контрольной группы (табл. 1).

Для выяснения возможных причин снижения содержания TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в префронтальной коре ПА самцов было проведено параллельное изучение экспрессии мРНК TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ .

**Экспрессия мРНК TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в префронтальной коре пренатально алкоголизированных и контрольных животных.** При изучении уровня мРНК TNF- $\alpha$  в префронтальной коре обнаружено влияние ПА-фактора ( $F_{1,32} = 8,2$ ,  $p = 0,007$ ). Статистически значимые различия выявлены между ПА самцами и контрольной группой самцов (рис. 1). У ПА самцов выявлено снижение уровня мРНК TNF- $\alpha$  в префронтальной коре на 45% ( $p = 0,03$ ) по сравнению с самцами контрольной группы, что может лежать в основе обнаруженного нами снижения содержания самого TNF- $\alpha$ . Достоверных различий в экспрессии мРНК IL-1 $\beta$  между группами не обнаружено (рис. 1).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было установлено, что пренатальная алкогольная интоксикация является значимым фактором риска аддиктивного поведения в будущем, причём в потомстве F1 увеличение

добровольного потребления алкоголя и более высокий уровень тревожности на фоне отмены его потребления были обнаружены у самцов, но не у самок-потомков по сравнению с соответствующими контрольными группами [31].

В настоящем исследовании было также выявлено зависимое от пола отставленное действие ПА на содержание цитокинов в префронтальной коре взрослых животных. Мы получили достаточно неожиданные результаты – снижение содержания TNF- $\alpha$  в префронтальной коре взрослых ПА самцов крыс. Эти данные согласуются с представлениями некоторых авторов [32] о подавлении, а не об активации алкоголем экспрессии TNF- $\alpha$  в мозге. Традиционно TNF- $\alpha$  считают провоспалительным цитокином, однако несмотря на многочисленные сообщения о роли TNF- $\alpha$  как патогенетического фактора целого ряда заболеваний мозга, появляется всё больше данных о его нейропротекторных функциях, направленных на уменьшение продукции оксида азота и свободных радикалов, изменение нейротрансмиссии возбуждающих аминокислот, поддержание нейронального гомеостаза кальция и индукцию синтеза нейротрофических факторов [33]. Передача сигнала в клетках, на которые действует TNF- $\alpha$ , происходит после его связывания с двумя рецепторами: TNFR1 и TNFR2 [34], активации факторов транскрипции NF- $\kappa$ B и AP-1, которые опосредуют выживаемость и пролиферацию клеток [34]. NF- $\kappa$ B является фактором транскрипции для большого числа генов, кодирующих провоспалительные цитокины, хемокины и их рецепторы. При этом TNFR1, в отличие от TNFR2, содержит так называемый «домен смерти» («death domain») в своей цитоплазматической части, поэтому его связывание с TNF- $\alpha$  может приводить к индукции клеточной гибели [34]. TNFR1 представлен почти на всех типах клеток, тогда как экспрессия TNFR2 характерна для нейронов и олигодендроцитов [34]. Долгое время считалось, что TNFR2 выполняет второстепенную роль в гомеостазе, однако недавно было показано, что регуляторные эффекты TNF- $\alpha$  связаны с передачей сигнала именно через TNFR2 [35].

Поскольку обнаруженный нами эффект ПА является отставленным во времени, в его основе могут лежать долговременные эпигенетические модификации, что косвенно подтверждается снижением экспрессии мРНК TNF- $\alpha$ . Линии мышей с нокаутом гена *Tnf* (C57BL/6-TNF $^{-/-}$  и C57BL/6-TNF $^{+/-}$ ) представляются перспективной моделью для изучения влияния дефицита TNF на поведение и функции ЦНС в норме и патологии. Результаты, полученные в настоящее время при изучении мышей с нокаутом гена *Tnf*, свидетельствуют об участии TNF в регуляции тревожного поведения

и функциональной активности дофаминовой системы мозга [36].

Согласно данным литературы цитокин IL-1 $\beta$  экспрессируется в мозге как микроглиальными клетками, так и нейронами и участвует в механизмах поддержания целостности и функционирования гематоэнцефалического барьера [37]. Показано, что IL-1 $\beta$  может регулировать функции ГАМК-ergicических синапсов префронтальной коры посредством двух различных путей: противовоспалительного (механизм «выживания» PI3K/Akt) или провоспалительного (MyD88/p38 MAPK), причём в отсутствии алкоголя наблюдается смещение в сторону сигнального пути PI3K/Akt, способствующего выживанию [38]. Кроме того, исследования на грызунах с нокаутом гена IL-1 $\beta$  выявили целый ряд нарушений поведения и аффективного состояния у этих животных [39, 40].

Снижение содержания IL-3, IL-6 и IL-9 в префронтальной коре самцов с ПА может быть связано с ослаблением нейропротекторных свойств микроглии. В исследовании на людях и мышах было показано, что уровень экспрессии IL-3 играет ключевую роль в размножении и поддержании пула прогениторных нейрональных клеток и количества выживших нейронов [41]. Было показано, что IL-3 играет защитную роль против А $\beta$ -индуцированной гибели клеток, и что эта защита реализуется посредством активации фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/протеинкиназы B (Akt) и Янус-киназы 2 (Jak2) [42]. Исследования клеток *in vitro* показали, что IL-9 индуцирует активацию транскрипционных факторов преобразователей сигналов и активаторов транскрипции STAT1, STAT3 и STAT5 и снижает экспрессию маркеров активации макрофагов, таких как CD45, CD14, CD68 и CD11b, стимулированных липополисахаридом и гамма-интерфероном [43]. Таким образом, IL-9 может управлять экспрессией других цитокинов и хемокинов, а сам в ряде случаев проявлять противовоспалительные и антиапоптотические свойства [44, 45].

Показано, что IL-6 участвует в нейрогенезе (влияя как на нейроны, так и на глиальные клетки), а также в регуляции активности зрелых нейронов и глиальных клеток в норме и патологии [46]. Во многих отношениях IL-6 ведёт себя подобно нейротрофину, что, по-видимому, объясняет, почему семейство цитокинов, к которому он принадлежит, известно как нейропоэтины. В опытах на культуре нейронов было показано, что IL-6 способствует выживанию холинергических нейронов переднего мозга и перегородки, а также мезэнцефалических катехоламинергических нейронов, ганглиозных клеток сетчатки, симпатических нейронов и ганглиев дорсальных корешков [47, 48]. Изучение нокаутных мышей

IL-6 КО показывает вовлечённость IL-6 в регуляцию ноцицепции, терморегуляции, эмоциональной реактивности, обучения и памяти [49, 50].

Таким образом, в работе показано, что в префронтальной коре ПА животных снижено содержание как провоспалительных цитокинов, так и цитокинов, обладающих нейропротекторным действием, причём этот эффект зависит от пола и обнаруживается только у половозрелых самцов. Вместе с тем важно учитывать, что нейровоспаление представляет собой сложный динамический процесс, характеризующийся изменением числа астроцитов и клеток микроглии, активацией про- и противовоспалительных цитокинов, морфологическими изменениями клеток, клеточной миграцией, изменением уровня экспрессии целого ряда генов [51]. Поэтому для изучения динамики изменений экспрессии цитокинов на уровне мРНК и белка, их роли в общей картине нарушений, связанных с пренатальным эффектом алкоголя, а также биологических основ влияния фактора пола на эффекты ПА требуются дальнейшие исследования.

**Ограничения исследования.** Используемая модель «полупринудительной» алкоголизации самок во время беременности имеет свои ограничения в качестве трансляционной модели при интерпретации данных. В частности, при использовании модели необходимо тщательно контролировать объём потребляемой жидкости в опытной и контрольной группах животных. Кроме того, в данном исследовании не проводилась оценка калорийности рациона у пьющих алкоголь и контрольных самок. Ограничением также является возраст потомства. Возможно, установленные биохимические изменения характерны для позднего адолосцентного и взрослого, но не для препубертатного периода, исследованного в работах других авторов [52].

**Вклад авторов.** Шамакина И.Ю. – концепция, руководство работой, написание текста; Кохан В.С. – проведение экспериментов, статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, редактирование текста статьи; Анохин П.К. – проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования, статистическая обработка; Агельдинов Р.А. – проведение экспериментов.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках темы государственного задания «Изучение патогенетических механизмов формирования зависимости от психоактивных веществ с использованием генетических, биохимических, иммунологических, нейрофизиологических и нейрокогнитивных подходов» (рег. № НИОКР АААА-А18-118032390130-3).

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

**Соблюдение этических норм.** Исследования проводились с соблюдением международных рекомендаций для медико-биологических исследований с использованием животных, требований Европейской конвенции о защите животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г. с приложением от 15.06.2006), правил Совета Европейского сообщества (Директива 86/609/EEC от 14.11.2005 г. и Директивы 2010/63/EU от 22.09.2010 г.), а также

Принципов надлежащей лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, ГОСТ Р 53434-2009). Соблюдаются все положения, в том числе использование минимального количества животных, которое требуется для получения научно достоверных результатов. Протокол эксперимента соответствовал этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных и одобрен этическими комитетами ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dejong, K., Olyaei, A., and Lo, J. O. (2019) Alcohol use in pregnancy, *Clin. Obstet. Gynecol.*, **62**, 142-155, <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000414>.
2. Jacobson, S. W., Hoyme, H. E., Carter, R. C., Dodge, N. C., Molteno, C. D., Meintjes, E. M., and Jacobson, J. L. (2021) Evolution of the physical phenotype of fetal alcohol spectrum disorders from childhood through adolescence, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **45**, 395-408, <https://doi.org/10.1111/acer.14534>.
3. Voutilainen, T., Rysä, J., Keski-Nisula, L., and Kärkkäinen, O. (2022) Self-reported alcohol consumption of pregnant women and their partners correlates both before and during pregnancy: A cohort study with 21,472 singleton pregnancies, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **46**, 797-808, <https://doi.org/10.1111/acer.14806>.
4. Popova, S., Lange, S., Probst, C., Gmel, G., and Rehm, J. (2017) Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Glob. Health*, **5**, e290-e299, [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30021-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30021-9).
5. McQuire, C., Mukherjee, R., Hurt, L., Higgins, A., Greene, G., Farewell, D., Kemp, A., and Paranjothy, S. (2019) Screening prevalence of fetal alcohol spectrum disorders in a region of the United Kingdom: A population-based birth-cohort study, *Prev. Med.*, **118**, 344-351, <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2018.10.013>.
6. May, P. A., de Vries, M. M., Marais, A. S., Kalberg, W. O., Buckley, D., Hasken, J. M., Abdul-Rahman, O., Robinson, L. K., Manning, M. A., Seedat, S., Parry, C. D. H., and Hoyme, H. E. (2022) The prevalence of fetal alcohol spectrum disorders in rural communities in South Africa: A third regional sample of child characteristics and maternal risk factors, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **46**, 1819-1836, <https://doi.org/10.1111/acer.14922>.
7. Astley, S. J., Bailey, D., Talbot, C., and Clarren, S. K. (2000) Fetal alcohol syndrome (FAS) primary prevention through fas diagnosis: II. A comprehensive profile of 80 birth mothers of children with FAS, *Alcohol Alcohol.*, **35**, 509-519, <https://doi.org/10.1093/alc/35.5.509>.
8. Popova, S., Charness, M. E., Burd, L., Crawford, A., Hoyme, H. E., Mukherjee, R. A. S., Riley, E. P., and Elliott, E. J. (2023) Fetal alcohol spectrum disorders, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **9**, 11, <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00420-x>.
9. Kautz-Turnbull, C., Rockhold, M., Handley, E. D., Olson, H. C., and Petrenko, C. (2023) Adverse childhood experiences in children with fetal alcohol spectrum disorders and their effects on behavior, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **47**, 577-588, <https://doi.org/10.1111/acer.15010>.
10. Nutt, D. J., Lingford-Hughes, A., Erritzoe, D., and Stokes, P. R. (2015) The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows, *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**, 305-312, <https://doi.org/10.1038/nrn3939>.
11. Arreola, R., Alvarez-Herrera, S., Pérez-Sánchez, G., Becerril-Villanueva, E., Cruz-Fuentes, C., Flores-Gutierrez, E. O., Garcés-Alvarez, M. E., de la Cruz-Aguilera, D. L., Medina-Rivero, E., Hurtado-Alvarado, G., Quintero-Fabián, S., and Pavón, L. (2016) Immunomodulatory effects mediated by dopamine, *J. Immunol. Res.*, **2016**, 3160486, <https://doi.org/10.1155/2016/3160486>.
12. Mladinov, M., Mayer, D., Brčić, L., Wolstencroft, E., Man, N., Holt, I., Hof, P. R., Morris, G. E., and Šimic, G. (2010) Astrocyte expression of D2-like dopamine receptors in the prefrontal cortex, *Transl. Neurosci.*, **1**, 238-243, <https://doi.org/10.2478/v10134-010-0035-6>.
13. Albertini, G., Etienne, F., and Roumier, A. (2020) Regulation of microglia by neuromodulators: modulations in major and minor modes, *Neurosci. Lett.*, **733**, 135000, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135000>.
14. Feng, Y., and Lu, Y. (2021) Immunomodulatory effects of dopamine in inflammatory diseases, *Front. Immunol.*, **12**, 663102, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663102>.

15. Iliopoulou, S. M., Tsartsalis, S., Kaiser, S., Millet, P., and Tournier, B. B. (2021) Dopamine and neuroinflammation in schizophrenia – interpreting the findings from translocator protein (18 kDa) PET imaging, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **17**, 3345-3357, <https://doi.org/10.2147/NDT.S334027>.
16. Miller, A. H., Haroon, E., Raison, C. L., and Felger, J. C. (2013) Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits, *Depress. Anxiety*, **30**, 297-306, <https://doi.org/10.1002/da.22084>.
17. Abernathy, K., Chandler, L. J., and Woodward, J. J. (2010) Alcohol and the prefrontal cortex, *Int. Rev. Neurobiol.*, **91**, 289-320, [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(10\)91009-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(10)91009-X).
18. Yamato, M., Tamura, Y., Eguchi, A., Kume, S., Miyashige, Y., Nakano, M., Watanabe, Y., and Kataoka, Y. (2014) Brain interleukin-1 $\beta$  and the intrinsic receptor antagonist control peripheral Toll-like receptor 3-mediated suppression of spontaneous activity in rats, *PLoS One*, **9**, e90950, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090950>.
19. Lynch, M. A. (2002) Interleukin-1 beta exerts a myriad of effects in the brain and in particular in the hippocampus: analysis of some of these actions, *Vitam. Horm.*, **64**, 185-219, [https://doi.org/10.1016/s0083-6729\(02\)64006-3](https://doi.org/10.1016/s0083-6729(02)64006-3).
20. Deverman, B. E., and Patterson, P. H. (2009) Cytokines and CNS development, *Neuron*, **64**, 61-78, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.002>.
21. Wei, H., Chadman, K. K., McCloskey, D. P., Sheikh, A. M., Malik, M., Brown, W. T., and Li, X. (2012) Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 831-842, <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2012.01.011>.
22. Kondo, S., Kohsaka, S., and Okabe, S. (2011) Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo, *Mol. Brain*, **4**, 27, <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-27>.
23. Joseph, A. T., Bhardwaj, S. K., and Srivastava, L. K. (2018) Role of prefrontal cortex anti- and pro-inflammatory cytokines in the development of abnormal behaviors induced by disconnection of the ventral hippocampus in neonate rats, *Front. Behav. Neurosci.*, **12**, 244, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00244>.
24. Petitto, J. M., Meola, D., and Huang, Z. (2012) Interleukin-2 and the brain: dissecting central versus peripheral contributions using unique mouse models, *Methods Mol. Biol.*, **934**, 301-311, [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-071-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-071-7_15).
25. Kamegai, M., Niijima, K., Kunishita, T., Nishizawa, M., Ogawa, M., Araki, M., Ueki, A., Konishi, Y., and Tabira, T. (1990) Interleukin-3 as a trophic factor for central cholinergic neurons *in vitro* and *in vivo*, *Neuron*, **2**, 429-436.
26. Fontaine, R. H., Cases, O., Lelièvre, V., Mesplès, B., Renauld, J. C., Loron, G., Degos, V., Dournaud, P., Baud, O., Gressens, P. (2008) IL-9/IL-9 receptor signaling selectively protects cortical neurons against developmental apoptosis, *Cell Death Differ.*, **15**, 1542-1552, <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.79>.
27. Lanfranco, M. F., Mocchetti, I., Burns, M. P., and Villapol, S. (2018) Glial- and neuronal-specific expression of CCL5 mRNA in the rat brain, *Front. Neuroanat.*, **11**, 137, <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00137>.
28. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., and Noble-Haeusslein, L. J. (2013) Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species, *Prog. Neurobiol.*, **106-107**, 1-16, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>.
29. Paxinos, G., and Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn., New York, NY, Academic Press.
30. Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
31. Анохин П. К., Проскурякова Т. В., Шохонова В. А., Кохан В. С., Тарабарко И. Е., Шамакина И. Ю. (2023) Половые различия в аддиктивном поведении взрослых крыс: эффекты пренатальной алкоголизации, *Биомедицина*, **19**, 27-36, <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-2-27-36>.
32. Doremus-Fitzwater, T. L., Youngentob, S. L., Youngentob, L., Gano, A., Vore, A. S., and Deak, T. (2020) Lingering effects of prenatal alcohol exposure on basal and ethanol-evoked expression of inflammatory-related genes in the CNS of adolescent and adult rats, *Front. Behav. Neurosci.*, **14**, 82, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00082>.
33. Figiel, I. (2008) Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain, *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)*, **68**, 526-534, <https://doi.org/10.55782/ane-2008-1720>.
34. Gough, P., and Myles, I. A. (2020) Tumor necrosis factor receptors: pleiotropic signaling complexes and their differential effects, *Front. Immunol.*, **11**, 585880, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585880>.
35. Papazian, I., Tsoukal, A. E., Boutou, A., Karamita, M., Kambas, K., Iliopoulou, L., Fischer, R., Kontermann, R. E., Denis, M. C., Kollias, G., Lassmann, H., and Probert, L. (2021) Fundamentally different roles of neuronal TNF receptors in CNS pathology: TNFR1 and IKK $\beta$  promote microglial responses and tissue injury in demyelination while TNFR2 protects against excitotoxicity in mice, *J. Neuroinflammation*, **18**, 222, <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02200-4>.
36. Базовкина Д. В., Фурсенко Д. В., Першина А. В., Хоцкин Н. В., Баженова Е. Ю., Куликов А. В. (2018) Влияние нокаута гена фактора некроза опухоли на поведение и дофаминовую систему мозга у мышей, *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, **7**, 745-756.

37. Versele, R., Sevin, E., Gosselet, F., Fenart, L., and Candela, P. (2022) TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  modulate blood-brain barrier permeability and decrease amyloid- $\beta$  peptide efflux in a human blood-brain barrier model, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10235, <https://doi.org/10.3390/ijms231810235>.
38. Varodayan, F. P., Pahng, A. R., Davis, T. D., Gandhi, P., Bajo, M., Steinman, M. Q., Kiosses, W. B., Blednov, Y. A., Burkart, M. D., Edwards, S., Roberts, A. J., and Roberto, M. (2023) Chronic ethanol induces a pro-inflammatory switch in interleukin-1 $\beta$  regulation of GABAergic signaling in the medial prefrontal cortex of male mice, *Brain Behav. Immun.*, **110**, 125-139, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.02.020>.
39. Koo, J. W., and Duman, R. S. (2009) Interleukin-1 receptor null mutant mice show decreased anxiety-like behavior and enhanced fear memory, *Neurosci. Lett.*, **456**, 39-43, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.068>.
40. Jones, M., Lebonville, C., Barrus, D., and Lysle, D. T. (2015) The role of brain interleukin-1 in stress-enhanced fear learning, *Neuropsychopharmacology*, **40**, 1289-1296, <https://doi.org/10.1038/npp.2014.317>.
41. Gan, L., and Su, B. (2012) The interleukin 3 gene (IL3) contributes to human brain volume variation by regulating proliferation and survival of neural progenitors, *PLoS One*, **7**, e50375, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050375>.
42. Zambrano, A., Otth, C., Mujica, L., Concha, I. I., and Maccioni, R. B. (2007) Interleukin-3 prevents neuronal death induced by amyloid peptide, *BMC Neurosci.*, **8**, 82, <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-82>.
43. Donninielli, G., Saraf-Sinik, I., Mazzotti, V., Capone, A., Grasso, M. G., Battistini, L., Reynolds, R., Magliozzi, R., and Volpe, E. (2020) Interleukin-9 regulates macrophage activation in the progressive multiple sclerosis brain, *J. Neuroinflammation*, **17**, 149, <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01770-z>.
44. Meng, H., Niu, R., You, H., Wang, L., Feng, R., Huang, C., and Li, J. (2022) Interleukin-9 attenuates inflammatory response and hepatocyte apoptosis in alcoholic liver injury, *Life Sci.*, **288**, 120180, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120180>.
45. Singhera, G. K., MacRedmond, R., and Dorscheid, D. R. (2008) Interleukin-9 and -13 inhibit spontaneous and corticosteroid induced apoptosis of normal airway epithelial cells, *Exp. Lung Res.*, **34**, 579-598.
46. Erta, M., Quintana, A., and Hidalgo, J. (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system, *Int. J. Biol. Sci.*, **8**, 1254-1266, <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>.
47. Hama, T., Kushima, Y., Miyamoto, M., Kubota, M., Takei, N., and Hatanaka, H. (1991) Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures, *Neuroscience*, **40**, 445-452, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90132-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90132-8).
48. Mendonça Torres, P. M., and de Araujo, E. G. (2001) Interleukin-6 increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*, *J. Neuroimmunol.*, **117**, 43-50, [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(01\)00303-4](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00303-4).
49. Butterweck, V., Prinz, S., and Schwaninger, M. (2003) The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice, *Behav. Brain Res.*, **144**, 49-56, [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(03\)00059-7](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(03)00059-7).
50. Balschun, D., Wetzel, W., Del Rey, A., Pitossi, F., Schneider, H., Zuschratter, W., and Besedovsky, H. O. (2004) Interleukin-6: a cytokine to forget, *FASEB J.*, **18**, 1788-1790, <https://doi.org/10.1096/fj.04-1625fje>.
51. Mukherjee, S., Tarale, P., Sarkar, D. K. (2023) Neuroimmune interactions in fetal alcohol spectrum disorders: potential therapeutic targets and intervention strategies, *Cells*, **21**, 2323, <https://doi.org/10.3390/cells12182323>.
52. Айрапетов М. И., Ереско С. О., Бычков Е. Р., Лебедев А. А., Шабанов П. Д. (2021) Пренатальное воздействие алкоголя изменяет TLR4-опосредованную сигнализацию в префронтальной коре головного мозга у крыс, *Биомедицинская химия*, **67**, 500-506, <https://doi.org/10.18097/PBMC20216706500>.

## NEUROIMMUNE CHARACTERISTICS OF ANIMALS WITH PRENATAL ALCOHOL INTOXICATION

**I. Yu. Shamakina<sup>1\*</sup>, P. K. Anokhin<sup>1,2</sup>, R. A. Ageldinov<sup>3</sup>, and V. S. Kokhan<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Serbsky National Medical Research Center of Psychiatry and Narcology,  
Russian Ministry of Health of the Russian Federation,  
119002 Moscow, Russia; e-mail: shamakina.i@serbsky.ru*

<sup>2</sup> *Artificial Intelligence Research Institute, 121170 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Scientific Center for Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia,  
143442 Svetlye Gory, Russia*

Neuroinflammation can be an important factor of many central nervous system (CNS) deficits including cognitive dysfunction, affective disorders and addictive behavior associated with prenatal alcohol

exposure and presented in early adulthood. In this study we used an experimental rodent model of prenatal alcohol (PA) exposure (consumption of a 10% ethanol solution by female Wistar rats throughout pregnancy), multiplex immunofluorescence analysis of interleukins (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-9 and IL-12), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and chemokine CCL5, as well as quantitative real-time PCR to assess the level of cytokine mRNA in the prefrontal cortex of sexually mature (PND60) offspring – male and female rats with prenatal alcohol intoxication and control animals. A significant decrease in the content of TNF- $\alpha$  and interleukins IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-9 was established in the prefrontal cortex of male, but not female PA offspring. Importantly, PA males also showed a decrease in the level of TNF- $\alpha$  mRNA in the prefrontal cortex by 45% compared to the control males, which may underlie a detected decrease in its content. Taken together, our study demonstrates that a number of neuro-immune factors are regulated in a sex-specific manner in the prefrontal cortex and are differentially affected in males and females by prenatal exposure to alcohol. Sex factor must be taken into account when conducting further translational fetal alcohol spectrum disorders and developing new methods for prevention and therapy.

*Keywords:* prenatal alcohol intoxication, neuroinflammation, prefrontal cortex, interleukins, tumor necrosis factor, mRNA expression

УДК 577.151.63

## ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ ПОТОМСТВА КРЫС, ЗАЧАТЫХ ОТЦОМ В АЛКОГОЛЬНОМ ОПЬЯНЕНИИ

© 2024 С.К. Судаков\*, Н.Г. Богданова, Г.А. Назарова, Н.Н. Золотов

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина,  
125315 Москва, Россия; электронная почта: s-sudakov@mail.ru

Поступила в редакцию 22.05.2024

После доработки 16.07.2024

Принята к публикации 06.08.2024

Достаточно часто зачатие ребёнка происходит после употребления небольших доз алкоголя. Тем не менее влияние данного фактора на потомство совершенно не изучено. Целью настоящего исследования было изучение уровня двигательной активности, тревожно-подобного и депрессивно-подобного поведения, чувствительности к анальгетическому действию этанола, а также активности ферментов дипептидилпептидазы IV (DPP-IV), пролилэндопептидазы (PEP) и алкогольдегидрогеназы (ADG) в крови крыс, отцам которых непосредственно перед спариванием однократно через зонд в желудок вводили этанол в дозе 0,5 или 1,5 г/кг. В результате проведённых экспериментов было обнаружено, что у самцов, зачатых отцами, находящимися в состоянии алкогольного опьянения, имеются существенные отличия в поведении по сравнению с обычными животными. Так, двигательная активность у крыс, зачатых самцами в алкогольном опьянении, была в 2–2,5 раза менее интенсивной, у них снижалась выраженность тревожно-подобного и депрессивно-подобного поведения. У таких животных была увеличена активность DPP-IV и ADG и снижена активность PEP в крови. У крыс, зачатых отцами, находящимися в состоянии алкогольного опьянения, уменьшался анальгетический эффект этанола, а также наблюдалось снижение реакции изменения активности ADG, DPP-IV и PEP в ответ на введение этанола. Предполагается, что однократное употребление этанола самцами крыс непосредственно перед спариванием приводит у потомства к эпигенетическому изменению экспрессии генов, наследуемых по отцовской линии. В результате этого может изменяться активность ряда ферментов, что приводит к изменению баланса нейропептидов, участвующих в формировании поведения животных.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** этанол, потомство, алкогольдегидрогеназа, пептидазы, плазма крови, флуориметрический анализ, открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, горячая пластина.

DOI: 10.31857/S0320972524110077 EDN: IKRJTH

### ВВЕДЕНИЕ

Показано, что употребление алкоголя во время беременности оказывает значительное негативное влияние на поведение будущего потомства [1, 2]. Также имеются отдельные сведения о том, что существенное злоупотребление этанолом отцом в течение длительного периода времени перед зачатием может влиять на поведение по-

Принятые сокращения: ADG – алкогольдегидрогеназа; DPP-IV – дипептидилпептидаза IV; PEP – пролилэндопептидаза.

\* Адресат для корреспонденции.

томства. Так, у потомства алкоголизированных мышей возникали дефицит внимания и гиперактивность [3], гипоактивность [4], нарушения обучаемости [5], снижение уровня тревожности [6], снижение чувствительности к этанолу [7] и снижение влечения к алкоголю [8]. По неофициальным данным, во всём мире и особенно в России не менее 20% всех зачатий происходит после употребления умеренных количеств этанола. Однако влияние данного фактора на поведение будущего потомства практически не изучено. Нам удалось обнаружить только две работы, посвящённые влиянию однократного потребления самцом этанола в существенной дозе перед спариванием.

Отмечалось, что у потомства часто возникают пороки развития [9], а также потомки менее осторожны и более агрессивны, чем «нормальные» животные [10].

Поведение человека и животных в большой степени определяется нейромедиаторными и нейромодуляторными процессами в центральной нервной системе. Важную роль в этом играют различные нейропептиды, количество которых в существенной мере зависит от активности ферментов их деградации. Так, дипептидилпептидаза IV (DPP-IV) участвует в расщеплении таких пептидов, как факторы роста, хемокины, инкремины, нейропептиды и вазоактивные пептиды. Показано, что DPP-IV участвует в формировании толерантности и зависимости от этанола [11].

Пролилэндопептидаза (PEP) принимает участие в деградации многих пептидных гормонов и нейропептидов. Роль PEP в действии этанола на организм человека и животных изучена мало.

Активность DPP-IV и PEP может служить маркером агрессивного поведения [12], выраженности тревожности [13] или депрессии [14]. Показано, что больные алкоголизмом имеют крайне низкую активность DPP-IV и PEP [15].

Ферментом, расщепляющим эндогенный и экзогенный этанол, является алкогольдегидрогеназа (ADG). Роль этого ферmenta в чувствительности к действию этанола хорошо изучена [16].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования было изучение уровня двигательной активности, тревожно-подобного и депрессивно-подобного поведения, чувствительности к анальгетическому действию этанола, а также активности ферментов DPP-IV, PEP и ADG в крови крыс, отцы которых непосредственно перед спариванием получали этанол.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Эксперименты выполнены на крысах линии Вистар, полученных из питомника «Столбовая» (Москва, Россия). Животные содержались в вентилируемых клетках Techniplast green line 1500U («Techniplast», Италия) с натуральной кукурузной подстилкой («Золотой Кот», Воронеж, Россия) по 4–5 особей, со свободным доступом к воде и стандартным комбинированным кормом (3 ккал/г; «Профгрызун», Москва, Россия) при средней температуре в помещении 21 °C, средней влажности 20%, при наличии освещения (90 люкс) с 20:00 до 08:00.

**Процедура спаривания.** Для спаривания были использованы крысы массой 210–240 г (самцы) и 170–200 г (самки) в возрасте 2–3 месяцев. Были сформированы 3 группы самцов и самок

по 4 крысы каждого пола с одинаковым средним уровнем двигательной активности в группах. Самку в состоянии эструса саживали с самцом на 24 часа. В момент спаривания в каждой экспериментальной клетке находились 1 самец и 1 самка.

Самцы 1-й (контрольной) группы получали внутрижелудочно воду. Самцам крыс 2-й и 3-й группы непосредственно перед спариванием через специальный зонд в желудок вводили 20%-ный раствор этанола в дозе 0,5 или 1,5 г/кг. Самцы получали растворы сразу после начала ухаживания, а затем снова помещались к самке. Самкам крыс ничего не вводили. В каждой группе принесли потомство по три самки из четырёх.

**Исследование потомства.** В результате спаривания контрольных животных родилось 15 самцов и 16 самок. При спаривании с участием отцов, получавших 0,5 г/кг этанола, родилось 15 самцов и 16 самок, и при участии самцов, потреблявших 1,5 г/кг этанола – 16 самцов и 16 самок. В дальнейших исследованиях использовали только самцов. У 46 самцов, зачатых в условиях, описанных выше, изучали поведение в возрасте с 2 до 3 месяцев. У всех этих животных последовательно, с интервалом в 3–5 дней, определяли уровень двигательной активности, поведение в тестах «открытое поле», «крестообразный приподнятый лабиринт» и «подвешивание за хвост». В заключение у них определяли чувствительность к анальгетическому действию этанола в teste «горячая пластина». Через 72 часа после введения этанола и определения его анальгетического действия животных декапитировали и проводили забор крови для биохимических исследований.

**Определение уровня двигательной активности.** Крыс индивидуально помещали на 60 мин в экспериментальные камеры «Phenomaster» («TSE Systems», Германия), где у них автоматически определялась общая горизонтальная двигательная активность, двигательная активность в центре и количество стоек в течение 60 мин с интервалом в 10 мин. При этом экспериментальные камеры были идентичны «домашним» клеткам, в которых крысы содержались ранее для минимизации стрессирующего эффекта. Эксперименты проводили с 11 до 15 часов в отсутствии освещения. Одновременно использовали 8 камер «Phenomaster».

**Определение поведения в «открытом поле».** «Открытое поле» представляло собой круглую арену диаметром 98 см, окружённую стенками высотой 31 см («OpenScience», Россия, модель TS0501-R). Аrena разделена линиями на 7 центральных и 12 периферийных секторов. Аrena равномерно освещалась медицинской лампой (освещённость поверхности арены – 450 люкс). Для теста крысу

помещали в центр арены и наблюдали горизонтальную активность (общее количество пересечённых квадратов), количество стоек и выходов в центр в течение 5 мин.

**Определение уровня тревожно-подобного поведения в крестообразном приподнятом лабиринте.** В тесте был использован аппарат «The Elevated Plus Maze» («Columbus Instruments», США). Это крестообразная платформа с четырьмя рукавами (длина – 50 см, ширина – 15 см). Два противоположных рукава лабиринта имеют высокие непрозрачные стены, тогда как два других открыты. Высота стенок закрытых рукавов составляет 43 см. Лабиринт поднят на высоту 75 см. Центральная часть аппарата составляет 15 см<sup>2</sup>. Освещённость поверхности лабиринта – 90 люкс. Крысу помещали на 5 мин в центр платформы и измеряли количество переходов из отсека в отсек, а также время, проведённое в центре, на закрытых и открытых рукавах аппарата.

**Определение уровня депрессивно-подобного поведения в teste «подвешивание за хвост».** Суть теста состоит в том, что каждая крыса при помощи липкой ленты и специального крепления подвешивается вниз головой за хвост на 6 мин (установка «TSE Systems», Tail Suspension Monitor, 303590 series). Детектируются длительность (с) и число периодов иммобилизации, длительность (с) и число периодов активных и пассивных движений. Под активными движениями понимают энергичные движения всем телом животного и кручение вокруг оси в teste. За пассивные движения принимали неторопливое движение одной или двумя лапами и движения головой, а именно раскачивание или подёргивание усами. Все остальные неподвижные зависания учитывались как иммобилизация.

**Определение чувствительности к анальгетическому действию этанола.** Животные каждой из трёх групп для этого теста были рандомизированы по уровню двигательной активности и разделены на 2 подгруппы: крысам первой подгруппы за 30 мин до теста внутрижелудочно вводили 20%-ный этанол в дозе 1,5 г/кг. Крысы второй подгруппы в каждой группе получали изотонический раствор хлорида натрия. Каждое животное помещали на поверхность прибора «Hot plate» («TSE Systems»), имеющего температуру 56 °C. Измеряли латентный период начала облизывания лап.

**Определение активности ферментов. Пробо-подготовка.** Активность ADG, PEP и DPP-IV определяли в плазме крови, для получения которой использовали пробирки с ЭДТА. Пробы центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об./мин. Плазму переносили в чистые пробирки и хранили при температуре -70 °C до проведения исследования.

**Флуориметрический метод определения активности PEP и DPP-IV.** Метод основан на флуориметрическом определении освобождающегося в процессе ферментативной реакции с пептидом Z-Ala-Pro-MCA (для PEP) или с пептидом Gly-Pro-MCA (для DPP-IV) 7-амино-4-метилкумарина, имеющего отличный от пептидов спектр флуоресценции. Гидролиз субстрата регистрировался после 30 мин инкубации при 37 °C на спектрофлуориметре LS-5B («Perkin-Elmer», США). Количество освободившегося 4-метил-7-аминокумарина определяли из величины флуоресценции. Удельную активность ферментов определяли по формуле (1):

$$A = [(E-C)/(S-B)] \cdot t^{-1} \cdot v^{-1}, \quad (1)$$

где E – флуоресценция пробы (380/460 нм); C – флуоресценция смеси, содержащей по 0,05 мл субстрата и ферmenta, 1,9 мл Tris-HCl-буфера (приготовленного из Tris-основания, «Serva», Германия) (pH 8,0), содержащего по 1 mM ЭДТА-Na<sub>2</sub> («Reanal», Венгрия), дитиотреитола («Serva») и NP-40 («Sigma-Aldrich») и 1 мл ацетатного буфера (pH 4,0); B – флуоресценция смеси, содержащей 0,05 мл субстрата, 1,95 мл Tris-HCl-буфера (pH 8,0), содержащего по 1 mM ЭДТА-Na<sub>2</sub>, дитиотреитола и NP-40 и 1 мл ацетатного буфера (pH 4,0); S – флуоресценция смеси, содержащей 0,05 мл субстрата, 1,93 мл Tris-HCl-буфера (pH 8,0), содержащего по 1 mM ЭДТА-Na<sub>2</sub>, дитиотреитола и NP-40 и 1 мл ацетатного буфера (pH 4,0), и 0,02 мл раствора 7-амино-4-метилкумарина («Serva») (2 нмоль). Остановку реакции производили добавлением в инкубационную смесь 1 мл ацетатного буфера (pH 4,0).

**Спектрофотометрический метод определения активности ADG.** Активность ADG в плазме крови определяли модифицированным спектрофотометрическим методом Mezey et al. [17]. Для этого в пробу к 50 мкл плазмы добавляли по 400 мкл глицинового буфера (pH 8,8), 3%-ного раствора этанола и раствора NAD («Fluka», Швейцария) (3 мг/мл воды), далее каждую пробу инкубировали на водянной бане в течение 60 мин при температуре 37 °C и определяли оптическую плотность при длине волн 340 нм на спектрофотометре DU-50 («Beckman», США). Активность ADG (мкмоль NADH/мл·мин) рассчитывали с использованием молярного коэффициента экстинкции восстановленной формы пиридиннуклеотидов (6,22 ммоль/мл/см).

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку результатов проводили по алгоритмам программы «Statistica 13.0» с проверкой соответствия распределения эмпирических данных нормальному закону по критерию

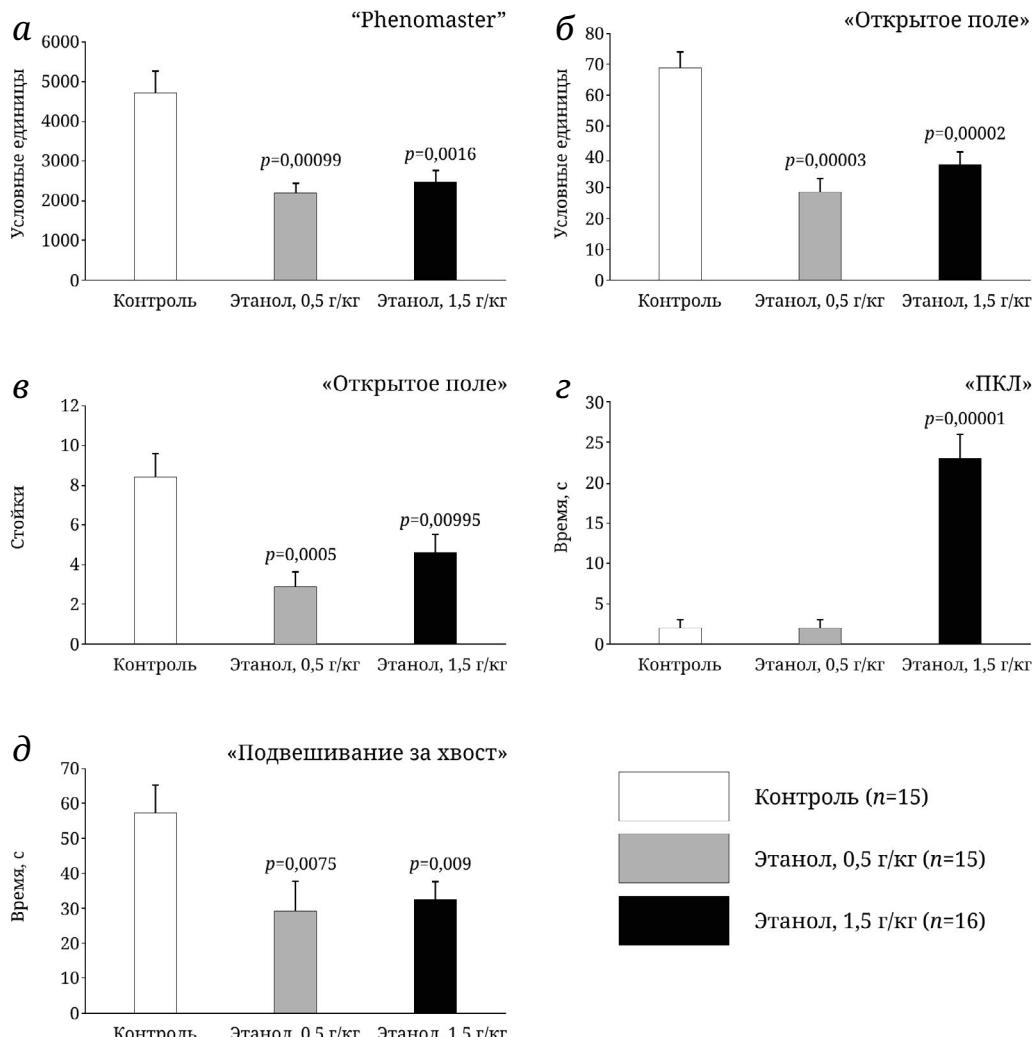
Шапиро–Уилка. В случае соответствия для сравнения средних значений нескольких независимых выборок применяли однофакторный дисперсионный анализ (one way ANOVA) с последующим сравнением средних значений дисперсионного комплекса по тесту Дункана; при несоответствии – непараметрический однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, в этом случае post hoc анализ проводили по непараметрическому U-критерию Манна–Уитни. Данные представлены в виде  $M \pm SEM$ , где  $M$  – среднее,  $SEM$  – стандартная ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

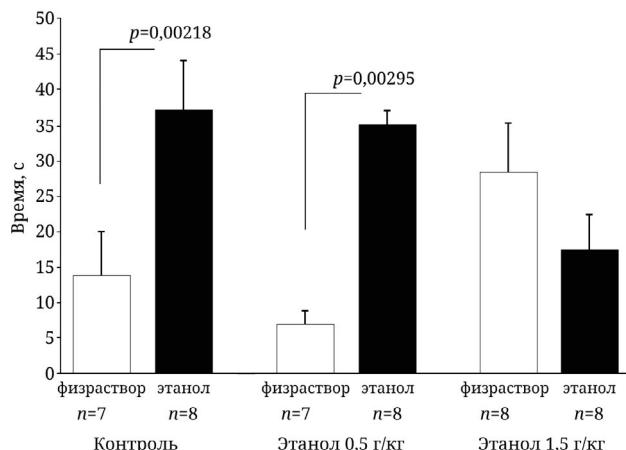
**Поведенческие изменения.** В результате проведённых экспериментов было обнаружено,

что у самцов, зачатых отцами, находящимися в состоянии алкогольного опьянения, имеются существенные отличия в поведении по сравнению с обычными животными. Так, двигательная активность у крыс, зачатых в алкогольном опьянении, была в 2–2,5 раза менее интенсивной:  $U = 36,00$ ,  $p = 0,000997$  при сравнении группы «Контроль» с группой «Этанол 0,5 г/кг», и  $U = 62,00$ ,  $p = 0,001642$  при сравнении с группой «Этанол 1,5 г/кг» (рис. 1, а).

В teste «открытое поле» также было обнаружено снижение у этанол-зачатых крыс горизонтальной двигательной активности (достоверное отличие от контроля,  $U = 19,50$ ,  $p = 0,000027$  в группе «Этанол 0,5 г/кг»;  $U = 33,50$ ,  $p = 0,000018$  в группе «Этанол 1,5 г/кг» (рис. 1, б)) и вертикальной двигательной активности (достоверное отличие от контроля,  $U = 32,50$ ,  $p = 0,000478$  в группе



**Рис. 1.** Изменения в поведении самцов крыс, зачатых отцами, находящимися в состоянии алкогольного опьянения. а – двигательная активность ( усл. ед.) в экспериментальных камерах «Phenomaster»; б – горизонтальная двигательная активность ( усл. ед.) в teste «открытое поле»; в – вертикальная двигательная активность (стойки) в teste «открытое поле»; г – длительность пребывания в светлых рукавах ПКЛ (с); д – длительность иммобилизации крыс в teste «подвешивание за хвост» (с). На рисунках обозначены достоверные различия от контроля (непараметрический U-критерий Манна–Уитни)



**Рис. 2.** Латентный период облизывания лап крыс опытных групп в тесте «горячая пластина». \* Достоверные различия между животными, которым вводили физраствор и этанол, в каждой группе потомства,  $U = 3,00, p = 0,002176$  в группе «Контроль»;  $U = 5,50, p = 0,002953$  в группе «Этанол 0,5 г/кг»

«Этанол 0,5 г/кг»;  $U = 78,00, p = 0,00995$  в группе «Этанол 1,5 г/кг» (рис. 1, е).

У потомства, зачатого отцами, которым вводили 1,5 г/кг этанола, наблюдалось увеличение времени пребывания в светлых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) более чем в 5 раз,  $U = 14,50, p = 0,00001$  (рис. 1, г).

В teste «подвешивание за хвост» у крыс, зачатых отцами, находящимися в алкогольном опьянении, наблюдалось уменьшение времени иммобилизации. Достоверное отличие от контроля,  $U = 49,50, p = 0,007544$  в группе «Этанол 0,5 г/кг»;  $U = 77,50, p = 0,008991$  в группе «Этанол 1,5 г/кг» (рис. 1, д).

Обнаружено, что болевая чувствительность этанол-зачатых крыс достоверно не отличается от таковой у контрольных животных. Введение 1,5 г/кг этанола приводило к достоверному увеличению латентного периода начала облизывания лап (анальгезия) у контрольных животных и у крыс, зачатых отцами, которым вводили 0,5 г/кг этанола. Однако у крыс, зачатых отцами, которым вводили этанол в дозе 1,5 мг/кг, анальгетический эффект этанола отсутствовал (рис. 2).

**Изменения активности ферментов.** Активность ADG у животных, зачатых отцами, которым вводили 1,5 г/кг этанола, была достоверно выше, чем у животных остальных групп. После введения этанола активность ADG достоверно снижалась во всех группах (табл. 1).

Активность DPP-IV у животных, зачатых отцами, которым вводили 1,5 г/кг этанола, была увеличена по сравнению с животными остальных групп. После введения этанола активность DPP-IV достоверно увеличивалась только у контрольных животных (табл. 1).

Активность PEP у животных, зачатых отцами, которым вводили 1,5 г/кг этанола, была существенно ниже, чем у животных остальных групп. После введения этанола активность PEP достоверно снижалась у животных контрольной группы и у животных, зачатых отцами, которым вводили этанол в дозе 0,5 мг/кг. У крыс, зачатых отцами, которым вводили 1,5 мг/кг этанола, снижения активности PEP после инъекции этанола не наблюдалось (табл. 1).

При сравнении активности ADG использовали анализ «one way ANOVA» с последующим сравнением средних значений дисперсионного комплекса по тесту Дункана. При сравнении активности других ферментов – непараметрический однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса с апостериорным попарным анализом по непараметрическому U-критерию Манна–Уитни.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами обнаружены выраженные изменения в поведении крыс-самцов, отцы которых перед спариванием получали этанол в малых или средних дозах. Так, снижение уровня двигательной активности определялось и в аппарате «Phenomaster», и в teste «открытое поле». Ранее гипоактивность мышей была зарегистрирована у животных, чьи отцы длительное время получали этанол перед их зачатием [4]. Также нами было показано увеличение времени пребывания на открытых луках крестообразного приподнятого лабиринта у потомства алкоголизированных отцов, что свидетельствует о снижении у них уровня тревожности. Этот факт был ранее описан для потомства отцов, хронически получавших этанол перед спариванием [6]. Кроме этого, результаты наших экспериментов показали, что введение отцам перед спариванием этанола в дозе 1,5 г/кг приводит у потомства к уменьшению депрессивно-подобной реакции на стресс и снижению чувствительности к анальгетическому действию этанола. Снижение чувствительности к этанолу также было показано ранее для потомства хронически алкоголизированных мышей [7]. Влияния на депрессивность ранее показано не было. Таким образом, однократное введение самцам крыс непосредственно перед спариванием малых и средних доз этанола вызывает у потомства такие же поведенческие изменения, как и у потомства хронически алкоголизированных отцов.

Активность ADG в крови животных, отцам которых вводили этанол, была выше, чем у контрольных крыс. Поскольку показано, что ADG может участвовать в механизмах анальгезии,

**Таблица 1.** Активность ферментов ADG, DPP-IV и PEP в плазме крови крыс

Физраствор / этанол	Контроль	Этанол 0,5 г/кг	Этанол 1,5 г/кг
ADG (мкмоль/мг/мин)			
Физраствор	19,073 ± 0,91	19,475 ± 0,70	21,798 ± 0,96* MS = 4,2465 df = 42,00 p = 0,0428
Этанол 1,5 г/кг	17,896 ± 0,77# MS = 4,2465 df = 42,00 p = 0,0027	16,969 ± 0,61# MS = 4,2465 df = 42,00 p = 0,0104	19,819 ± 0,71
DPP-IV (нмоль/мг/мин)			
Физраствор	2,694 ± 0,15	2,943 ± 0,14	3,269 ± 0,09* U = 12,00 p = 0,0379
Этанол 1,5 г/кг	3,077 ± 0,2# U = 13,00 p = 0,0488	3,134 ± 0,11	3,355 ± 0,12
PEP (нмоль/мг/мин)			
Физраствор	0,946 ± 0,04	0,955 ± 0,03	0,789 ± 0,01* U = 7,00 p = 0,0069
Этанол 1,5 г/кг	0,774 ± 0,02# U = 6,00 p = 0,0046	0,804 ± 0,03# U = 5,00 p = 0,0029	0,799 ± 0,01

Примечание. \* Достоверные различия между группами потомства, зачатого отцами, которым вводили этанол, и потомством, зачатым отцами, которым вводили воду; # достоверные различия между животными, которым вводили физраствор и этанол, в каждой группе потомства.

вызванной введением этанола [18], то этим может объясняться снижение чувствительности к анальгетическому действию этанола у животных, зачатых отцами в состоянии алкогольного опьянения.

Результаты наших экспериментов не позволяют выявить причинную связь изменений активности ферментов с изменением поведения. Однако мы можем сделать предположение, что увеличение активности DPP-IV и снижение активности PEP в крови животных, зачатых отцами, находящимися в алкогольном опьянении, изменяет нормальное соотношение регуляторных нейропептидов и пептидных гормонов, что и вызывает поведенческие изменения. Чтобы узнать, какие конкретно изменения происходят при изменении активности DPP-IV и PEP, требуется проведение специальных экспериментов. Тем не менее в настоящее время можно сделать некоторые предположения. Так, снижение активности PEP в крови может приводить к увеличению уровня тиротропин-фактора, обладающего антидепрессантными свойствами [19, 20]. Ранее в эксперименте на мышах были выявлены антидепрессантные свойства синтетических ингибиторов PEP [21].

Увеличение активности DPP-IV у потомства может указывать на снижение концентрации вещества P, влияющего на восприятие боли посредством модуляции концентрации SP на периферии и активации пептидом периферических рецепторов NK1 [22]. Ещё одним важным субстратом для DPP-IV является тетрапептид эндоморфин-2 [23]. Возможно, DPP-IV модулирует анальгезию, индуцированную эндоморфином-2. Третий важный субстрат DPP-IV – нейропептид Y (NPY) [24], играющий важнейшую роль в регуляции аффективного состояния, реакции на стресс и патогенезе ряда заболеваний, в том числе депрессии.

Кроме того, нами было обнаружено, что у потомства алкоголизированных отцов наблюдается подавление реакции изменения активности ферментов в ответ на введение этанола. Если в контроле этанол вызывает увеличение активности DPP-IV и снижение активности PEP, то у потомства алкоголизированных отцов эти реакции отсутствуют. По-видимому, это является проявлением общей закономерности: потомство самцов, перед спариванием получавших этанол, менее чувствительно к большинству эффектов этанола [7].

Показано, что хроническое употребление этанола самцами мышей приводит к уменьшению метилирования импринтируемых генов в сперматозоидах, в том числе генов нейротрофических факторов [25]. Это может приводить к изменению функционирования лимбических структур мозга и, как следствие, к изменению поведения животных. Если учесть, что однократное употребление этанола оказывает такое же действие на потомство, как хроническое, то нельзя исключить, что наблюдаемые нами изменения у потомства алкоголизированных отцов могут быть связаны с данным эпигенетическим механизмом. В результате этого может изменяться активность ряда ферментов, что приводит к изменению баланса нейропептидов, участвующих в формировании поведения животных.

**Вклад авторов.** С.К. Судаков – концепция и руководство работой; Н.Г. Богданова, Г.А. Назарова – проведение экспериментов; С.К. Судаков, Н.Н. Золотов – обсуждение результатов исследования и написание текста; Н.Г. Богданова – редактирование текста статьи.

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

**Соблюдение этических норм.** Протоколы и процедуры этого исследования были рассмотрены и одобрены этической комиссией Научно-исследовательского института нормальной физиологии имени П.К. Анохина (номер разрешения 351 от 11 сентября 2023 года) и соответствуют Директиве 2010/63/EС.

**Финансирование.** Работа не получала дополнительного финансирования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gilliam, D. M., Stilman, A., Dudek, B. C., and Riley, E. P. (1987) Fetal alcohol effects in long- and short-sleep mice: activity, passive avoidance, and in utero ethanol levels, *Neurotoxicol. Teratol.*, **9**, 349-357, [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(87\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0892-0362(87)90030-4).
2. Carneiro, L. M., Diógenes, J. P., Vasconcelos, S. M., Aragão, G. F., Noronha, E. C., Gomes, P. B., and Viana, G. S. (2005) Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol, *Neurotoxicol. Teratol.*, **27**, 585-592, <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2005.06.006>.
3. Kim, P., Choi, C. S., Park, J. H., Joo, S. H., Kim, S. Y., Ko, H. M., Kim, K. C., Jeon, S. J., Park, S. H., Han, S. H., Ryu, J. H., Cheong, J. H., Han, J. Y., Ko, K. N., and Shin, C. Y. (2014) Chronic exposure to ethanol of male mice before mating produces attention deficit hyperactivity disorder-like phenotype along with epigenetic dysregulation of dopamine transporter expression in mouse offspring, *J. Neurosci. Res.*, **92**, 658-670, <https://doi.org/10.1002/jnr.23275>.
4. Abel, E. L., and Lee, J. A. (1988) Paternal alcohol exposure affects offspring behavior but not body or organ weights in mice, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **12**, 349-355, <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1988.tb00205.x>.
5. Wozniak, D. F., Cicero, T. J., Kettinger, L., and Meyer, E. R. (1991) Paternal alcohol consumption in the rat impairs spatial learning performance in male offspring, *Psychopharmacology*, **105**, 289-302, <https://doi.org/10.1007/BF02244324>.
6. Ledig, M., Misslin, R., Vogel, E., Holownia, A., Copin, J. C., and Tholey, G. (1998) Paternal alcohol exposure: developmental and behavioral effects on the offspring of rats, *Neuropharmacology*, **37**, 57-66, [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00185-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00185-8).
7. Rompala, G. R., Finegersh, A., Slater, M., and Homanics, G. E. (2017) Paternal preconception alcohol exposure imparts intergenerational alcohol-related behaviors to male offspring on a pure C57BL/6J background, *Alcohol*, **60**, 169-177, <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2016.11.001>.
8. Finegersh, A., and Homanics, G. E. (2014) Paternal alcohol exposure reduces alcohol drinking and increases behavioral sensitivity to alcohol selectively in male offspring, *PLoS One*, **9**, e99078, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099078>.
9. Bielawski, D. M., and Abel, E. L. (1997) Acute treatment of paternal alcohol exposure produces malformations in offspring, *Alcohol*, **4**, 397-401, [https://doi.org/10.1016/s0741-8329\(97\)87951-87957](https://doi.org/10.1016/s0741-8329(97)87951-87957).
10. Meek, L. R., Myren, K., Sturm, J., and Burau, D. (2007) Acute paternal alcohol use affects offspring development and adult behavior, *Physiol. Behav.*, **91**, 154-160, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.02.004>.
11. Sharma, A. N., Pise, A., Sharma, J. N., and Shukla, P. (2015) Dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) inhibitor delays tolerance to anxiolytic effect of ethanol and withdrawal-induced anxiety in rats, *Metab. Brain Dis.*, **30**, 659-667, <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9603-7>.
12. Frenssen, F., Croonenberghs, J., Van den Steene, H., and Maes, M. (2015) Prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV are associated with externalizing and aggressive behaviors in normal and autistic adolescents, *Life Sci.*, **136**, 157-162, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.003>.
13. Maes, M., Goossens, F., Lin, A., De Meester, I., Van Gastel, A., and Scharpé, S. (1998) Effects of psychological stress on serum prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity in humans: higher serum prolyl

- endopeptidase activity is related to stress-induced anxiety, *Psychoneuroendocrinology*, **23**, 485-495, [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(98\)00020-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(98)00020-1).
14. Maes, M., Lin, A., Bonaccorso, S., Vandoolaeghe, E., Song, C., Goossens, F., De Meester, I., Degroote, J., Neels, H., Scharpé, S., and Janca, A. (1998) Lower serum activity of prolyl endopeptidase in fibromyalgia is related to severity of depressive symptoms and pressure hyperalgesia, *Psychol. Med.*, **28**, 957-965, <https://doi.org/10.1017/s0033291798006801>.
  15. Maes, M., Lin, A., Bonaccorso, S., Vandoolaeghe, E., Song, C., Goossens, F., De Meester, I., Degroote, J., Neels, H., Scharpé, S., and Janca, A. (1999) Lower activity of serum peptidases in abstinent alcohol-dependent patients, *Alcohol*, **17**, 1-6, [https://doi.org/10.1016/s0741-8329\(98\)00022-6](https://doi.org/10.1016/s0741-8329(98)00022-6).
  16. Crabb, D. W., Matsumoto, M., Chang, D., and You, M. (2004) Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology, *Proc. Nutr. Soc.*, **63**, 49-63, <https://doi.org/10.1079/pns2003327>.
  17. Mezey, E., Cherrick, G. R., and Holt, P. R. (1968) Serum alcohol dehydrogenase, an indicator of intrahepatic cholestasis, *N. Engl. J. Med.*, **279**, 241-248, <https://doi.org/10.1056/NEJM196808012790504>.
  18. Jin, S., Cinar, R., Hu, X., Lin, Y., Luo, G., Lovinger, D. M., Zhang, Y., and Zhang, L. (2021) Spinal astrocyte aldehyde dehydrogenase-2 mediates ethanol metabolism and analgesia in mice, *Br. J. Anaesth.*, **127**, 296-309, <https://doi.org/10.1016/j.bja.2021.02.035>.
  19. Szuba, M. P., Amsterdam, J. D., Fernando, A., and Winokur, A. (2005). Rapid antidepressant response after nocturnal TRH administration in patients with bipolar type I and bipolar type II major depression, *J. Clin. Psychopharmac.*, **25**, 325-330, <https://doi.org/10.1097/01.jcp.0000169037.17884.79>.
  20. Charli, J.-L., Rodriguez-Rodríguez, A., Hernández-Ortega, K., Cote-Vélez, A., Uribe, R. M., Jaimes-Hoy, L., and Joseph-Bravo, P. (2020) The thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme, a therapeutic target? *Front. Pharmacol.*, **11**, 640, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00640>.
  21. Золотов Н. Н., Наркевич В. Б., Позднєв В. Ф. (1992) О психотропных свойствах ингибиторов пролилэндепептидазы мозга, *Докл. Акад. Наук СССР*, **322**, 624-625.
  22. Guieu, R., Fenouillet, E., Devaux, C., Fajloun, Z., Carrega, L., Sabatier, J. M., Sauze, N., and Marguet, D. (2006) CD26 modulates nociception in mice via its dipeptidyl-peptidase IV activity, *Behav. Brain Res.*, **166**, 230-235, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.08.003>.
  23. Fichna, J., do-Rego, J-C., Chung, N. N., Lemieux, C., Schiller, P. W., Poels, J., Broeck, J. V., Costentin, J., and Janecka, A. (2007) Synthesis and characterization of potent and selective  $\mu$ -opioid receptor antagonists, [Dmt1, D-2-Nal4] endomorphin-1 (antanal-1) and [Dmt1, D-2-Nal4]endomorphin-2 (antanal-2), *Pharmacol Rev.*, **59**, 88-123.
  24. Wagner, L., Kaestner, F., Wolf, R., Stiller, H., Heiser, U., Manhart, S., Hoffmann, T., Rahfeld, J. U., Demuth, H. U., Rothermundt, M., von Hörsten, S. (2016). Identifying neuropeptide Y (NPY) as the main stress-related substrate of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) in blood circulation, *Neuropeptides*, **57**, 21-34, <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.02.007>.
  25. Liang, F., Diao, L., Liu, J., Jiang, N., Zhang, J., Wang, H., Zhou, W., Huang, G., and Ma, D. (2014) Paternal ethanol exposure and behavioral abnormalities in offspring: associated alterations in imprinted gene methylation, *Neuropharmacology*, **81**, 126-133, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.025>.

## FEATURES OF THE BEHAVIOR AND ACTIVITY OF BLOOD ENZYMES OF THE OFFSPRING OF RATS CONCEIVED BY THEIR FATHER UNDER THE INFLUENCE OF ALCOHOL

**S. K. Sudakov\*, N. G. Bogdanova, G. A. Nazarova, and N. N. Zolotov**

*Federal State Budgetary Scientific Institution*

*"Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies"*  
*P. K. Anokhin Research Institute, 125315 Moscow, Russia; e-mail: s-sudakov@mail.ru*

Quite often, conception of a child occurs after consuming small doses of alcohol. However, the effect of this factor on offspring has not been studied at all. The aim of this study was to study the level of motor activity, anxiety-like and depressive-like behavior, sensitivity to the analgesic effect of ethanol, as well as the activity of the enzymes DPP-IV, PEP and ADG in the blood of rats whose fathers received ethanol immediately before mating. As a result of the experiments conducted, it was found that males conceived by fathers who were intoxicated have significant differences in behavior compared

to control animals. Thus, motor activity in rats conceived by males under the influence of alcohol was 2-2.5 times less intense, they decreased the severity of anxiety-like and depressive-like behavior. In such animals, the activity of DPP-IV and ADG was increased and the activity of PEP in the blood was reduced. In rats conceived by fathers under the influence of alcohol, the analgesic effect of ethanol decreased, and there was also a decrease in the reaction of ADG, DPP-IV and PEP to ethanol administration. It is assumed that a single use of ethanol by male rats immediately before mating leads to a decrease in the methylation of paternal inherited genes in offspring. As a result, the activity of a number of enzymes may change, which leads to a change in the balance of neuropeptides involved in formation of animal behavior.

*Keywords:* ethanol, offspring, alcohol dehydrogenase, peptidases, blood plasma, fluorimetric analysis, open field, elevated plus maze, hot plate

## ПУРМОФАМИН ИЗМЕНЯЕТ ТРЕВОЖНО-ПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ КОМПОНЕНТОВ КАСКАДА Hedgehog В МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ОТМЕНЫ АЛКОГОЛЯ

© 2024 Д.И. Перегуд<sup>1,2\*</sup>, Н.И. Широбокова<sup>2</sup>, А.А. Квичанский<sup>2</sup>,  
М.Ю. Степаничев<sup>2</sup>, Н.В. Гуляева<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России,  
119034 Москва, Россия; электронная почта: peregud\_d@yahoo.com

<sup>2</sup> ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
117485 Москва, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева»  
Департамента здравоохранения города Москвы, 115419 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.05.2024

После доработки 13.07.2024

Принята к публикации 06.08.2024

Нарушения функционирования секреторных белков Hedgehog (Hh) играют важную роль в дисморфогенезе элементов костной ткани и ЦНС припренатальном воздействии алкоголя, что лежит в основе развития фетального алкогольного синдрома. Вовлеченность Hh в механизмы потребления алкоголя в зрелом возрасте до настоящего времени не изучена. Целью работы было исследование роли каскада Hh в потреблении алкоголя, а также развитии тревожно-подобного поведения (ТПП) после отмены алкоголя и оценка регионарной специфики изменения экспрессии компонентов пути Hh в отделах головного мозга. Работа проведена на крысах-самцах Wistar с использованием модели прерывистого доступа к 20%-ному раствору этилового спирта в условиях свободного выбора. Пурмормамин, активатор каскада Hh, проявляющий свойства агониста рецептора Smoothened, вводили системно в дозе 5 мг/кг перед 16–20 сеансами предъявления алкоголя. Пурмормамин не оказывал влияния на уровень предпочтения раствора этанола воде, но в группе, имевшей доступ к алкоголю и получавшей пурмормамин, отмечено изменение ТПП после отмены алкоголя. Потребление алкоголя оказывало влияние на содержание мРНК Sonic hedgehog (Shh) и Patched только в амигдале. В группе, имевшей доступ к этанолу и получавшей пурмормамин, уровень мРНК Shh в амигдале отрицательно коррелировал с временем нахождения в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта при тестировании ТПП. Таким образом, впервые продемонстрировано, что изменение активности каскада Hh введением пурмормамина не влияет на предпочтение алкоголя в условиях свободного выбора, но Hh, возможно, участвует в формировании тревожности после отмены алкоголя за счет специфических изменений функционирования компонентов каскада в амигдале.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** пурмормамин, алкоголь, свободный выбор, тревожно-подобное поведение, крысы.

DOI: 10.31857/S0320972524110087 EDN: IKNTUB

### ВВЕДЕНИЕ

Секретируемые лиганды Hedgehog (Hh) играют ключевую роль в эмбриогенезе, функционировании стволовых клеток, а также принимают

участие в поддержании гомеостаза тканей за счет регенерации в ответ на повреждение [1]. У млекопитающих известны три белка семейства: Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh) и Indian hedgehog (Ihh), при этом наиболее изучены функ-

Принятые сокращения: ТПП – тревожно-подобное поведение; Gli – транскрипционный фактор; Hh – секреторный белок Hedgehog; Ptch – трансмембранный белок Patched; Shh – белок Sonic hedgehog; Smo – рецептор Smoothened, ассоциированный с G-белками.

\* Адресат для корреспонденции.

ции Shh. Сигнальный каскад Hh представляет собой многокомпонентную цепь молекулярных событий, которая зависит от ряда факторов [2]. Далее, описана упрощенная модель активации соответствующего пути. В неактивном состоянии трансмембранный белок Patched (Ptch) блокирует рецептор, ассоциированный с G-белками – Smoothened (Smo); i) при активации каскада лиганд Hh связывается с Ptch; ii) в результате чего снимается ингибирующее влияние на Smo; iii) Smo запускает внутриклеточный каскад, который в результате активирует транскрипционный фактор Gli и последующую экспрессию генов-мишней [2].

В связи с тем, что каскад Hh играет определяющую роль в пролиферации и дифференцировке клеток, нарушения в этом каскаде являются частью онкогенеза, что определяет интерес к этой системе при разработке фармакологических средств терапии злокачественных новообразований [3]. В настоящее время разработаны и одобрены к применению препараты, ингибирующие каскад Hh, которые используются при лечении некоторых видов рака. Тем не менее каскад Hh имеет важное значение для функционирования ЦНС. Помимо того, что белки Hh являются классическими морфогенами и опосредуют эмбриональное развитие ЦНС, они напрямую или опосредованно регулируют нейрогенез, рост аксонов и нейропластичность в зрелом мозге [4]. Белки Hh также участвуют в формировании реакции нервной ткани на окислительный стресс и воспаление [5]. Нарушение функционирования сигнальных каскадов, опосредованных Hh, связывают с развитием таких заболеваний нервной системы, как аутизм, депрессия, деменция, инсульт, эпилепсия, нейродегенеративные и демиелинизирующие заболевания [6]. В связи с этим поиск и создание агентов, способных оказывать влияние на данную систему, является перспективным направлением в разработке средств фармакологической коррекции заболеваний ЦНС [6].

Среди прочих соединений, которые могут оказывать влияние на путь Hh, привлекает внимание дериват пурина пурмормфамин. Проявляя свойства агониста рецептора Smo, он запускает канонический каскад Hh, сопровождающийся активацией транскрипционного фактора Gli [7]. Пурмормфамин демонстрирует эффективность при системном введении в ряде экспериментальных моделей заболеваний ЦНС. В моделях ишемии мозга на мышах пурмормфамин ослабляет повреждение ткани мозга, а также развитие сопутствующего неврологического дефицита [8] и нарушений памяти [9]. Пурмормфамин ослабляет проявления нейротоксичности пропионовой кислоты и бромистого этидия у крыс, включая нейродегенерацию,

нарушения двигательной активности и обучения в водном лабиринте Морриса, а также развитие депрессивно-подобного поведения [10, 11].

Потребление алкоголя сопровождается комплексом адаптационных процессов на клеточном и молекулярном уровнях, что может лежать в основе перехода от контролируемого процесса к злоупотреблению и развитию зависимости, которая характеризуется абstinентными нарушениями [12]. Мезокортиколимбические структуры головного мозга, прежде всего фронтальная кора, амигдала, гиппокамп и стриатум, являются основными анатомическими субстратами, регулирующими различные аспекты воздействия алкоголя и формирования зависимости [13, 14]. Нейропластические процессы сопровождают чрезмерное потребление алкоголя, а также формирование зависимости [15, 16], и исследование молекулярных механизмов данного процесса остается одним из приоритетных направлений нейронауки.

Хорошо известно, что каскад Hh вовлечен в нарушения развития элементов костной ткани и ЦНС при пренатальном воздействии алкоголя, являясь одним из молекулярных звеньев, лежащих в основе фетального алкогольного синдрома [17, 18]. Тем не менее до сих пор роль Hh в регуляции потребления алкоголя и сопутствующих нарушений поведения в зрелом возрасте остается неизвестной, несмотря на актуальность и перспективность подобных исследований. Имеются косвенные указания на то, что каскад Hh может являться частью механизма, регулирующего потребление алкоголя и сопутствующие изменения функционирования ЦНС. В частности, было продемонстрировано, что экспрессия Ptch в гиппокампе крыс при ранней абстиненции зависит от паттерна потребления алкоголя в модели прерывистого доступа к 20%-ному раствору этилового спирта в режиме свободного выбора [19]. В данной модели крысы демонстрируют способность повышать уровень потребляемого алкоголя в достаточно высоких количествах (до 10 г/кг в сутки), что может соответствовать клинической картине при чрезмерном употреблении алкоголя [20]. Примечательно, что прерывистый доступ позволяет достичь потребления крысами большего количества алкоголя по сравнению с протоколами, использующими непрерывный доступ к раствору этанола [20]. При этом в период отмены до 72 ч, но не на более поздних сроках, могут отмечаться нарушения памяти, развитие тревожности и депрессивно-подобных симптомов, которые сопровождаются изменениями в ЦНС на молекулярном уровне [20]. На этой же модели потребления алкоголя было выявлено значительное повышение уровня Shh в гиппокампе и стриатуме крыс при ранней абстиненции, получавших миметик

нейротрофического фактора мозга 7,8-дигидрокси-флавон и имевших доступ к алкоголю, по сравнению с животными, имевшими только доступ к алкоголю [21].

Как указано выше, Hh принимает участие в реализации различных типов поведения. Применительно к потреблению алкоголя и сопутствующих отклонений важно, что активация каскада Hh в экспериментальных моделях способна ослаблять проявления обсессивно-компульсивного расстройства [22], а также оказывает анксиолитическое действие [23, 24]. Абстиненция после хронического потребления алкоголя среди прочего может проявляться развитием тревожно-подобных расстройств [25, 26], однако связь каскада Hh и этого типа поведения в контексте отмены алкоголя ранее не исследовалась.

На основании данных литературы и собственных исследований мы предположили, что активация сигнального каскада Hh может модифицировать потребление алкоголя и/или поведение в раннем абстинентном периоде. Таким образом, основной целью работы явилось исследование роли пурмормамина в потреблении алкоголя в модели прерывистого доступа к 20%-ному раствору этилового спирта в режиме свободного выбора и развитии тревожно-подобного поведения (ТПП) после отмены алкоголя у крыс. Поскольку повышение экспрессии элементов сигнального пути Hh считается молекулярным маркером активации каскада во многих типах клеток [3], в рамках поставленной цели мы оценивали регионар-

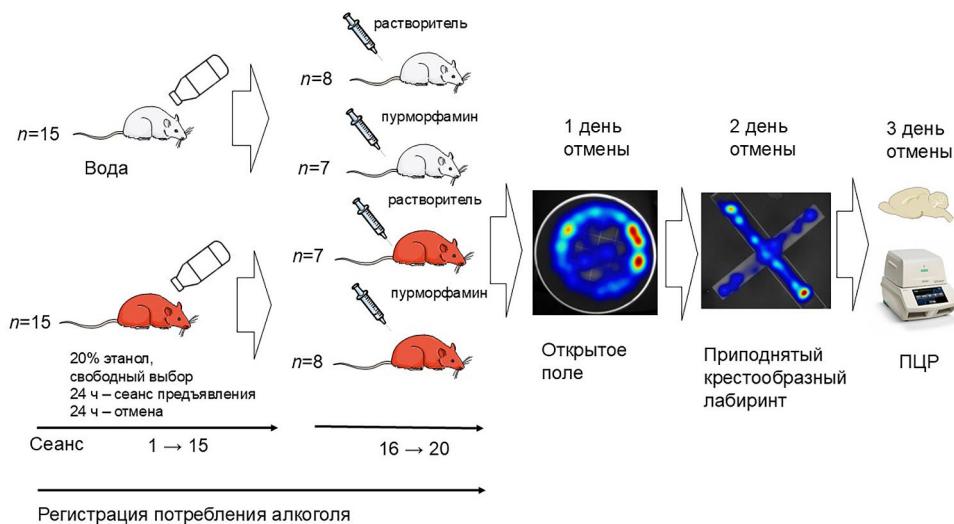
ную специфичность изменения уровня мРНК Shh, Ptch, Smo и Gli в ключевых мезокортиколимбических отделах головного мозга крыс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Работа была проведена с использованием крыс-самцов Wistar, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская обл., Россия). Перед началом эксперимента средняя масса тела животных составляла  $288 \pm 4$  г (возраст – 12 недель). Адаптационный период от момента поступления в виварий до введения в эксперимент составлял не менее 7 дней. Крысы содержали в индивидуальных клетках в условиях вивария при искусственном 12-часовом цикле освещения и постоянной температуре ( $21\text{--}23$  °C) со свободным доступом к воде и гранулированному корму.

**Дизайн эксперимента.** Схема эксперимента и количество животных в группах представлены на рис. 1.

**Прерывистый доступ к 20%-ному раствору этилового спирта.** Модель прерывистого доступа к 20%-ному раствору этилового спирта в условиях свободного выбора была реализована согласно протоколу, предложенному Simms et al. [27] в 2008 г. В опытной группе 20%-ный раствор этилового спирта и воду предъявляли крысам одновременно в двух сосудах на период 24 ч. Крысы



**Рис. 1.** Схема эксперимента. В работе использовали модель прерывистого доступа к 20%-ному раствору этилового спирта в условиях свободного выбора, согласно которой раствор спирта предъявляли совместно с водой на период 24 ч с последующей заменой спирта водой на 24 ч. Активатор каскада Hh, проявляющий свойства агониста рецептора Smo, пурмормамин вводили системно в дозе 5 мг/кг перед 16–20 сеансами предъявления алкоголя. Потребление алкоголя регистрировали в течение 20 сеансов предъявления, затем алкоголь отменяли. Тревожно-подобное поведение оценивали в открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте через сутки и двое суток после отмены алкоголя соответственно. На третий день после отмены алкоголя оценивали уровень мРНК элементов сигнального каскада Shh, Ptch, Smo и Gli во фронтальной коре, амигдале, гиппокампе и стриатуме

могли свободно выбирать жидкость для питья и самостоятельно определять количество выпитого. Экспозицию осуществляли в течение 20 сеансов, при этом чередуя положение сосудов в клетке. Перерывы между сеансами составляли 24 ч, в течение которых крысам предъявляли два сосуда с питьевой водой. Контрольная группа имела постоянный доступ к двум емкостям с водой. Сеанс предъявления раствора этанола начинался в темную фазу искусственного освещения. Сосуды и животных взвешивали каждый раз перед и после сеанса предъявления. Уровень предпочтения спирта воде рассчитывали по отношению объема потребленного раствора спирта за сеанс (сутки) к общему объему потребленной жидкости и выражали в процентах.

**Введение пурмормамина.** Пурмормамин (ab120933; «Abcam», США) в виде суспензии, содержащей 10% диметилсульфоксида, 40% ПЭГ-400 и 50% изотонического раствора хлорида натрия, вводили внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг (3 мл/кг) за 1 ч перед предъявлением раствора этанола (с 16 по 20 сеанс). Ранее было продемонстрировано, что пурмормамин при системном введении в дозе 5 мг/кг оказывает активность в отношении различных типов поведения у крыс [10, 11, 22]. Растворитель в объеме 3 мл/кг вводили животным, не получавшим пурмормамин. Накануне первого введения пурмормамина животные, которым предъявлялся этанол, были рандомизированы на основании предпочтения этанола воде за последние 5 сеансов. Были сформированы четыре экспериментальные группы: 1) группа «Контроль», которая имела постоянный доступ к двум емкостям с водой; 2) группа «Контроль + пурмормамин», представляющая собой контрольную группу, получавшую инъекции пурмормамина; 3) группа «Этанол», которой предоставлялся выбор 20%-ного раствора алкоголя, согласно описанной выше модели; и 4) группа «Этанол + пурмормамин», которой вводили пурмормамин перед предъявлением раствора этанола.

**Поведение в открытом поле.** Двигательную активность и тревожно-подобные нарушения поведения оценивали в открытом поле. Тестирование животных проводили в круглой арене белого цвета «Открытое поле для крыс» (TS0501-R; ООО «НПК Открытая Наука», Россия) диаметром 97 см и высотой стенок 42 см. Аrena была поделена на три равных концентрических зоны (центр, середина и периферия). Освещенность арены составляла 500 люкс. Крыс помещали в центральную зону и позволяли исследовать арену в течение 5 мин. После каждого тестирования арену очищали 20%-ным раствором этилового спирта. Поведение животных регистрировали цифровой монохромной видеокамерой DMK 23GV024 GigE.

(«The Imaging Source Europe GmbH», Германия) и анализировали с помощью программного обеспечения Ethovision XT11 («Noldus», Нидерланды). Оценивали пройденную дистанцию, скорость передвижения, время нахождения и число заходов в центр арены.

**Поведение в приподнятом крестообразном лабиринте.** Для оценки тревожно-подобных нарушений поведения использовали тест «Приподнятый крестообразный лабиринт». Установка «Приподнятый крестообразный лабиринт» для крыс (TS0502-R3; ООО «НПК Открытая Наука», Россия) состояла из 4-х рукавов (50 × 14 см), крестообразно расходящихся от центральной площадки (14 × 14 см): двух открытых, имеющих бортик по периметру высотой 1 см, и перпендикулярно к ним расположенных двух закрытых рукавов, со стенками высотой 30 см по периметру и открытым верхом. Лабиринт был поднят на высоту 50 см от пола и установлен таким образом, что его открытые рукава освещались так же, как и вся экспериментальная комната, в то время как закрытые рукава были затемнены. Освещенность установки составляла 500 люкс. Животное помещали на центральную площадку носом к открытому рукаву, и на протяжении 5 мин его поведение регистрировали цифровой монохромной видеокамерой DMK 23GV024 GigE. После каждого тестирования установку очищали 20%-ным раствором этилового спирта. Поведение животных анализировали с помощью программного обеспечения Ethovision XT11. Оценивали пройденную дистанцию, скорость передвижения, число заходов и время, проведенное в рукавах лабиринта, а также число свешиваний и вытягиваний.

**ПЦР.** Животных декапитировали, вынимали головной мозг, промывали его в ледяном изотоническом растворе хлорида натрия и на льду выделяли области головного мозга, соответствующие фронтальной коре, амигдале, гиппокампу и стриатуму. До проведения исследования образцы тканей хранились при -80 °C. Суммарную РНК из образцов экстрагировали с использованием реагента ExtractRNA (#BC032; «Евроген», Россия). Для удаления примесей геномной ДНК образцы РНК обрабатывали 2,5 Ед. DNase I (#M0303; «NEB», США). Обратную транскрипцию проводили с помощью 100 Ед. обратной транскриптазы Protoscript II (#M0368; «NEB») в присутствии 0,5 мкг суммарной РНК, 1 мкМ Олиго(dT)15, а также 1 мкМ случайных декануклеотидов (#SB001 и #SB002 соответственно; «Евроген») в качестве праймеров. ПЦР проводили с использованием термоциклира CFX96 («Bio-Rad», США) в двух параллельных образцах в присутствии 2 пмоль синтетических олигонуклеотидов в качестве праймеров с помощью готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (#PK147S; «Евроген»).

Последовательности праймеров, использованных для амплификации Shh [28], Ptch и Smo [29], Gli [30], а также grpS18 [31], были описаны ранее. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью сравнительного анализа [32].

**Статистический анализ.** Статистическую обработку и анализ результатов проводили при помощи пакета программ STATISTICA 8.0 («StatSoft Inc.», США) и Prism 8.0 («GraphPad Software Inc.», США). Критерий Шапиро–Уилка использовали для тестирования соответствия распределения значений переменных в исследованных выборках нормальному. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего либо в виде медианы и межквартильного интервала. При расчете различий уровня предпочтения спирта воде при первом предъявлении от каждого последующего использовали модель со смешанными эффектами (модель ограниченного максимального правдоподобия) и критерий Даннетта для множественного сравнения. При расчете значимости различий между зависимыми выборками использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с повторными измерениями и тест Тьюки для множественного сравнения средних. При сравнении нескольких независимых выборок использовали двухфакторный ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения средних или ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса и последующий *post hoc* анализ множественных сравнений с помощью теста Данна. Корреляционный анализ проводили, рассчитывая коэффициент корреляции Спирмана. Различия считались достоверными при значениях  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Предпочтение раствора этанола воде.** Использование модели со смешанными эффектами показало, что уровень предпочтения алкоголя воде значительно различается между сеансами ( $F = 2,453$ ;  $p = 0,034$ ). При этом, согласно критерию Даннетта, животные демонстрировали повышение уровня предпочтения спирта воде, который после сеансов 7–9 и 12–13 был выше по сравнению с данным показателем после первого сеанса (рис. 2).

Далее, исследовали эффект введения пурмормамина на предпочтение алкоголя воде (рис. 3). Согласно ANOVA с повторными измерениями, сеанс предъявления этанола оказывал значимый эффект на уровень предпочтения алкоголя воде ( $F_{(5,60)} = 5,269$ ;  $p < 0,001$ ). При этом эффект введения пурмормамина отсутствовал ( $F_{(1,12)} = 0,110$ ;  $p = 0,745$ ). Взаимодействие эффектов сеанса предъявления и введения пурмормамина также не оказывало значимое влияние на предпочтение этанола воде ( $F_{(5,60)} = 0,237$ ;  $p = 0,945$ ).

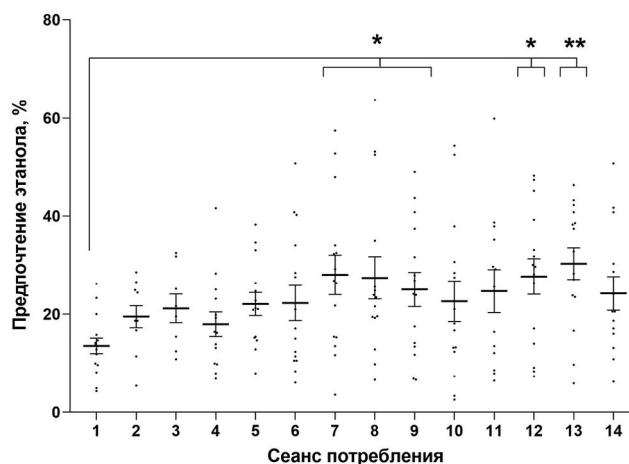


Рис. 2. Динамика предпочтения этанола воде в модели прерывистого доступа к 20%-ному раствору этанола в условиях свободного выбора. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от уровня предпочтения спирта воде после первого сеанса предъявления спирта (модель со смешанными эффектами и критерий Даннетта для множественного сравнения): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$

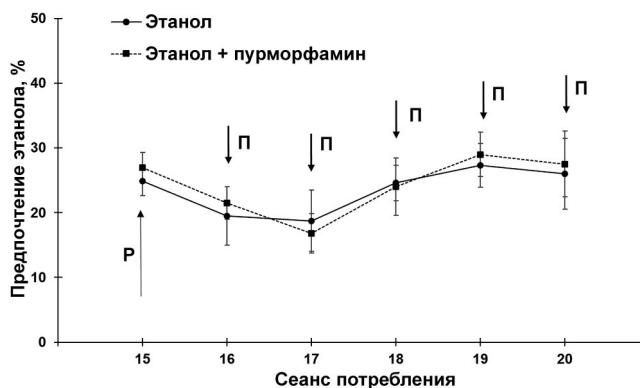
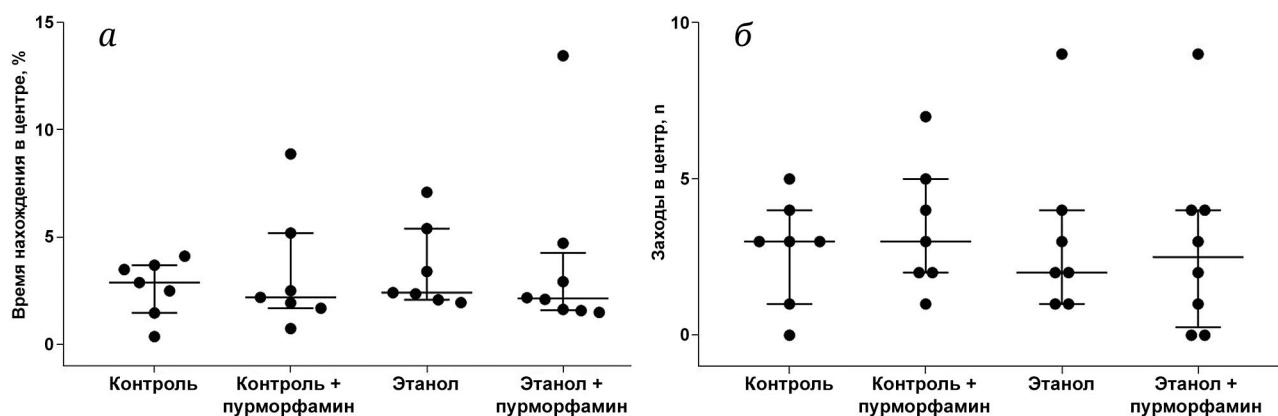


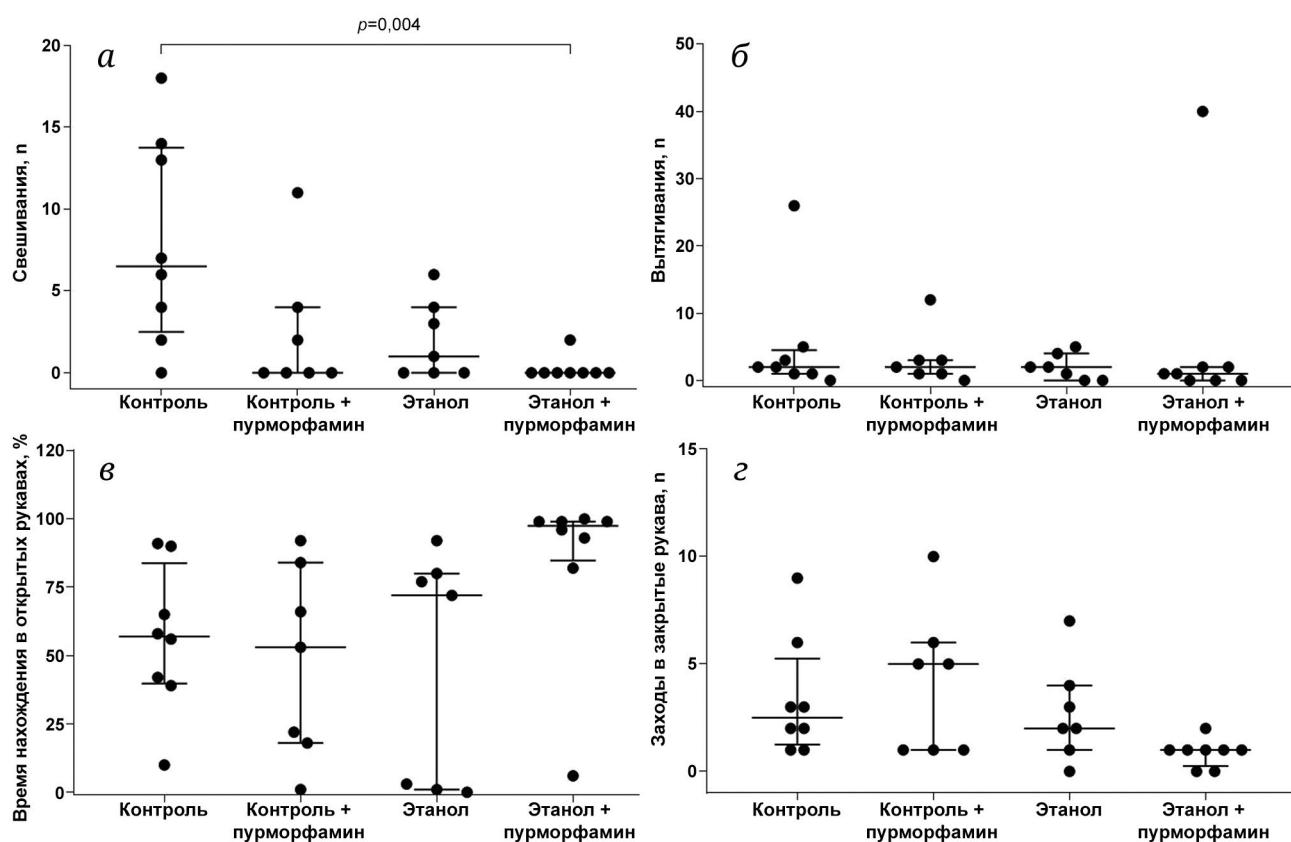
Рис. 3. Влияние пурмормамина на предпочтение раствора этанола воде в модели прерывистого доступа в условиях свободного выбора. Р – рандомизация по уровню предпочтения за последние 5 сеансов перед началом серии введений пурмормамина. П – внутрьбрюшинное введение пурмормамина в дозе 5 мг/кг за один час перед 16–20 сеансами предъявления этанола. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего

зывало значимое влияние на предпочтение этанола воде ( $F_{(5,60)} = 0,237$ ;  $p = 0,945$ ).

**Поведение в открытом поле.** Через сутки после отмены алкоголя оценивали показатели ТПП в тесте «Открытое поле» (рис. 4). Ни время нахождения в центре арены (рис. 4, а;  $H_{(3,29)} = 0,728$ ;  $p = 0,867$ ), ни число заходов в центр (рис. 4, б;  $H_{(3,29)} = 0,605$ ;  $p = 0,895$ ) не различались между экспериментальными группами. Пройденная дистанция и скорость передвижения в открытом поле не различались между экспериментальными группами (данные не представлены).



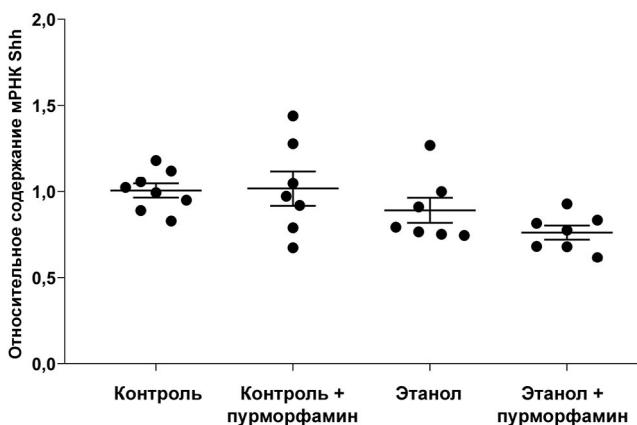
**Рис. 4.** Влияние пурмормамина на тревожно-подобное поведение в открытом поле после реализации модели прерывистого доступа к этианолу в условиях свободного выбора. Пурмормамин вводили внутрибрюшно в дозе 5 мг/кг за один час перед 16–20 сеансами предъявления этианола. Тест «Открытое поле» проводили через сутки после отмены алкоголя. *а* – Время нахождения в центральной зоне арены; *б* – число заходов в центральную зону арены. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала



**Рис. 5.** Влияние пурмормамина на поведение в приподнятом крестообразном лабиринте после реализации модели прерывистого доступа к этианолу в условиях свободного выбора. Пурмормамин вводили внутрибрюшно в дозе 5 мг/кг за один час перед 16–20 сеансами предъявления этианола. Тест проводили через двое суток после отмены алкоголя. Ранговый критерий Краскела–Уоллиса и последующий *post hoc* анализ множественных сравнений с помощью теста Данна. *а* – Число свешиваний; *б* – число вытягиваний; *в* – время нахождения в открытых рукавах лабиринта; *г* – число заходов в закрытые рукава лабиринта. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала

**Поведение в приподнятом крестообразном лабиринте.** Через двое суток после отмены алкоголя оценивали поведение в тесте «Приподнятым крестообразный лабиринт» (рис. 5). Согласно

ранговому критерию Краскела–Уоллиса, экспериментальные группы различались по числу свешиваний (рис. 5, *а*;  $H_{(3,30)} = 11,800$ ;  $p = 0,008$ ), времени нахождения в открытых рукавах (рис. 5, *в*;



**Рис. 6.** Влияние пурмормамина на относительное содержание мРНК Shh в амигдале после реализации модели прерывистого доступа к этанолу в условиях свободного выбора. Пурмормамин вводили внутрьбрюшинно в дозе 5 мг/кг за один час перед 16–20 сеансами предъявления этанола. Уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР через трое суток после отмены алкоголя. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибки среднего

$H_{(3,30)} = 9,440; p = 0,024$ , числу заходов в закрытые рукава (рис. 5, г;  $H_{(3,30)} = 8,121; p = 0,044$ ), но не числу заходов в открытые рукава (данные не представлены;  $H_{(3,30)} = 1,985; p = 0,576$ ) и числу вытягиваний (рис. 5, б;  $H_{(3,30)} = 1,604; p = 0,659$ ). Последующий *post hoc* анализ множественных сравнений с помощью теста Данна показал, что число свешиваний в группе «Этанол + пурмормамин» было значимо ниже по сравнению с группой «Контроль» (рис. 5, а). Кроме того, в группе «Этанол + пурмормамин» наблюдалась тенденция ( $p < 0,1$ ) к увеличению времени нахождения в открытых рукавах лабиринта по сравнению с группами «Контроль + пурмормамин» ( $p = 0,084$ ) и «Этанол» ( $p = 0,053$ ; рис. 5, в), а также снижение числа заходов в закрытые рукава лабиринта по сравнению группами «Контроль» ( $p = 0,088$ ) и

«Контроль + пурмормамин» ( $p = 0,095$ ; рис. 5, г). Пройденная дистанция и скорость передвижения в приподнятом крестообразном лабиринте не различались между экспериментальными группами (данные не представлены).

**Экспрессия Shh, Ptch, Smo и Gli в структурах мозга.** Через трое суток после отмены алкоголя оценивали относительное содержание мРНК компонентов сигнального каскада Shh, Ptch, Smo и Gli во фронтальной коре, амигдале, гиппокампе и стриатуме (табл. 1). Согласно ANOVA, фактор «этанол» оказывал значимый эффект на относительный уровень Shh в амигдале, при этом эффект фактора «пурмормамин» и взаимодействие «этанол»  $\times$  «пурмормамин» не достигали уровня значимости (табл. 1). Кроме того, фактор «этанол», но не фактор «пурмормамин» и взаимодействие «этанол»  $\times$  «пурмормамин», также оказывал значимый эффект на относительный уровень Ptch в амигдале (табл. 1). Последующее множественное сравнение средних не выявило значимых различий между группами. Тем не менее необходимо отметить, что в группе «Этанол + пурмормамин» отмечалась тенденция ( $p < 0,1$ ) снижения уровня мРНК Shh в амигдале по сравнению с группами «Контроль» ( $p = 0,068$ ) и «Контроль + пурмормамин» ( $p = 0,062$ ) (рис. 6). Вместе с тем в группе «Этанол + пурмормамин» уровень мРНК Shh в амигдале образовывал значимые обратные корреляционные отношения с временем нахождения в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта ( $r = -0,786; p = 0,036$ ). Тогда как корреляция этих показателей в группах «Контроль» ( $r = 0,167; p = 0,693$ ), «Контроль + пурмормамин» ( $r = -0,071; p = 0,879$ ) и «Этанол» ( $r = 0,357; p = 0,432$ ) не достигала уровня значимости. Значимых изменений уровня Ptch, Smo и Gli в амигдале, а также всех исследованных мРНК во фронтальной коре, гиппокампе и стриатуме обнаружено не было (табл. 1).

**Таблица 1.** Относительное содержание мРНК компонентов сигнального каскада Shh в отделах головного мозга после реализации модели прерывистого доступа к этанолу в условиях свободного выбора

Отдел мозга	мРНК	Контроль, $n = 8$	Контроль + пурмормамин, $n = 7$	Этанол, $n = 7$	Этанол + пурмормамин, $n = 8$	ANOVA: F; p		
						Этанол	Пурмормамин	Этанол $\times$ пурмормамин
Фронтальная кора	Shh	$1,03 \pm 0,11$	$1,17 \pm 0,09$	$1,21 \pm 0,14$	$1,03 \pm 0,16$	0,02; 0,89	0,02; 0,89	1,46; 0,24
	Ptch	$1,03 \pm 0,10$	$1,13 \pm 0,08$	$1,08 \pm 0,10$	$1,00 \pm 0,16$	0,11; 0,74	0,01; 0,91	0,69; 0,42
	Smo	$1,05 \pm 0,13$	$1,10 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,12$	$1,03 \pm 0,10$	0,34; 0,57	0,17; 0,68	0,01; 0,92
	Gli	$1,09 \pm 0,18$	$1,20 \pm 0,22$	$1,54 \pm 0,36$	$1,06 \pm 0,26$	0,32; 0,58	0,48; 0,49	1,24; 0,28

Таблица 1 (окончание)

Отдел мозга	МРНК	Контроль, n = 8	Контроль + пурмормфамин, n = 7	Этанол, n = 7	Этанол + пурмормфамин, n = 8	ANOVA: F; p		
						Этанол	Пурмормфамин	Этанол × пурмормфамин
Амигдала	Shh	1,01 ± 0,04	1,02 ± 0,10	0,89 ± 0,07	0,76 ± 0,04	<b>7,58; 0,01</b>	0,76; 0,39	1,10; 0,30
	Ptch	1,02 ± 0,07	1,05 ± 0,06	0,93 ± 0,07	0,81 ± 0,11	<b>4,28; 0,05</b>	0,30; 0,59	0,90; 0,35
	Smo	1,02 ± 0,07	1,10 ± 0,07	0,96 ± 0,06	0,94 ± 0,12	1,55; 0,22	0,10; 0,75	0,33; 0,57
	Gli	1,22 ± 0,29	1,21 ± 0,14	1,04 ± 0,11	1,05 ± 0,27	0,60; 0,45	0,00; 0,99	0,00; 0,98
Гиппокамп	Shh	1,02 ± 0,08	0,86 ± 0,13	0,98 ± 0,07	0,85 ± 0,06	0,09; 0,77	2,82; 0,11	0,05; 0,83
	Ptch	1,03 ± 0,09	0,91 ± 0,13	0,97 ± 0,10	0,73 ± 0,08	1,29; 0,27	3,21; 0,08	0,34; 0,56
	Smo	1,03 ± 0,09	0,99 ± 0,17	1,10 ± 0,13	0,82 ± 0,09	0,18; 0,68	1,82; 0,19	1,07; 0,31
	Gli	1,05 ± 0,11	0,84 ± 0,23	0,92 ± 0,07	0,75 ± 0,07	0,69; 0,41	2,02; 0,17	0,02; 0,88
Стриатум	Shh	1,09 ± 0,16	1,43 ± 0,17	1,09 ± 0,17	1,28 ± 0,14	0,20; 0,66	2,76; 0,11	0,22; 0,64
	Ptch	1,05 ± 0,10	1,07 ± 0,09	1,12 ± 0,18	1,09 ± 0,07	0,17; 0,68	0,00; 0,98	0,04; 0,85
	Smo	1,04 ± 0,10	0,95 ± 0,10	1,17 ± 0,19	1,03 ± 0,11	0,70; 0,41	0,78; 0,39	0,05; 0,83
	Gli	1,17 ± 0,25	1,08 ± 0,11	1,13 ± 0,27	1,03 ± 0,12	0,05; 0,83	0,21; 0,65	0,00; 0,99

Примечание: Полужирный шрифт – статистически значимые различия (двуфакторный ANOVA).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Каскад Hh и потребление алкоголя.** Вовлеченность Hh в механизмы потребления алкоголя и развития нарушений, сопутствующих хронической интоксикации в зрелом возрасте, не изучена. В настоящей работе впервые была проведена оценка влияния пурмормамина на потребление алкоголя половозрелыми крысами в условиях свободного выбора. Согласно полученным результатам, пурмормамин не оказывал значимого эффекта на предпочтение этанола воде. Тем не менее в этом контексте необходимо упомянуть данные литературы относительно эффективности пурмормамина в модели обсессивно-компульсивного расстройства, которое может быть связано с формированием патологических форм потребления алкоголя. В частности, было продемонстрировано, что поведение, подобное обсессивно-компульсивному, вызванное введением агониста серотониновых рецепторов 1A-подтипа в ядра шва, ослаблялось при системном введении пурмормамина [22]. Помимо прочего, в этой модели наблюдали снижение уровня Shh в цереброспinalной жидкости, плазме крови и ткани мозга,

при этом пурмормамин, сам по себе не влияя на содержание Shh, нормализовал его уровень [22].

**Каскад Hh и тревожно-подобное поведение.** Тревожность – это типичное аффективное расстройство на фоне синдрома отмены алкоголя [25, 26]. В экспериментальных моделях потребление алкоголя в условиях свободного выбора, в том числе и на модели прерывистого доступа, сопровождается изменением ТПП. Показано, что после отмены прерывистого доступа к 20%-ному раствору этанола наблюдается выраженное ТПП как в открытом поле, так и в приподнятом крестообразном лабиринте у мышей [33] и крыс [34]. Однако некоторые группы исследователей не обнаружили влияния потребления алкоголя в условиях свободного выбора на ТПП. Так, представление доступа в условиях свободного выбора к 10%-ному раствору алкоголя на 4 ч в темную фазу суток в течение 12 дней не оказывает влияния на число заходов в центр открытого поля спустя 8 дней после отмены [35]. Не было зарегистрировано изменений поведения в приподнятом крестообразном лабиринте ни спустя сутки [36], ни спустя 1 неделю [37] после отмены процедуры прерывистого доступа к 20%-ному раствору этанола.

Аналогично, непрерывный доступ к алкоголю в условиях свободного выбора не оказывал влияния на поведение в приподнятом крестообразном лабиринте [38]. Можно заключить, что к настоящему моменту есть достаточно противоречивые указания на то, что добровольное потребление алкоголя грызунами может модифицировать поведение в тестах, позволяющих оценивать уровень тревожности. В настоящей работе мы также не обнаружили изменений поведения после отмены алкоголя ни в открытом поле, ни в приподнятом крестообразном лабиринте.

Известно, что каскад Hh может составлять молекулярный механизм реализации ТПП. Прямое участие семейства белков Hh в регуляции поведения было продемонстрировано на мышах после генетического нокаута Dhh [39]. Подробно характеризуя разные формы поведения, включая двигательную активность, обучение и формирование памяти, а также тревожно- и депрессивно-подобные формы поведения, у самцов этой линии авторы обнаружили усиление депрессивно-подобного поведения в teste вынужденного плавания и ТПП в питьевом конфликтном teste Фогеля по сравнению с животными дикого типа [39]. В модели фетального алкогольного синдрома с использованием *Danio rerio* показано, что при экспозиции этианола в раннем эмбриогенезе повышенный уровень экспрессии Shh противодействует дисморфогенезу ЦНС и развитию ТПП на поздних сроках развития [40]. Условный нокаут Smo в нейральных стволовых клетках нарушает нейрогенез в зрелом гиппокампе, что сопровождается усилением тревожно- и депрессивно-подобного поведения, не влияя на двигательные способности или обучение [23].

В настоящей работе мы впервые продемонстрировали, что изменение поведения в приподнятом крестообразном лабиринте возможно, как следствие взаимодействия потребления алкоголя в условиях свободного выбора и системного введения пурмормамина, активирующего каскад Shh. Таким образом, полученные результаты в целом соответствуют концепции о том, что стимуляция каскада Hh проявляет «анксиолитические» свойства при условии доступа к алкоголю, о чем свидетельствует наличие статистической тенденции к увеличению времени, проводимого в открытых рукавах, и уменьшению заходов в закрытые рукава.

**Биохимические маркеры активации каскада Hh в мозге и тревожно-подобное поведение при отмене алкоголя.** В настоящей работе, согласно дисперсионному ANOVA, потребление алкоголя оказывало влияние только на содержание мРНК Shh и Ptch специфически в амигдале, т.е. было специфичным в отношении этой струк-

туры мозга, отвечающей за формирование эмоций, связанных с тревогой. Поскольку стимуляция транскрипции генов, составляющих каскад Hh (прежде всего Ptch и Gli), считается маркером активации каскада Hh во многих типах клеток [3], включая глию [41] и нейроны [42, 43], мы ожидали увидеть их увеличение в отделах головного мозга животных, получавших пурмормамин. Вопреки ожиданиям, мы не зарегистрировали увеличения, напротив, очевидна статистическая тенденция к снижению мРНК Shh в группе животных, имевших доступ к алкоголю и получавших пурмормамин.

В экспериментальных моделях экспрессия компонентов сигнального каскада Hh в отделах мозга может отражать нейропротективные свойства некоторых соединений или их активность в отношении поведения, включая ТПП. При этом прямая фармакологическая активность данных веществ не обязательно связана с каскадом Hh.

Так, в модели хронического непредсказуемого стресса у крыс флаванон наригенин сопровождало развитие депрессивно-подобного поведения в teste вынужденного плавания и когнитивных нарушений в водном лабиринте Морриса, что сопровождалось нормализацией сниженного при стрессе содержания мРНК Shh и Gli в гиппокампе [44]. Также в модели хронического непредсказуемого стресса у крыс усиление тревожности сопровождалось снижением содержания мРНК Shh и Gli в гиппокампе, тогда как никотин способен нивелировать как нарушения поведения, так и изменения экспрессии [45].

Интоксикация крыс пропионовой кислотой или бромистым этидием сопровождается снижением Shh в головном мозге, при этом системное введение пурмормамина оказывает нейропротективный эффект в этих моделях, что сопровождается нормализацией уровня Shh [10, 11]. Хроническое системное введение агониста Smo SAG (Smoothened agonist), который является производным бензотиофена, ослабляло развившееся в результате содержания мышей на диете с высокой долей жиров в рационе ТПП в открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте [24]. При этом сам SAG, не влияя на Shh в неокортексе, нормализовал его сниженное содержание при этой диете [24]. Кроме того, системное введение пурмормамина мышам после окклюзии средней мозговой артерии снижает объем инфаркта и ослабляет развитие неврологического дефицита, что сопровождается снижением апоптотической гибели нейронов [8]. Интересно, что окклюзия средней мозговой артерии сопровождается повышением экспрессии мРНК компонентов каскада Shh, Ptch, Smo и Gli в неокортексе, однако пурмормамин, проявляя физиологическую активность, тем не

менее не оказывал влияния на их экспрессию [8]. Таким образом, активность пурмормамина не обязательно отражается в изменении экспрессии элементов сигнального каскада Hh.

Согласно полученным результатам, поведение в крестообразном лабиринте так же, как и содержание Shh в амигдале, демонстрировали тенденцию к разнонаправленному изменению в группе «Этанол + пурмормамин». Эта закономерность подтверждается наличием обратной корреляции времени, проведенного в открытых рукавах лабиринта, и относительным содержанием мРНК Shh в амигдале только в этой группе животных. Амигдалоидный комплекс играет ключевую роль в формировании реакции на стрессовое воздействие и реализации тревожности [46–48]. Активность этой области мозга динамически изменяется в период отмены после хронической прерывистой интоксикации парами алкоголя и может быть связана с проявлениями отмены [49, 50]. Данных относительно функций Hh в амигдале достаточно мало, за исключением нескольких работ, в которых показана вовлеченность Hh в механизмы памяти. Так, выработка условной реакции страха при сочетании звукового сигнала и удара электрическим током сопровождается увеличением числа пролиферирующих клеток и уровня Shh, Ptch и Gli в амигдале у мышей [51]. При этом подавление Shh в митотических нейронах базолатеральной амигдалы посредством инъекции ретровируса с интерферирующими РНК ослабляет выработку условной реакции страха и нейрогенез [51]. Кроме того, Shh за счет регуляции нейрогенеза в амигдале регулирует затухание условной реакции страха со временем, поскольку оверэкспрессия Shh в амигдале стимулирует нейрогенез и ослабление реакции страха, тогда как интерферирующие РНК оказывают противоположный эффект [52].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые исследована активность пурмормамина в отношении потребления раствора этилового спирта крысами в условиях свободного выбора, а также поведения в открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте после отмены алкоголя. При том что пурмормамин не модифицировал предпочтение

алкоголя воде, отмечалось изменение поведения в приподнятом крестообразном лабиринте после отмены алкоголя. Согласно полученным результатам, поведение в крестообразном лабиринте, так же как и содержание мРНК Shh, специфически в амигдале демонстрировали тенденцию к разнонаправленному изменению и образовывали обратную корреляцию только при условии сочетания доступа к алкоголю и введения пурмормамина. Полученные данные могут свидетельствовать об участии сигнального пути Shh в развитии амигдалярных механизмов эмоциональных нарушений, связанных с абstinенцией, однако для выяснения конкретных деталей этого участия должны быть проведены дальнейшие исследования.

**Вклад авторов.** Д.И. Перегуд – концепция, проведение экспериментов, анализ результатов, написание текста статьи, руководство проектом; Н.И. Широбокова – проведение экспериментов; А.А. Квичанский – проведение экспериментов; М.Ю. Степаничев – концепция, редактирование текста статьи; Н.В. Гуляева – концепция, окончательное редактирование статьи, общее руководство проектом.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации «Нейрофизиологические и биохимические механизмы патологии нервной системы, нейродегенерация». Регистрационный номер: 1021062411628-8-3.1.4.

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

**Соблюдение этических норм.** Все манипуляции с животными проводили в соответствии с международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. 2010), требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 с приложением от 15.06.2006), принципами надлежащей лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, ГОСТ Р 53434-2009), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утвержденными биоэтической комиссией Института.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Briscoe, J., and Thérond, P. P. (2013) The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **14**, 416-429, <https://doi.org/10.1038/nrm3598>.
2. Zhang, Y., and Beachy, P. A. (2023) Cellular and molecular mechanisms of Hedgehog signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **24**, 668-687, <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00591-1>.

3. Jing, J., Wu, Z., Wang, J., Luo, G., Lin, H., Fan, Y., and Zhou, C. (2023) Hedgehog signaling in tissue homeostasis, cancers, and targeted therapies, *Signal Transduct. Target Ther.*, **8**, 315, <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01559-5>.
4. Chen, S. D., Yang, J. L., Hwang, W. C., and Yang, D. I. (2018) Emerging roles of sonic Hedgehog in adult neurological diseases: neurogenesis and beyond, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2423, <https://doi.org/10.3390/ijms19082423>.
5. Yao, P. J., Petralia, R. S., and Mattson, M. P. (2016) Sonic Hedgehog signaling and hippocampal neuroplasticity, *Trends Neurosci.*, **39**, 840-850, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.10.001>.
6. Patel, S. S., Tomar, S., Sharma, D., Mahindroo, N., and Udayabhanu, M. (2017) Targeting sonic hedgehog signaling in neurological disorders, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **74**, 76-97, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.008>.
7. Sinha, S., and Chen, J. K. (2006) Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened, *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 29-30, <https://doi.org/10.1038/nchembio753>.
8. Chechneva, O. V., Mayrhofer, F., Daugherty, D. J., Krishnamurty, R. G., Bannerman, P., Pleasure, D. E., and Deng, W. (2014) A Smoothened receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury, *Cell Death Dis.*, **5**, e1481, <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.446>.
9. Liu, D., Bai, X., Ma, W., Xin, D., Chu, X., Yuan, H., Qiu, J., Ke, H., Yin, S., Chen, W., and Wang, Z. (2020) Purmorphamine attenuates neuro-inflammation and synaptic impairments after hypoxic-ischemic injury in neonatal mice via shh signaling, *Front. Pharmacol.*, **11**, 204, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00204>.
10. Rahi, S., Gupta, R., Sharma, A., and Mehan, S. (2021) Smo-Shh signaling activator purmorphamine ameliorates neurobehavioral, molecular, and morphological alterations in an intracerebroventricular propionic acid-induced experimental model of autism, *Hum. Exp. Toxicol.*, **40**, 1880-1898, <https://doi.org/10.1177/09603271211013456>.
11. Prajapati, A., Mehan, S., Khan, Z., Chhabra, S., and Das Gupta, G. (2024) Purmorphamine, a Smo-Shh/Gli activator, promotes sonic hedgehog-mediated neurogenesis and restores behavioural and neurochemical deficits in experimental model of multiple sclerosis, *Neurochem. Res.*, **49**, 1556-1576, <https://doi.org/10.1007/s11064-023-04082-9>.
12. Egervari, G., Siciliano, C. A., Whiteley, E. L., and Ron, D. (2021) Alcohol and the brain: from genes to circuits, *Trends Neurosci.*, **44**, 1004-1015, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.09.006>.
13. Gilpin, N. W., and Koob, G. F. (2008) Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms, *Alcohol Res. Health*, **31**, 185-195.
14. Abrahao, K. P., Salinas, A. G., and Lovinger, D. M. (2017) Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits, *Neuron*, **96**, 1223-1238, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.032>.
15. Fein, G., and Cardenas, V. A. (2015) Neuroplasticity in human alcoholism: studies of extended abstinence with potential treatment implications, *Alcohol Res.*, **37**, 125-141.
16. Loheswaran, G., Barr, M. S., Rajji, T. K., Blumberger, D. M., Le Foll, B., and Daskalakis, Z. J. (2016) Alcohol intoxication by binge drinking impairs neuroplasticity, *Brain Stimul.*, **9**, 27-32, <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.08.011>.
17. Smith, S. M., Garic, A., Flentke, G. R., and Berres, M. E. (2014) Neural crest development in fetal alcohol syndrome, *Birth Defects Res C Embryo Today*, **102**, 210-220, <https://doi.org/10.1002/bdrc.21078>.
18. Ehrhart, F., Roozen, S., Verbeek, J., Koek, G., Kok, G., van Kranen, H., Evelo, C. T., and Curfs, L. M. G (2018) Review and gap analysis: molecular pathways leading to fetal alcohol spectrum disorders, *Mol. Psychiatry*, **24**, 10-17, <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0095-4>.
19. Peregud, D., Stepanichev, M., and Gulyaeva, N. (2021) Expression of the hippocampal PTCH during early abstinence is associated with drinking patterns in a rat model of voluntary alcohol intake, *Neuroreport*, **32**, 757-761, <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001646>.
20. Carnicella, S., Ron, D., and Barak, S. (2014) Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse, *Alcohol*, **48**, 243-252, <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.01.006>.
21. Peregud, D., Kvichansky, A., Shirobokova, N., Stepanichev, M., and Gulyaeva, N. (2022) 7,8-DHF enhances SHH in the hippocampus and striatum during early abstinence but has minor effects on alcohol intake in IA2BC paradigm and abstinence-related anxiety-like behavior in rats, *Neurosci. Lett.*, **781**, 136671, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136671>.
22. Gupta, R., Mehan, S., Sethi, P., Prajapati, A., Alshammari, A., Alharbi, M., Al-Mazroua, H. A., and Narula, A. S. (2022) Smo-Shh agonist purmorphamine prevents neurobehavioral and neurochemical defects in 8-OH-DPAT-induced experimental model of obsessive-compulsive disorder, *Brain Sci.*, **12**, 342, <https://doi.org/10.3390/brainsci12030342>.
23. Wang, J., Ware, K., Bedolla, A., Allgire, E., Turcato, F. C., Weed, M., Sah, R., and Luo, Y. (2022) Disruption of sonic hedgehog signaling accelerates age-related neurogenesis decline and abolishes stroke-induced neurogenesis and leads to increased anxiety behavior in stroke mice, *Transl. Stroke Res.*, **13**, 830-844, <https://doi.org/10.1007/s12975-022-00994-w>.

24. Sun, D., Deng, J., Wang, Y., Xie, J., Li, X., Li, X., Wang, X., Zhou, F., Qin, S., and Liu, X. (2023) SAG, a sonic hedgehog signaling agonist, alleviates anxiety behavior in high-fat diet-fed mice, *Brain Res. Bull.*, **195**, 25-36, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.01.014>.
25. Koob, G. F., and Volkow, N. D. (2010) Neurocircuitry of addiction, *Neuropsychopharmacology*, **35**, 217-238, <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>.
26. Ron, D., and Barak, S. (2016) Molecular mechanisms underlying alcohol-drinking behaviours, *Nat. Rev. Neurosci.*, **17**, 576-591, <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.85>.
27. Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., and Bartlett, S. E. (2008) Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **32**, 1816-1823, <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x>.
28. Desouza, L. A., Sathanoori, M., Kapoor, R., Rajadhyaksha, N., Gonzalez, L. E., Kottmann, A. H., Tole, S., and Vaidya, V. A. (2011) Thyroid hormone regulates the expression of the sonic hedgehog signaling pathway in the embryonic and adult mammalian brain, *Endocrinology*, **152**, 1989-2000, <https://doi.org/10.1210/en.2010-1396>.
29. Rajendran, R., Jha, S., Fernandes, K. A., Banerjee, S. B., Mohammad, F., Dias, B. G., and Vaidya, V. A. (2009) Monoaminergic regulation of Sonic hedgehog signaling cascade expression in the adult rat hippocampus, *Neurosci. Lett.*, **453**, 190-194, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.034>.
30. Rivell, A., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Clawson, E., Moehl, K., Mattson, M. P., and Yao, P. J. (2019) Sonic hedgehog expression in the postnatal brain, *Biol. Open*, **8**, bio040592, <https://doi.org/10.1242/bio.040592>.
31. Peregud, D. I., Panchenko, L. F., and Gulyaeva, N. V. (2015) Elevation of BDNF exon I-specific transcripts in the frontal cortex and midbrain of rat during spontaneous morphine withdrawal is accompanied by enhanced pCrb1 occupancy at the corresponding promoter, *Neurochem. Res.*, **40**, 130-138, <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1476-y>.
32. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45, <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
33. Wang, N., Liu, X., Li, X. T., Li, X. X., Ma, W., Xu, Y. M., Liu, Y., Gao, Q., Yang, T., Wang, H., Peng, Y., Zhu, X. F., and Guan, Y. Z. (2021) 7,8-Dihydroxyflavone alleviates anxiety-like behavior induced by chronic alcohol exposure in mice involving tropomyosin-related kinase B in the amygdala, *Mol. Neurobiol.*, **58**, 92-105, <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02111-0>.
34. Wang, X., Li, L., Bian, C., Bai, M., Yu, H., Gao, H., Zhao, J., Zhang, C., and Zhao, R. (2023) Alterations and correlations of gut microbiota, fecal, and serum metabolome characteristics in a rat model of alcohol use disorder, *Front. Microbiol.*, **13**, 1068825, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1068825>.
35. Briones, T. L., and Woods, J. (2013) Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis, *Neuroscience*, **254**, 324-334, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.031>.
36. George, O., Sanders, C., Freiling, J., Grigoryan, E., Vu, S., Allen, C. D., Crawford, E., Mandyam, C. D., and Koob, G. F. (2012) Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 18156-18161, <https://doi.org/10.1073/pnas.1116523109>.
37. Nelson, N. G., Suhaidi, F. A., Law, W. X., and Liang, N. C. (2018) Chronic moderate alcohol drinking alters insulin release without affecting cognitive and emotion-like behaviors in rats, *Alcohol*, **70**, 11-22, <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2017.12.001>.
38. Stragier, E., Martin, V., Davenas, E., Poilbou, C., Mongeau, R., Corradetti, R., and Lanfumey, L. (2015) Brain plasticity and cognitive functions after ethanol consumption in C57BL/6J mice, *Transl. Psychiatry*, **5**, e696, <https://doi.org/10.1038/tp.2015.183>.
39. Umehara, F., Mishima, K., Egashira, N., Ogata, A., Iwasaki, K., and Fujiwara, M. (2006) Elevated anxiety-like and depressive behavior in Desert hedgehog knockout male mice, *Behav. Brain Res.*, **174**, 167-173, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.07.022>.
40. Burton, D. F., Zhang, C., Boa-Amponsem, O., Mackinnon, S., and Cole, G. J. (2017) Long-term behavioral change as a result of acute ethanol exposure in zebrafish: Evidence for a role for sonic hedgehog but not retinoic acid signaling, *Neurotoxicol. Teratol.*, **61**, 66-73, <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.01.006>.
41. Gu, D., Wang, S., Zhang, S., Zhang, P., and Zhou, G. (2017) Directed transdifferentiation of Müller glial cells to photoreceptors using the sonic hedgehog signaling pathway agonist purmorphamine, *Mol. Med. Rep.*, **16**, 7993-8002, <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7652>.
42. Yao, P. J., Petralia, R. S., Ott, C., Wang, Y. X., Lippincott-Schwartz, J., and Mattson, M. P. (2015) Dendrosomatic Sonic Hedgehog signaling in hippocampal neurons regulates axon elongation, *J. Neurosci.*, **35**, 16126-16141, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1360-15.2015>.

43. He, W., Cui, L., Zhang, C., Zhang, X., He, J., and Xie, Y. (2016) Sonic Hedgehog promotes neurite outgrowth of primary cortical neurons through up-regulating BDNF expression, *Neurochem. Res.*, **41**, 687-695, <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1736-5>.
44. Tayyab, M., Farheen, S., Mabeena, M. M. P., Khanam, N., Mobarak Hossain, M., and Shahi, M. H. (2019) Antidepressant and neuroprotective effects of naringenin via Sonic Hedgehog-GLI1 cell signaling pathway in a rat model of chronic unpredictable mild stress, *Neuromol. Med.*, **21**, 250-261, <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08538-6>.
45. Tayyab, M., Shahi, M. H., Farheen, S., Mabeena, M. M. P., Khanam, N., and Hossain, M. M. (2019) Exploring the potential role of sonic hedgehog cell signalling pathway in antidepressant effects of nicotine in chronic unpredictable mild stress rat model, *Helijon*, **5**, e01600, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01600>.
46. Graeff, F. G., Silveira, M. C., Nogueira, R. L., Audi, E. A., and Oliveira, R. M. (1993) Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic, *Behav. Brain Res.*, **58**, 123-131, [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90097-a](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90097-a).
47. Silveira, M. C., Sandner, G., and Graeff, F. G. (1993) Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze, *Behav. Brain Res.*, **56**, 115-118, [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90028-o](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90028-o).
48. Möller, C., Wiklund, L., Sommer, W., Thorsell, A., and Heilig, M. (1997) Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions, *Brain Res.*, **760**, 94-101, [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00308-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00308-9).
49. Pleil, K. E., Lowery-Gionta, E. G., Crowley, N. A., Li, C., Marcinkiewicz, C. A., Rose, J. H., McCall, N. M., Maldonado-Devincci, A. M., Morrow, A. L., Jones, S. R., and Kash, T. L. (2015) Effects of chronic ethanol exposure on neuronal function in the prefrontal cortex and extended amygdala, *Neuropharmacology*, **99**, 735-749, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.06.017>.
50. Smith, R. J., Anderson, R. I., Haun, H. L., Mulholland, P. J., Griffen, W. C. 3rd, Lopez, M. F., and Becker, H. C. (2020) Dynamic c-Fos changes in mouse brain during acute and protracted withdrawal from chronic intermittent ethanol exposure and relapse drinking, *Addict. Biol.*, **25**, e12804, <https://doi.org/10.1111/adb.12804>.
51. Hung, H. C., Hsiao, Y. H., and Gean, P. W. (2014) Learning induces sonic hedgehog signaling in the amygdala which promotes neurogenesis and long-term memory formation, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **18**, pyu071, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu071>.
52. Hung, H. C., Hsiao, Y. H., and Gean, P. W. (2015) Sonic hedgehog signaling regulates amygdalar neurogenesis and extinction of fear memory, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **25**, 1723-1732, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.07.005>.

## PURMORPHAMINE AFFECTS ANXIETY-LIKE BEHAVIOR AND EXPRESSIONS OF Hedgehog PATHWAY COMPONENTS IN RAT BRAIN AFTER WITHDRAWAL

**D. I. Peregud<sup>1,2\*</sup>, N. I. Shirobokova<sup>2</sup>, A. A. Kvichansky<sup>2</sup>,  
M. Yu. Stepanichev<sup>2</sup>, and N. V. Gulyaeva<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> *Federal State Budgetary Institution "V. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Drug Addiction" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119034 Moscow, Russia; e-mail: peregud\_d@yahoo.com*

<sup>2</sup> *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 117485 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department, 115419 Moscow, Russia*

The Hedgehog (Hh) pathway underlies fetal alcohol syndrome during prenatal alcohol exposure. The involvement of Hh in the mechanisms of alcohol consumption in adulthood remains obscure. We aimed to investigate a role of Hh cascade in voluntary ethanol drinking, anxiety-like behavior during early abstinence and changes in expressions of Hh cascade components in brain regions. Intermittent access to 20% ethanol in a two-bottle choice procedure has been used to model voluntary alcohol drinking in Wistar male rats. Purmorphamine, an activator of the Hh cascade that exhibits Smoothened (Smo) receptor agonist properties, was administered systemically at a dose of 5 mg/kg before drinking sessions from 16 to 20. Purmorphamine had no effect on the level of

ethanol preference, but the group with access to alcohol and receiving purmorphamine showed a change in anxiety-like behavior during early withdrawal period. Alcohol consumption affected Sonic hedgehog (*Shh*) and Patched (*Ptch*) mRNA content only in the amygdala. In the group that had access to ethanol and received purmorphamine, *Shh* mRNA levels in the amygdala were negatively correlated with time spent in the open arms of the elevated plus maze in the test of anxiety-like behavior. Thus, it was demonstrated for the first time that alterations of the *Hh* cascade by purmorphamine administration does not affect voluntary alcohol drinking, but *Hh* is possibly involved in the formation of anxiety during early withdrawal through specific changes in *Hh* cascade components in the amygdala.

*Keywords:* purmorphamine, alcohol, voluntary drinking, anxiety-like behavior, rats

## ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *chrna4* И *chrna7* В МОЗГЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС, НЕ ВЛИЯЯ НА МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТИЛХОЛИНА ВО ВРЕМЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

© 2024 О.В. Ветровой\*, С.С. Потапова, В.А. Стратилов, Е.И. Тюлькова

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,  
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: vov210292@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.2024

После доработки 28.05.2024

Принята к публикации 03.06.2024

Предыдущие исследования показали, что совокупное воздействие гипоксии плода и материнских стрессорных гормонов предопределяет склонность к никотиновой зависимости во взрослом возрасте. Настоящее исследование на крысях было направлено на изучение влияния пренатальной гипоксии (ПГ) на метаболизм ацетилхолина в развивающемся мозге, а также на экспрессию генов рецепторов ацетилхолина *chrna4* и *chrna7* как в развивающемся мозге, так и в структурах головного мозга взрослых после потребления никотина. В развивающемся мозге ПГ крыс не обнаружено изменений активности холин-ацетилтрансферазы (ХАТ) и ацетилхолин-эстеразы (АХЭ), а также нарушений концентрации ацетилхолина. Однако снижение экспрессии *chrna4* было обнаружено на 15-й день беременности, тогда как повышение экспрессии *chrna7* наблюдалось на 15-й и 16-й дни эмбриогенеза. Во взрослом возрасте последствия ПГ проявлялись в снижении экспрессии *chrna4* в медиальной префронтальной коре (PFC), прилежащем ядре (NAcc) и гипоталамусе (HT), снижении экспрессии *chrna7* в PFC и гиппокампе (HPC). При этом потребление никотина у взрослых ПГ крыс не снижало уровни экспрессии *chrna4* и *chrna7* по сравнению с контрольной группой. Таким образом, ПГ предрасполагает к нарушению экспрессии генов *chrna4* и *chrna7* у взрослых крыс, не влияя на метаболизм ацетилхолина в период эмбрионального развития.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** крысы, развитие мозга, пренатальная гипоксия, метаболизм ацетилхолина, *chrna4*, *chrna7*.

DOI: 10.31857/S0320972524110091 EDN: IKNPIS

### ВВЕДЕНИЕ

Никотиновая зависимость представляет собой серьёзную общественную угрозу: ежегодно от неё умирает до 8 миллионов человек [1]. В современном понимании, наряду с генетической предрасположенностью к никотиновой зависимости [2, 3], большое значение имеют также эпигенетические изменения под влиянием факторов окружающей среды, особенно возникающих в период эмбрионального развития мозга [4, 5].

Таким образом, воздействие стрессоров окружающей среды во время пренатального периода, опосредованное эндокринной системой матери или изменением доступности кислорода у плода, увеличивает риск развития расстройств, связанных с употреблением психоактивных веществ [6, 7], особенно никотиновой зависимости, у потомков [8, 9].

Гипоксия плода, часто сопровождающаяся реакцией глюкокортикоидной системы матери на нарушение доставки кислорода, является одним

Принятые сокращения: АХЭ – ацетилхолинэстераза; ПГ – пренатальная гипоксия; ХАТ – холин-ацетилтрансфераза; AMG – амигдала; *chrna4* – альфа-4-субъединица никотинового ацетилхолинового рецептора; *chrna7* – альфа-7-субъединица никотинового ацетилхолинового рецептора; HPC – гиппокамп; HT – гипоталамус; NAcc – прилежащее ядро стриатума; PFC – медиальная префронтальная кора; PVN – паравентрикулярное ядро таламуса; VTA – вентральная тегментальная область.

\* Адресат для корреспонденции.

из наиболее значимых факторов, предопределяющих нарушения развития мезолимбической системы головного мозга. Это состояние приводит к повышенному потреблению никотина у взрослого потомства [9]. В частности, наши предыдущие исследования на крысах показали, что повышенный риск никотиновой зависимости у взрослых может быть связан с эпизодами тяжёлой гипоксии на 14–16-й дни эмбриогенеза [10, 11], что соответствует 5–7-й неделям беременности у человека в плане формирования структур мозга [12]. В этот период дофаминергические нейроны вентральной тегментальной области (VTA) завершают аксональное наведение к прилежащему ядру стриатума (NAcc) [13], а гиппокамп (HPC) и другие корковые структуры, иннервирующие NAcc, только начинают формироваться [14]. В нашем предыдущем исследовании мы дополнительно сравнили эффекты внутриутробной ишемии плода и пренатальной гипобарической гипоксии, моделируемой в барокамере, в сочетании со стрессорной реакцией матери [11, 15]. Мы обнаружили, что ключевую роль в предрасположенности к никотиновой зависимости играет не только сама гипоксия, но и избыточное снабжение развивающегося мозга глюкокортикоидами [11]. Это приводило к аберрантному профилю экспрессии глюкокортикоидных рецепторов во внегипotalамических структурах головного мозга, вызывая нарушение циркадной динамики глюкокортикоидов, глюкокортикоид-зависимой экспрессии и, как следствие, нарушение глюкокортикоид-зависимых процессов на протяжении всей дальнейшей жизни [16–18]. Гипоксия и связанные со стрессом процессы могут влиять на созревание холинергической медиаторной системы мозга как через изменения экспрессии отдельных элементов [19], так и через недостаточность аэробного окислительного метаболизма для эффективного синтеза ацетилхолина [20–22].

Первичные механизмы, лежащие в основе влияния пренатальной гипоксии (ПГ) и материнских глюкокортикоидных стрессорных гормонов на развитие мозга плода, которое имеет решающее значение для формирования никотиновой зависимости, до сих пор остаются неясными. Поэтому в данной работе мы изучили динамику активности ключевых ферментов, участвующих в синтезе и деградации ацетилхолина, а именно холин-ацетилтрансферазы (ХАТ) и ацетилхолин-эстеразы (АХЭ), а также колебания концентрации ацетилхолина на третьей неделе эмбрионального развития (e15, e16, e17, e20) и на 1-е сутки после рождения (р1) в мозге контрольных крыс и крыс, подвергшихся ПГ. Учитывая возможность нарушений экспрессии рецепторов ацетилхолина, мы также исследовали динамику транскрипции

субъединиц никотинового ацетилхолинового рецептора альфа-4 (*chrna4*) и альфа-7 (*chrna7*) как в развивающемся, так и во взрослом мозге под влиянием ПГ. Хроническая никотиновая зависимость возникает из-за снижения транскрипции рецепторов ацетилхолина в результате потребления никотина. Ранее нами было показано, что взрослые ПГ крысы проявляют повышенную склонность к потреблению никотина в условиях свободного выбора [10], а хроническое потребление никотина через осмотические мини-насосы вызывает у этих крыс более выраженные поведенческие признаки никотиновой зависимости по сравнению с контрольными животными [10, 11]. В этом исследовании мы также использовали осмотические мини-насосы для обеспечения непрерывной подачи никотина в течение двух недель и сравнивали влияние никотина на транскрипцию *chrna4* и *chrna7* в структурах мозга взрослых крыс в контрольной группе и группе ПГ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Исследование проведено на животных из ЦКП «Биоколлекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. Павлова РАН. В работе были использованы взрослые беременные самки крыс линии Вистар в возрасте 12–13 недель и массой 220–250 г вместе с их эмбриональным (e15, e16, e17, e20) и новорожденным (р1) потомством без определения пола и взрослым потомством – самцами в возрасте 3 месяца и массой 320–350 г. Все экспериментальные процедуры выполнены в соответствии с «Методическими указаниями по проведению исследований на животных» [23] и одобрены этическим комитетом по использованию животных Института физиологии им. Павлова РАН (протокол № 08/02 от 02.08.2022).

**Пренатальная гипоксия.** Модель ПГ, описанная в наших предыдущих исследованиях, использовалась как модель гипоксии плода [10, 11, 16–18]. Для моделирования ПГ мы использовали барокамеру проточного типа с температурой от 20 °C до 25 °C, в которой атмосферное давление постепенно снижали до 180 мм.рт.ст., достигая 5%-ного содержания кислорода (что эквивалентно 11 000 м над уровнем моря) в течение 20 мин. Через 3 ч воздействия содержание кислорода нормализовалось в течение 20 мин. Беременных самок помещали в такие условия 3 дня подряд (14-й, 15-й и 16-й дни беременности) с интервалом между сеансами 24 ч. Летальность в барокамере составила около 15%. Интактных самок контрольной группы также помещали в барокамеру на 3 ч на 14-й, 15-й и 16-й дни беременности, не подвергая

гипоксическому воздействию. Срок беременности составил 22–23 дня.

**Колориметрические методы.** Для колориметрического анализа головной мозг эмбрионов (e15, e16, e17, e20) и новорожденных (p1) контрольных и ПГ крыс извлекали и замораживали в жидком азоте. Каждая группа крыс состояла из случайно выбранных эмбрионов или детёнышей от разных самок, чтобы минимизировать систематическую ошибку в помёте.

**Измерение активности холин-ацетилтрансферазы.** Активность ХАТ анализировали с использованием набора для колориметрического анализа (E-BC-K125-M; «Elabscience», США). Для выделения цитозольных белков образцы мозга промывали и гомогенизировали в PBS (0,01 М, pH 7,4) при +4 °C и центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин. Процедуры анализа проводили в соответствии с протоколом производителя, а поглощение измеряли при длине волн 324 нм с использованием планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, «BMG Labtech», Германия). Количество кофермента A, образовавшегося в ходе реакции, определяли с использованием стандартной кривой. Активность ХАТ рассчитывали в нмоль кофермента A, генерируемого в минуту в пересчёте на мг общего белка. Как здесь, так и в других биохимических тестах, приведённых ниже, концентрацию общего белка в образцах измеряли с использованием набора Pierce Rapid Gold BCA («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя.

**Измерение активности ацетилхолинэстеразы.** Активность АХЭ анализировали с использованием набора для колориметрического анализа (E-BC-K052-S; «Elabscience»). Образцы мозга промывали и гомогенизировали в 0,9%-ном растворе NaCl при +4 °C. Процедуры анализа проводили в соответствии с протоколом производителя, а поглощение измеряли при длине волн 520 нм с использованием планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, «BMG Labtech»). Количество ацетилхолина, оставшегося после реакции, определяли с использованием стандартной кривой. Активность АХЭ рассчитывали в нмоль гидролизованного ацетилхолина в минуту в пересчёте на мг общего белка.

**Измерение концентрации ацетилхолина.** Концентрацию ацетилхолина анализировали с использованием колориметрического набора ELISA (E-EL-0081; «Elabscience»). Образцы мозга промывали и гомогенизировали в PBS (0,01 М, pH 7,4) при +4 °C и центрифугировали при 5 000 g в течение 10 мин для выделения супернатанта, содержащего ацетилхолин. Процедуры анализа проводили в соответствии с протоколом производителя, а поглощение измеряли при 450 нм с использованием планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, «BMG Labtech»). Концентрацию ацетилхолина определяли с использованием стандартной кривой, рассчитывали и выражали в пг на мг общего белка.

Концентрацию никотина определяли с использованием стандартной кривой, рассчитывали и выражали в пг на мг общего белка.

**Хроническое потребление никотина взрослыми крысами.** Детёнышей крыс отсаживали от матерей в возрасте 30 дней, когда самки тратили на кормление не более 2 ч [24]. После отъёма крыс помещали в клетки размерами 60 × 30 × 20 см по 5–6 животных в каждой. Каждая группа состояла из случайно выбранных животных, рождённых от разных самок, чтобы минимизировать систематическую ошибку в помёте. Крысы находились в свободном доступе к воде и пище и содержались в режиме темноты и света 12 : 12 ч при комнатной температуре и постоянной влажности около 60%. Для проведения эксперимента использовали взрослых самцов с активным сперматогенезом из контрольной и ПГ групп в возрасте 3 месяца. В первый день крысам под изофлурановой анестезией подкожно имплантировали осмотические мини-насосы (2002W, «RWD Systems», Китай) со скоростью потока 0,5 мкл/ч, содержащие раствор тартрата никотина. Концентрацию никотина в насосах корректировали с учётом различий в массе тела крыс, что приводило к непрерывному подкожному вливанию тартрата никотина со скоростью 9 мг/кг в день. У контрольных и ПГ крыс, не принимавших никотин, мини-насосы заполняли физиологическим раствором. После двух недель потребления никотина или физиологического раствора крыс декапитировали гильотиной и собирали образцы структур головного мозга для ПЦР-анализа.

**Количественная ПЦР РВ.** Тотальную РНК из головного мозга эмбрионов (e15, e16, e17, e20) и новорожденных (p1) контрольных и ПГ крыс, а также из образцов гиппокампа (HPC), медиальной префронтальной коры (PFC), амигдалы (AMG), прилежащего ядра (NAcc), паравентрикулярного ядра таламуса (PVN), гипotalамуса (HT) и вентральной тегментальной области (VTA) взрослых крыс (через две недели после потребления никотина или физиологического раствора) выделяли с помощью набора ExtractRNA Kit (BC032, «Евроген», Россия) и очищали с помощью DNaseI (SB-G3342, «Servicebio», Китай), согласно инструкциям производителя. Качество и концентрацию тотальной РНК определяли путём измерения оптической плотности при 260 и 280 нм с использованием планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, «BMG Labtech»). КДНК синтезировали из 2 мкг тотальной РНК с использованием набора для обратной транскрипции MMLV (SK021, «Евроген», Россия). Количественную ПЦР РВ проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген») на термоциклире Gentier 96E («Tianlong», Китай). Уровни экспрессии генов альфа-4-субъединицы

рецептора ацетилхолина (*chrna4*) и альфа-7-субъединицы рецептора ацетилхолина (*chrna7*) оценивали с использованием метода  $\Delta\Delta Ct$  с нормализацией по содержанию мРНК  $\beta$ -тубулина в качестве референсного гена. Использовали следующие последовательности праймеров:

- *chrna4*, прямая: GGTGAAGGAGGACTGGAA,  
обратная: AAGGCAGACAATGATGAACA  
(температура отжига +58 °C, продукт 78 п.н.);
- *chrna7*, прямая: CTCTTGGAAATAACTGTCTT,  
обратная: CGAAGTATTGTGCTATCA  
(температура отжига +58 °C, продукт 105 п.н.);
- $\beta$ -тубулин, прямая: TAGAGGAGATGCTACTTA,  
обратная: AATGGTGATAATACTGTTAA  
(температура отжига +58 °C, продукт 147 п.н.).

**Вестерн-блоттинг.** Для подтверждения влияния изменений экспрессии мРНК *chrna7* на уровень белка CHRNA7 в структурах головного мозга взрослых контрольных и ПГ крыс мы использовали вестерн-блоттинг. Для получения суммарных белковых экстрактов для вестерн-блоттинга образцы НРС, РФС, АМГ, НАс, PVN, НТ и ВТА гомогенизировали в 50 мМ Tris-HCl (рН 8,0), содержащем 150 мМ NaCl, 1%-ный Triton X-100 и коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (SB-G2006, SB-G2007, «Servicebio»). Гомогенаты инкубировали на шейкере в течение 30 мин при +4 °C, центрифугировали 10 мин при 14 000 *g* и собирали супернатанты. Образцы, содержащие равные количества общего белка, кипятили в течение 10 мин при +70 °C с 3-кратным буфером Лэммли.

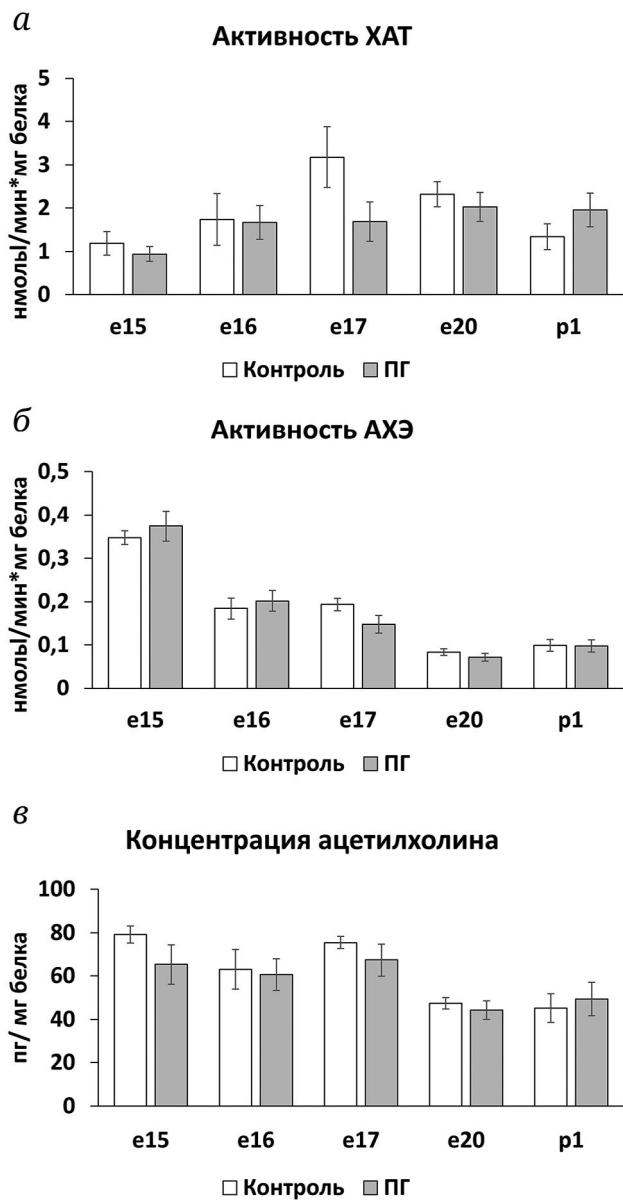
Белки разделяли электрофорезом в поликариламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и затем переносили на мембранны из ПВДФ («Thermo Fisher Scientific», США). После блокирования в течение 1 ч в PBS, содержащем 5% обезжиренного молока, мембранны инкубировали в PBS с кроличьими первичными антителами против CHRNA7 (1 : 2000, DF13247, «Affinity Biosciences», США) и  $\beta$ -тубулина (1 : 5000, ab179513, «Abcam», Великобритания) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем мембранны трижды промывали PBST (PBS с 0,1%-ным Tween-20) и инкубировали в PBS с HRP-коньюгированными антикроличьими вторичными антителами (1 : 5000, E-AB-1003, «Elabscience») в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембранны дважды промывали PBST. Визуализацию осуществляли с помощью набора Clarity ECL («Bio-Rad», США) и документирующей системы ChemiScope 6000 («Clinx Science Instruments», Китай). Содержание белка CHRNA7 определяли, нормируя данные на содержание  $\beta$ -тубулина, с использованием программного обеспечения ImageJ («NIH», США). Полные изображения результатов вестерн-блоттинга представлены на онлайн-ресурсе 1 (рис. П1 Приложения).

**Статистический анализ.** Статистический анализ проводили с использованием Prism 10 («GraphPad, Inc.»). Распределение данных оценивали на нормальность с использованием критерия Шапиро–Уилка ( $p > 0,05$ ) и QQ-графика. В качестве параметрического теста использовали одно- или двусторонний дисперсионный анализ. Апостериорные сравнения проводились с использованием теста Тьюки. Статистическая значимость была установлена на уровне  $p < 0,05$ . Результаты выражали как среднее ± стандартная ошибка среднего. Для ПЦР РВ и вестерн-блоттинга среднее значение и стандартная ошибка среднего были пересчитаны как % от контроля соответствующего возраста, принятого за 100%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

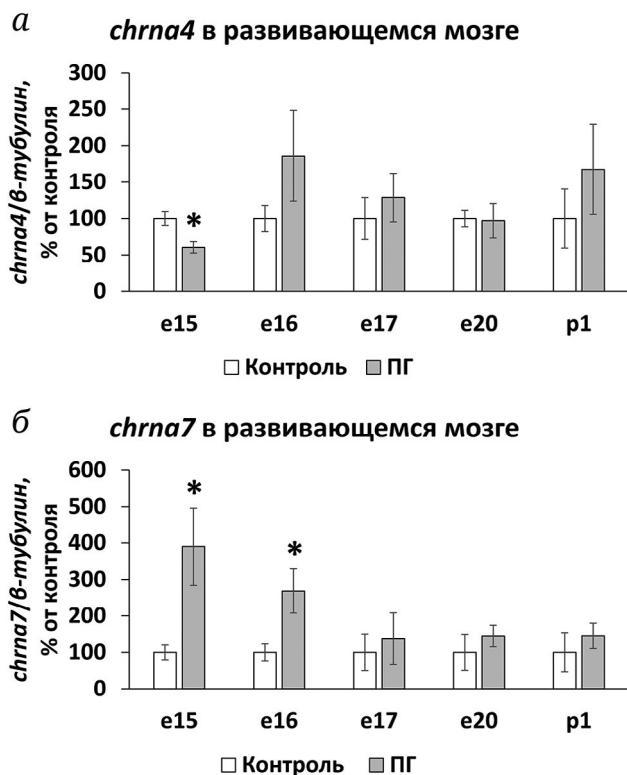
**Влияние пренатальной гипоксии на метаболизм ацетилхолина в мозге крыс во время пренатального и раннего постнатального развития.** Чтобы изучить влияние ПГ на метаболизм ацетилхолина, мы измерили активность ХАТ, фермента, синтезирующего этот нейромедиатор, а также активность АХЭ, фермента, расщепляющего ацетилхолин, в развивающемся мозге эмбрионов на третьей неделе беременности (e15, e16, e17, e20) и у новорожденных крысят (р1) (рис. 1, а, б). Нами не было обнаружено никаких изменений активности этих ферментов в мозге ПГ крыс по сравнению с контролем. Аналогичным образом не наблюдалось существенных изменений концентрации ацетилхолина во все исследованные периоды (рис. 1, в).

**Влияние пренатальной гипоксии на экспрессию мРНК рецепторов ацетилхолина в мозге крыс во время пренатального и раннего постнатального развития.** Чтобы оценить влияние ПГ на рецепторную часть нейромедиаторной системы ацетилхолина, мы измерили относительное содержание мРНК альфа-4- (*chrna4*) и альфа-7 (*chrna7*)-субъединиц никотинового ацетилхолинового рецептора в эмбриональном мозге в течение третьей недели беременности (e15, e16, e17, e20) и в мозге новорожденных крысят (р1) (рис. 2, а, б). Снижение относительного количества мРНК *chrna4* было обнаружено в мозге крыс через сутки после первого сеанса ПГ (рис. 2, а, e15, ANOVA F (1, 9) = 10,2212,  $p = 0,0127$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,0126685$ , тест Тьюки). В ходе дальнейшего пренатального развития и у новорожденных ПГ крыс не выявлено существенных изменений экспрессии *chrna4* в головном мозге. Кроме того, мы обнаружили увеличение относительного количества мРНК *chrna7* через 24 ч после первого сеанса ПГ (рис. 2, б, e15,



**Рис. 1.** Влияние ПГ на активность XAT (а), АХЭ (б) и концентрацию ацетилхолина (в) в мозге крыс во время пренатального (эмбриональные дни e15, e16, e17, e20) и раннего постнатального (постнатальный день p1) развития, выявленные колориметрическими методами.  $n = 5$

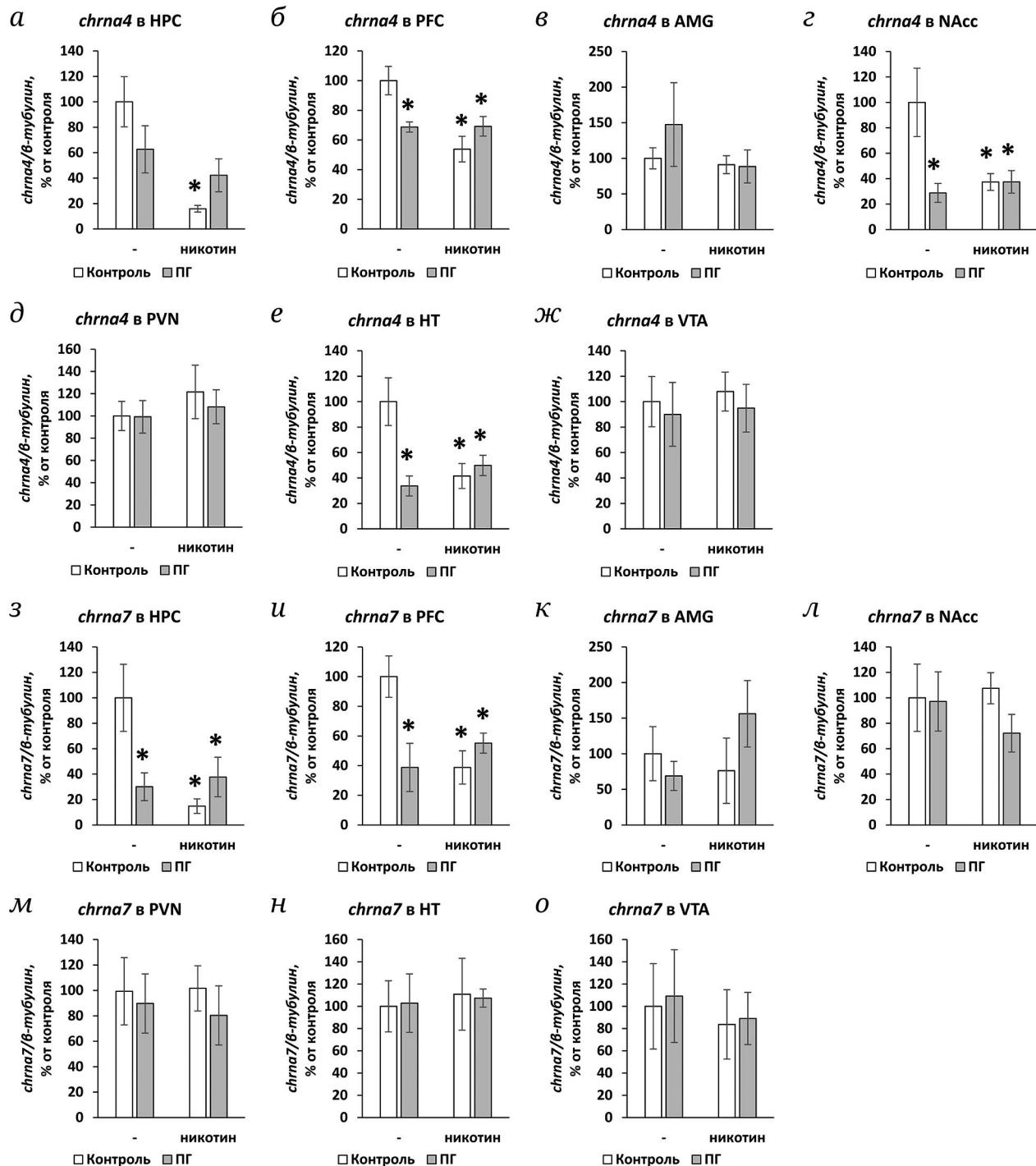
ANOVA F (1, 9) = 7,2211,  $p = 0,0276$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,0276166$ , тест Тьюки) и через день после второго сеанса ПГ (рис. 2, б, e16, ANOVA F (1, 9) = 6,6590,  $p = 0,0326$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,0325905$ , тест Тьюки). На протяжении дальнейшего пренатального развития и у новорожденных ПГ крыс не выявлено существенных изменений экспрессии *chrna7* в головном мозге. Таким образом, несмотря на отсутствие влияния на метаболизм ацетилхолина, ПГ вызывает изменения экспрессии рецепторов ацетилхолина в развивающемся мозге.



**Рис. 2.** Влияние ПГ на уровни экспрессии мРНК *chrna4* (а) и *chrna7* (б) в головном мозге крыс во время пренатального (эмбриональные дни e15, e16, e17, e20) и раннего постнатального (постнатальный день p1) развития, выявленное с помощью ПЦР РВ. \* Различия по сравнению с контролем достоверны,  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ, тест Тьюки).  $n = 5$

**Влияние пренатальной гипоксии на экспрессию мРНК ацетилхолиновых рецепторов в структурах головного мозга интактных взрослых крыс и у животных, подвергшихся воздействию никотина.** Для изучения отдаленных последствий ПГ для экспрессии ацетилхолиновых рецепторов в головном мозге мы измерили относительное содержание мРНК *chrna4* и *chrna7* в структурах лимбической системы (HPC, PFC, AMG, NAcc, PVN, НТ, VTA) взрослых (3-месячных) контрольных и ПГ крыс как без, так и после двух недель стабильного потребления никотина, обеспечиваемого с помощью осмотических мини-насосов.

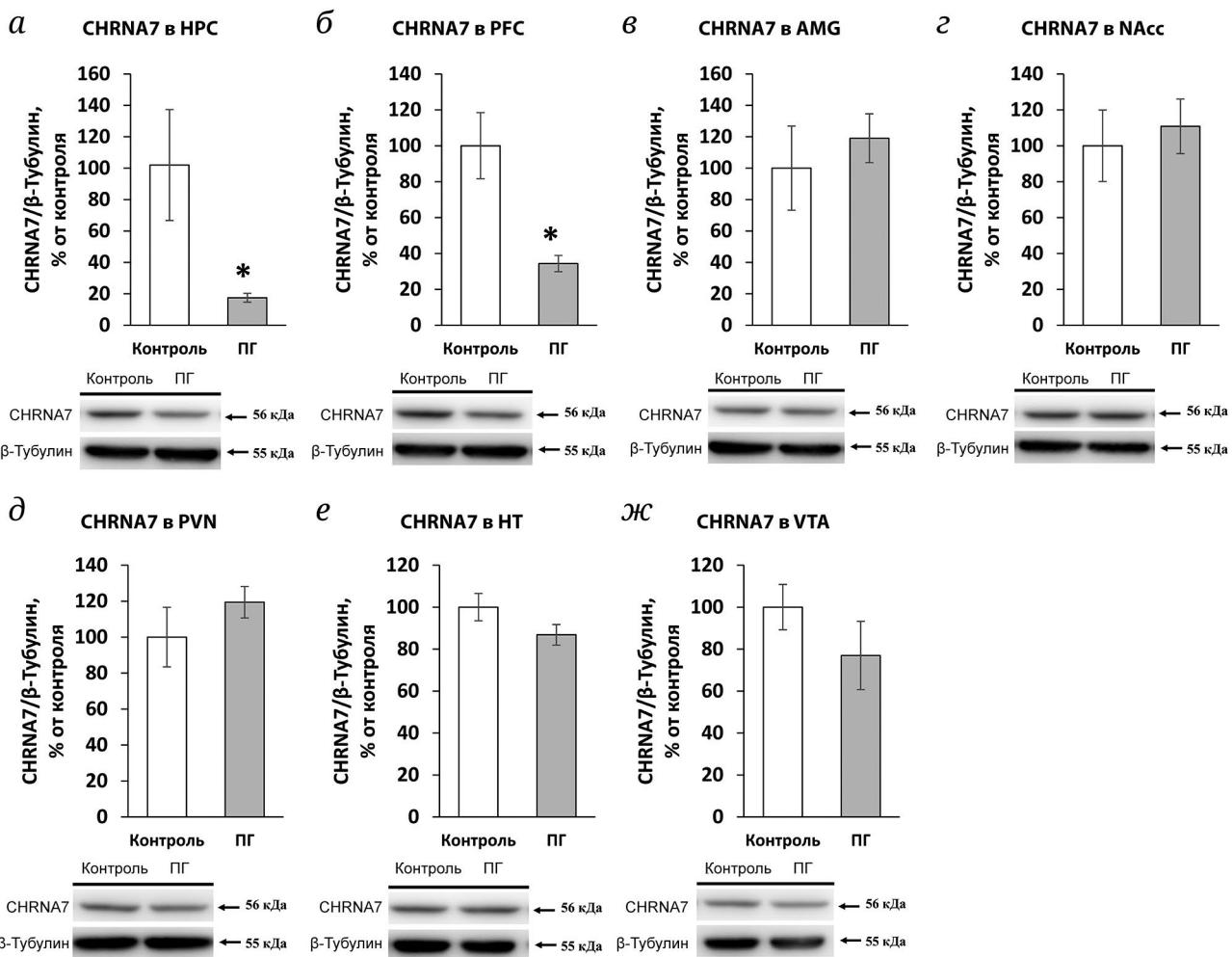
При оценке относительного количества мРНК у ПГ крыс наблюдалось значительное снижение экспрессии гена *chrna4* в PFC (рис. 3, б, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 9,872,  $p = 0,0063$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,0399817$ , тест Тьюки), NAcc (рис. 3, г, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 5,644,  $p = 0,0304$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,0190$ , тест Тьюки) и НТ (рис. 3, е, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 9,673,  $p = 0,0067$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,0061796$ , тест Тьюки), но без влияния на HPC (рис. 3, а), AMG (рис. 3, в),



**Рис. 3.** Влияние ПГ и потребления никотина на уровни экспрессии мРНК *chRNA4* (а–ж) и *chRNA7* (з–о) в HPC (а, з), PFC (б, и), AMG (в, к), NAcc (г, л), PVN (д, м), HT (е, н), VTA (ж, о) взрослых крыс, выявленные методом ПЦР РВ. \* Различия по сравнению с контролем достоверны,  $p < 0,05$  (двуихфакторный дисперсионный анализ, тест Тьюки).  $n = 5$

PVN (рис. 3, д) и VTA (рис. 3, ж). Более того, через две недели потребления никотина количество мРНК *chRNA4* в мозге контрольных крыс значительно снизилось до значений, сопоставимых с таковыми у ПГ крыс в HPC (рис. 3, а, ANOVA Никотин F (1, 17) = 9,989,  $p = 0,0057$ ; контроль по сравнению с «контроль + никотин»,  $p = 0,0057263$ ,

тест Тьюки), PFC (рис. 3, б, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 9,872,  $p = 0,0234$ ; контроль по сравнению с «контроль + никотин»,  $p = 0,0022758$ , тест Тьюки), NAcc (рис. 3, г, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 5,644,  $p = 0,0304$ ; контроль по сравнению с «контроль + никотин»,  $p = 0,0421275$ , тест Тьюки) и HT (рис. 3, е, ANOVA Группа × Нико-



**Рис. 4.** Влияние ПГ на экспрессию белка CHRNA7 в HPC (а), PFC (б), AMG (в), NAcc (г), PVN (д), HT (е), VTA (ж) взрослых крыс, выявленную методом вестерн-блоттинга. \* Различия по сравнению с контролем достоверны,  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ, тест Тьюки).  $n = 5$

тин F (1, 16) = 9,673,  $p = 0,0067$ ; контроль по сравнению с «контроль + никотин»,  $p = 0,0157127$ , тест Тьюки). Напротив, потребление никотина крысами ПГ не вызывало изменений в содержании мРНК *chrna4* во всех структурах мозга по сравнению с интактными ПГ крысами (рис. 3).

При оценке относительного количества мРНК *chrna7* в мозге взрослых крыс было обнаружено, что ПГ вызывает значительное снижение экспрессии гена в HPC (рис. 3, з, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 7,945,  $p = 0,0124$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,038$ , тест Тьюки) и PFC (рис. 3, и, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 9,55,  $p = 0,00702$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,0157$ , тест Тьюки), не влияя на AMG (рис. 3, к), NAcc (рис. 3, л), PVN (рис. 3, м), HT (рис. 3, н) и VTA (рис. 3, о).

Влияние изменений уровней мРНК *chrna7* на экспрессию белка CHRNA7 в структурах мозга взрослых контрольных и ПГ крыс было проверено методом вестерн-блоттинга (рис. 4). Было

обнаружено, что ПГ вызывает снижение уровня белка CHRNA7 в HPC (рис. 4, а, ANOVA F (1, 9) = 5,6864,  $p = 0,0442$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,0442243$ , тест Тьюки) и PFC (рис. 4, б, ANOVA F (1, 9) = 11,9926,  $p = 0,0085$ ; контроль по сравнению с ПГ,  $p = 0,0085305$ , тест Тьюки), но не в AMG (рис. 4, в), NAcc (рис. 4, г), PVN (рис. 4, д), HT (рис. 4, е) и VTA (рис. 4, ж).

Кроме того, после двух недель потребления никотина количество мРНК *chrna7* в мозге контрольных крыс значительно снизилось до уровней, наблюдаемых в HPC ПГ крыс (рис. 3, з, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 7,945,  $p = 0,0124$ ; контроль по сравнению с «контроль + никотин»,  $p = 0,0103$ , тест Тьюки) и PFC (рис. 3, и, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 9,55,  $p = 0,00702$ ; контроль по сравнению с «контроль + никотин»,  $p = 0,0156$ , тест Тьюки). В то же время в мозге ПГ крыс потребление никотина не вызывало изменений в уровнях мРНК *chrna7* по сравнению с интактными ПГ крысами (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Факторы внешней среды оказывают существенное влияние на развивающийся организм. Условия формирования отдельных органов и тканей плода передают информацию об условиях дальнейшей жизнедеятельности [25–27]. Нормальное протекание беременности подразумевает высокую эффективность поступления энергетических субстратов, необходимых для интенсивных процессов пролиферации, миграции и образования связей между клетками мозга [28], а также ограничение поступления стероидных гормонов до поздних сроков беременности, когда глюкокортикоиды вовлекаются в такие процессы, как терминальная дифференцировка нейрональных клеток и созревание лёгких [29–32]. Ограничение кислородного снабжения эмбриона вызывает существенное нарушение метаболизма, ведя к замедлению развития [25–27, 33, 34], в то время как избыточное поступление глюкокортикоидов способно нарушать формирование адекватного профиля тканеспецифической экспрессии, сохраняющейся на всю жизнь на эпигенетическом уровне [16, 17, 35, 36].

Гипоксия неизбежно сопровождается снижением аэробного энергетического метаболизма и приводит к снижению продукции АТР, необходимого в том числе для синтеза ацетилхолина на фоне перехода клеток на анаэробный метаболизм, что регулируется гипоксия-индуцируемым фактором-1 (HIF1) [37–40]. Однако степени выраженности последствий гипоксии и стресса матери могут существенно отличаться в зависимости от времени воздействия на развивающийся мозг [12]. Так, при предъявлении ПГ на 14–16 сутки эмбрионального развития мы не обнаружили существенных изменений в активности как ХАТ, так и АХЭ, что, как следствие, не привело и к изменениям концентрации ацетилхолина в развивающемся эмбриональном и раннем постнатальном мозге крыс, несмотря на то что ранее нами и другими исследователями был подтверждён факт интенсификации гипоксия-зависимого сигналинга как во время эмбриогенеза, так и в постнатальном периоде [26, 41–45]. При этом на ранних этапах предъявления гипоксических эпизодов мы показали снижение транскрипции *chrna4* (e15) и, вероятно, глюкокортикоид-зависимое увеличение транскрипции *chrna7* (e15, e16) [11, 19]. В этот период развития мозга уже сформированы его структуры, обеспечивающие выброс ацетилхолина [12, 46], что может способствовать повышению устойчивости ацетилхолин-производящих нейронов к внешним стрессорам, однако ещё только начинается формирование рецептирующих ацетилхолин ГАМК-ergicических

нейронов стриатума, а также нейронов НРС, префронтальной коры и AMG – корковых структур, регулирующих активность стриатума по отношению к выбросу дофамина VTA [12, 14, 47]. Как следствие, именно в этих структурах мозга наблюдаются наиболее яркие нарушения экспрессии ацетилхолиновых рецепторов, сохраняющиеся во взрослом мозге. Эти нарушения можно рассматривать либо как причину, либо как компенсаторную реакцию на повышенную возбудимость клеток головного мозга, о которой сообщают другие авторы [48].

Ранее нами было показано, что ПГ вызывает пожизненные изменения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в НРС и префронтальной коре, что сопровождается снижением глюкокортикоид-зависимой транскрипции и нарушением глюкокортикоидной отрицательной обратной связи [11, 16, 17]. Более того, альфа-7-субъединица ацетилхолинового рецептора была идентифицирована как мишень транскрипционной активности глюкокортикоидных рецепторов [19, 49], а снижение экспрессии мРНК и белка CHRNA7 в результате ПГ выявлено нами именно в гиппокампе и префронтальной коре. Эти глутаматергические структуры мозга активируют ГАМК-ergicические нейроны стриатума, что сопровождается усилением выброса дофамина нейронами VTA и вызывает эффект, известный как внутреннее подкрепление [50–52]. Снижение эффективности выброса глутамата из-за снижения экспрессии *chrna4* и *chrna7* в префронтальной коре и *chrna7* в НРС, так же как и снижение экспрессии *chrna4* в стриатуме взрослых крыс в результате ПГ, может объяснить описанную нами ранее склонность этих животных к потреблению никотина и выраженный синдром отмены [10, 11]. Более того, для нейронов AMG показано опосредованное ингибирование потенциалов действия в клеткахентрального стриатума [53, 54]. При этом в AMG нами не было показано изменений экспрессии *chrna4* и *chrna7*, что также может вносить вклад в несбалансированную активность лимбической системы в результате ПГ. И наконец, гипоталамические нейроны способны к усилинию стимуляции дофаминовых нейронов VTA [55], однако в них также снижена относительная экспрессия *chrna4*.

В клинической практике хорошо известен процесс выработки резистентности к никотину, определяющей развитие зависимости от дальнейшего потребления. Известно, что одним из механизмов такой резистентности является снижение экспрессии ацетилхолиновых рецепторов, в том числе альфа-4- и альфа-7-субъединиц [56–61]. Интересно, что через неделю вынужденного потребления никотина снижение экспрессии *chrna4*

(HPC, PFC, NAcc, HT) и *chrna7* (HPC, PFC) было выявлено только у контрольных животных, в то время как изначально низкая экспрессия этих генов в мозге ПГ крыс оставалась на неизменно низком уровне.

Таким образом, ПГ не оказывает влияния на активность синтеза и деградации ацетилхолина в развивающемся мозге, но вызывает существенные нарушения экспрессии альфа-4- и альфа-7-субъединиц ацетилхолиновых рецепторов в структурах лимбической системы крыс, что может лежать в основе ранее показанной склонности к потреблению никотина и выраженного абстинентного синдрома при отмене.

**Вклад авторов.** О.В. Ветровой – концепция и руководство работой; О.В. Ветровой, С.С. Потапова, В.А. Стратилов, Е.И. Тюлькова – проведение экспериментов; О.В. Ветровой, С.С. Потапова, В.А. Стратилов, Е.И. Тюлькова – обсуждение результатов исследования; О.В. Ветровой и В.А. Стратилов – написание текста; Е.И. Тюлькова – редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы глубоко признательны Елене Аксеновой за прекрасную техническую помощь в экспериментах на животных.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00003).

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

**Соблюдение этических норм.** Эксперименты на животных проводились в соответствии с «Методическими указаниями по проведению исследований на животных». Протокол исследования рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом Института физиологии им. И.П. Павлова (протокол № 08/02 от 02.08.2022).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025, fourth edition, accessed October 27, 2023, URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240039322>.
- Mineur, Y. S., and Picciotto, M. R. (2008) Genetics of nicotinic acetylcholine receptors: Relevance to nicotine addiction, *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 323-33, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.010>.
- Gorwood, P., Le Strat, Y., and Ramoz, N. (2017) Genetics of addictive behavior: the example of nicotine dependence, *Dialog. Clin. Neurosci.*, **19**, 237-245, <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.3/pgorwood>.
- Nestler, E. J. (2014) Epigenetic mechanisms of drug addiction, *Neuropharmacology*, **76**, 259-268, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.004>.
- Muenstermann, C., and Clemens, K. J. (2024) Epigenetic mechanisms of nicotine dependence, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **156**, 105505, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105505>.
- Reynaert, M. L., Marrocco, J., Gatta, E., Mairesse, J., Van Camp, G., Fagioli, F., Maccari, S., Nicoletti, F., and Morley-Fletcher, S. (2015) A self-medication hypothesis for increased vulnerability to drug abuse in prenatally restraint stressed rats, *Adv. Neurobiol.*, **10**, 101-120, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1372-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1372-5_6).
- Pastor, V., Antonelli, M. C., and Pallarés, M. E. (2016) Unravelling the link between prenatal stress, dopamine and substance use disorder, *Neurotox. Res.*, **31**, 169-186, <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9674-9>.
- Said, N., Lakehayli, S., el Khachibi, M., el Ouahli, M., Nadifi, S., Hakkou, F., and Tazi, A. (2015) Prenatal stress induces vulnerability to nicotine addiction and alters D2 receptors' expression in the nucleus accumbens in adult rats, *Neuroscience*, **304**, 279-285, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.029>.
- Stratilov, V. A., Tyulkova, E. I., and Vetrovoy, O. V. (2020) Prenatal stress as a factor of the development of addictive states, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **56**, 471-490, <https://doi.org/10.1134/S0022093020060010>.
- Stratilov, V. A., Vetrovoy, O. V., and Tyulkova, E. I. (2022) Prenatal hypoxia affects nicotine consumption and withdrawal in adult rats via impairment of the glutamate system in the brain, *Mol. Neurobiol.*, **59**, 4550-4561, <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02866-8>.
- Stratilov, V., Vetrovoy, O., Potapova, S., and Tyulkova, E. (2024) The prenatal hypoxic pathology associated with maternal stress predisposes to dysregulated expression of the *chrna7* gene and the subsequent development of nicotine addiction in adult offspring, *Neuroendocrinology*, **114**, 423-438, <https://doi.org/10.1159/000536214>.
- Golan, H., and Huleihel, M. (2006) The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models, *Dev. Sci.*, **9**, 338-349, <https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2006.00498.x>.
- Prestoz, L., Jaber, M., and Gaillard, A. (2012) Dopaminergic axon guidance: which makes what? *Front. Cell. Neurosci.*, **6**, 32, <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00032>.
- Bayer, S. A. (1980) Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life, *J. Comp. Neurol.*, **190**, 115-134, <https://doi.org/10.1002/cne.901900108>
- Tsuji, M., Coq, J. O., Ogawa, Y., Yamamoto, Y., and Ohshima, M. (2018) A rat model of mild intrauterine hypoperfusion with microcoil stenosis, *J. Vis. Exp.*, **7**, 56723, <https://doi.org/10.3791/56723>.

16. Vetrovoy, O., Stratilov, V., Lomert, E., and Tyulkova, E. (2023) Prenatal hypoxia-induced adverse reaction to mild stress is associated with depressive-like changes in the glucocorticoid system of rats, *Neurochem. Res.*, **48**, 1455-1467, <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03837-0>.
17. Vetrovoy, O., Tyulkova, E., Stratilov, V., Baranova, K., Nimiritsky, P., Makarevich, P., and Rybnikova, E. (2021) Long-term effects of prenatal severe hypoxia on central and peripheral components of the glucocorticoid system in rats, *Dev. Neurosci.*, **42**, 145-158, <https://doi.org/10.1159/000512223>.
18. Vetrovoy, O., Stratilov, V., Nimiritsky, P., Makarevich, P., and Tyulkova, E. (2021) Prenatal hypoxia induces premature aging accompanied by impaired function of the glutamatergic system in rat hippocampus, *Neurochem. Res.*, **46**, 550-563, <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03191-z>.
19. Carrasco-Serrano, C., and Criado, M. (2004) Glucocorticoid activation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit gene: involvement of transcription factor Egr-1, *FEBS Lett.*, **566**, 247-250, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.049>.
20. Gibson, G. E., and Blass, J. P. (1976) Impaired synthesis of acetylcholine in brain accompanying mild hypoxia and hypoglycemia, *J. Neurochem.*, **27**, 37-42, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1976.tb01540.x>.
21. Gibson, G. E., Peterson, C., and Sansone, J. (1981) Decreases in amino acids and acetylcholine metabolism during hypoxia, *J. Neurochem.*, **37**, 192-201, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb05308.x>.
22. López-Pérez, S. J., Morales-Villagrán, A., Ventura-Valenzuela, J., and Medina-Caja, L. (2012) Short- and long-term changes in extracellular glutamate and acetylcholine concentrations in the rat hippocampus following hypoxia, *Neurochem. Int.*, **61**, 258-265, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.03.009>.
23. Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., and Altman, D. G. (2010) Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research, *PLoS Biol.*, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
24. Cramer, C. P., Thiels, E., and Alberts, J. R. (1990) Weaning in rats: I. Maternal behavior, *Dev. Psychobiol.*, **23**, 479-493, <https://doi.org/10.1002/dev.420230604>.
25. Ducsay, C. A., Goyal, R., Pearce, W. J., Wilson, S., Hu, X. Q., and Zhang, L. (2018) Gestational hypoxia and developmental plasticity, *Physiol. Rev.*, **98**, 1241-1334, <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2017>.
26. Nalivaeva, N. N., Turner, A. J., and Zhuravin, I. A. (2018) Role of prenatal hypoxia in brain development, cognitive functions, and neurodegeneration, *Front. Neurosci.*, **12**, 825, <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00825>.
27. Piešová, M., and Mach, M. (2020) Impact of perinatal hypoxia on the developing brain, *Physiol. Res.*, **69**, 199-213, <https://doi.org/10.33549/physiolres.934198>.
28. Erecinska, M., Cherian, S., and Silver, I. A. (2004) Energy metabolism in mammalian brain during development, *Prog. Neurobiol.*, **73**, 397-445, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.06.003>.
29. Pofi, R., and Tomlinson, J. W. (2020) Glucocorticoids in pregnancy, *Obstet. Med.*, **13**, 62-69, <https://doi.org/10.1177/1753495X19847832>.
30. Grier, D. G., and Halliday, H. L. (2004) Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development, *Treat. Respir. Med.*, **3**, 295-306, <https://doi.org/10.2165/00151829-200403050-00004>.
31. Tsiarli, M. A., Rudine, A., Kendall, N., Pratt, M. O., Krall, R., Thiels, E., DeFranco, D. B., and Monaghan, A. P. (2017) Antenatal dexamethasone exposure differentially affects distinct cortical neural progenitor cells and triggers long-term changes in murine cerebral architecture and behavior, *Transl. Psychiatry*, **7**, e1153, <https://doi.org/10.1038/tp.2017.65>.
32. Odaka, H., Adachi, N., and Numakawa, T. (2017) Impact of glucocorticoid on neurogenesis, *Neural Regen. Res.*, **12**, 1028-1035, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.211174>.
33. Barrett, R. D., Bennet, L., Davidson, J., Dean, J. M., George, S., Emerald, B. S., and Gunn, A. J. (2007) Destruction and reconstruction: hypoxia and the developing brain, *Birth Defects Res. C Embryo Today*, **81**, 163-176, <https://doi.org/10.1002/bdrc.20095>.
34. Wang, B., Zeng, H., Liu, J., and Sun, M. (2021) Effects of prenatal hypoxia on nervous system development and related diseases, *Front. Neurosci.*, **25**, 755554, <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.755554>.
35. Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M. J. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior, *Nat. Neurosci.*, **7**, 847-854, <https://doi.org/10.1038/nn1276>.
36. Abul, M., Al-Bader, M. D., and Mouihate, A. (2022) Prenatal activation of glucocorticoid receptors induces memory impairment in a sex-dependent manner: role of cyclooxygenase-2, *Mol. Neurobiol.*, **59**, 3767-3777, <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02820-8>.
37. Goda, N., and Kanai, M. (2012) Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism, *Int. J. Hematol.*, **95**, 457-463, <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1069-y>.
38. Watts, M. E., Pocock, R., and Claudio, C. (2018) Brain energy and oxygen metabolism: emerging role in normal function and disease, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 216, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00216>.

39. Vetrovoy, O. V., Rybnikova, E. A., and Samoilov, M. O. (2017) Cerebral mechanisms of hypoxic/ischemic postconditioning, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 392-400, <https://doi.org/10.1134/S000629791703018X>.
40. Sha, D., Jin, H., Kopke, R. D., and Wu, J. Y. (2004) Choline acetyltransferase: regulation and coupling with protein kinase and vesicular acetylcholine transporter on synaptic vesicles, *Neurochem. Res.*, **29**, 199-207, <https://doi.org/10.1023/b:nere.0000010449.05927.f9>.
41. Vetrovoy, O. V., Nimiritsky, P. P., Tyulkova, E. I., and Rybnikova, E. A. (2020) The content and activity of hypoxia-inducible factor HIF1 $\alpha$  increased in the hippocampus of newborn rats that were subjected to prenatal hypoxia on days 14-16 of embryogenesis, *Neurochem. J.*, **14**, 286-289, <https://doi.org/10.1134/S1819712420030125>.
42. Potapova, S. S., Zacheplilo, T. G., Stratilov, V. A., Tyulkova, E. I., and Vetrovoy, O. V. (2023) Prenatal hypoxia causes an increase in the content and transcriptional activity of the hypoxia-inducible factor HIF1 $\alpha$  in the hippocampus of adult and aging rats, *Neurochem. J.*, **17**, 751-754, <https://doi.org/10.1134/S1819712423330012>.
43. Vetrovoy, O., Stratilov, V., Potapova, S., and Tyulkova, E. (2023) Oxidative stress accompanies HIF1-dependent impairment of glucose metabolism in the hippocampus of adult rats survived prenatal severe hypoxia, *Dev. Neurosci.*, <https://doi.org/10.1159/000535326>.
44. Trollmann, R., and Gassmann, M. (2009) The role of hypoxia-inducible transcription factors in the hypoxic neonatal brain, *Brain Dev.*, **31**, 503-509, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2009.03.007>.
45. Gonzalez-Rodriguez, P. J., Xiong, F., Li, Y., Zhou, J., and Zhang, L. (2014) Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: role of glucocorticoid receptors, *Neurobiol. Dis.*, **65**, 172-179, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.01.020>.
46. Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C. C., and Manhães, A. C. (2011) Developmental aspects of the cholinergic system, *Behav. Brain Res.*, **221**, 367-378, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.049>.
47. Van Eden, C. G., Kros, J. M., and Uylings, H. B. (1990) The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas, *Prog. Brain Res.*, **85**, 169-183, [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62680-1](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62680-1).
48. Amakhin, D. V., Soboleva, E. B., Postnikova, T. Y., Tumanova, N. L., Dubrovskaya, N. M., Kalinina, D. S., Vasilev, D. S., and Zaitsev, A. V. (2022) Maternal hypoxia increases the excitability of neurons in the entorhinal cortex and dorsal hippocampus of rat offspring, *Front. Neurosci.*, **16**, 867120, <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.867120>.
49. Hunter, R. G. (2012) Stress and the  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor, *Curr. Drug Targets*, **13**, 607-612, <https://doi.org/10.2174/138945012800398982>.
50. Cho, Y. H., and Jeantet, Y. (2010) Differential involvement of prefrontal cortex, striatum, and hippocampus in DRL performance in mice, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **93**, 85-91, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.08.007>.
51. Wang, J. X., Kurth-Nelson, Z., Kumaran, D., Tirumala, D., Soyer, H., Leibo, J. Z., Hassabis, D., and Botvinick, M. (2018) Prefrontal cortex as a meta-reinforcement learning system, *Nat. Neurosci.*, **21**, 860-868, <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0147-8>.
52. Ballard, I. C., Wagner, A. D., and McClure, S. M. (2019) Hippocampal pattern separation supports reinforcement learning, *Nat. Commun.*, **10**, 1073, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08998-1>.
53. Costa, V. D., Dal Monte, O., Lucas, D. R., Murray, E. A., and Averbeck, B. B. (2016) Amygdala and ventral striatum make distinct contributions to reinforcement learning, *Neuron*, **92**, 505-517, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.025>.
54. Everitt, B. J., Parkinson, J. A., Olmstead, M. C., Arroyo, M., Robledo, P., and Robbins, T. W. (1999) Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems, *Ann. N Y Acad. Sci.*, **877**, 412-438, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09280.x>.
55. Douma, E. H., and de Kloet, E. R. (2020) Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **108**, 48-77, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.015>.
56. Hutchison, K. E., Allen, D. L., Filbey, F. M., Jepson, C., Lerman, C., Benowitz, N. L., Stitzel, J., Bryan, A., McGahey, J., and Haughey, H. M. (2007) CHRNA4 and tobacco dependence: from gene regulation to treatment outcome, *Arch. Gen. Psychiatry*, **64**, 1078-1086, <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.9.1078>.
57. Mexal, S., Berger, R., Logel, J., Ross, R. G., Freedman, R., and Leonard, S. (2010) Differential regulation of alpha7 nicotinic receptor gene (CHRNA7) expression in schizophrenic smokers, *J. Mol. Neurosci.*, **40**, 185-195, <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9233-4>.
58. Liu, X. (2014) Effects of blockade of  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 and  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors on cue-induced reinstatement of nicotine-seeking behaviour in rats, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **17**, 105-116, <https://doi.org/10.1017/S1461145713000874>.
59. O'Connor, E. C., Parker, D., Rollema, H., and Mead, A. N. (2010) The  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 nicotinic acetylcholine-receptor partial agonist varenicline inhibits both nicotine self-administration following repeated dosing and reinstatement of nicotine seeking in rats, *Psychopharmacology*, **208**, 365-376, <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1739-5>.

60. McGranahan, T. M., Patzlaff, N. E., Grady, S. R., Heinemann, S. F., and Booker, T. K. (2011)  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic neurons mediate nicotine reward and anxiety relief, *J. Neurosci.*, **31**, 10891–10902, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0937-11.2011>.
61. Ramachandran, N. L., and Liu, X. (2019) Targeting the  $\alpha 4\beta 2$ - and  $\alpha 7$ -subtypes of nicotinic acetylcholine receptors for smoking cessation medication development, *J. Addict. Res. Ther.*, **10**, 381.

**PRENATAL HYPOXIA PREDISPOSES TO IMPAIRED EXPRESSION  
OF THE *chrna4* AND *chrna7* GENES IN ADULT RATS  
WITHOUT AFFECTING ACETYLCHOLINE METABOLISM  
DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT**

**O. V. Vetrovoy\*, S. S. Potapova, V. A. Stratilov, and E. I. Tyulkova**

*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences,  
199034 Saint Petersburg, Russia; e-mail: vov210292@yandex.ru*

Previous studies have shown that the combined effect of fetal hypoxia and maternal stress hormones predetermines tendency to nicotine addiction in adulthood. This study in rats aimed to investigate the effect of prenatal severe hypoxia (PSH) on acetylcholine metabolism in the developing brain, as well as on expression of acetylcholine receptors *chrna4* and *chrna7* in both the developing brain and adult brain structures following nicotine consumption. In the developing brain of PSH rats, no changes were found in the activity of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) or disturbances in the acetylcholine levels. However, decreased *chrna4* expression was detected on the day 15 of pregnancy, while elevation in the *chrna7* expression was observed on the days 15 and 16 of embryogenesis. In adulthood, the consequences of PSH were manifested as decreased expression of *chrna4* in the medial prefrontal cortex (PFC), nucleus accumbens (NAcc), and hypothalamus (HT), decreased expression of *chrna7* in the PFC and hippocampus (HPC). Whereas, nicotine consumption did not decrease the expression levels of *chrna4* and *chrna7* compared to the control group in the adult PSH rats. Thus, prenatal hypoxia predisposes to impaired expression of the *chrna4* and *chrna7* genes in adult rats without affecting acetylcholine metabolism during embryonic development.

*Keywords:* rat, brain development, prenatal hypoxia, acetylcholine metabolism, *chrna4*, *chrna7*

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИМЕТИКИ НЕЙРОТРОФИНА-3, ОТЛИЧАЮЩИЕСЯ ПАТТЕРНОМ АКТИВАЦИИ ПОСТРЕЦЕПТОРНОГО СИГНАЛИНГА, ПО-РАЗНОМУ ОСЛАБЛЯЮТ ПРОЯВЛЕНИЯ СИНДРОМА ОТМЕНЫ МОРФИНА У КРЫС

© 2024 Л.Г. Колик\*, М.А. Константинопольский, С.В. Николаев,  
И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,  
125315 Москва, Россия; электронная почта: kolik\_lg@academpharm.ru

Поступила в редакцию 04.06.2024

После доработки 17.07.2024

Принята к публикации 18.07.2024

Накопленные данные позволяют предположить, что изменяющиеся уровни активности тирозинкиназных рецепторных сигнальных путей могут регулировать связанную с опиатами нейроадаптацию норадренергической системы. Нейротрофин-3 (NT-3) взаимодействует с тропомиозиновыми рецепторными киназами (TRK), связываясь преимущественно с TRKC-рецепторами, которые экспрессируются в норадренергических нейронах голубого пятна (*locus coeruleus*). Учитывая трудности доставки полноразмерных нейротрофинов в ЦНС при системном введении, синтезированы низкомолекулярные миметики четвертой петли NT-3, гексаметилендиамида бис-(N-моносукцинил-L-аспарагинил-L-аспарагина) (ГТС-301) и гексаметилендиамида бис-(N-γ-оксибутирил-L-глутамил-L-аспарагина) (ГТС-302), активирующие TRKC- и TRKB-рецепторы. Цель исследования – сравнительное изучение влияния дипептидных миметиков NT-3 на проявления признаков отмены морфина у беспородных белых крыс со сформированной опиатной зависимостью, а также особенностей активации миметиками пострецепторных сигнальных путей. Дипептиды ГТС-301 и ГТС-302 при однократном введении (в/б) в дозах 0,1, 1,0 и 10,0 мг/кг оказывали зависимое от дозы влияние на специфические показатели отмены морфина с наиболее эффективной дозой 1,0 мг/кг. Максимальное снижение суммарного индекса синдрома отмены морфина для ГТС-301 составило 31,3% и для ГТС-302 – 41,4%. В отличие от ГТС-301, ГТС-302 ослаблял индуцированную отменой морфина механическую аллодинию, снижая тактильную чувствительность. При исследовании активации пострецепторных сигнальных путей миметиками NT-3 на культуре гиппокампальных клеток НТ-22 показано, что они имеют разную картину пострецепторного сигналинга: ГТС-302 ( $10^{-6}$  М), подобно NT-3, активирует все три MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR и PLCγ1, в то время как ГТС-301 ( $10^{-6}$  М) – только MAPK/ERK и PLCγ1. Таким образом, выявленные особенности ослабления проявлений синдрома отмены морфина у крыс под действием ГТС-301 и ГТС-302 могут быть связаны с разным паттерном активации пострецепторных путей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** миметики нейротрофина-3, синдром отмены, морфин, крысы, MAPK/ERK, PI3K/AKT, PLCγ1, НТ-22.

DOI: 10.31857/S0320972524110105 EDN: IKLOMW

### ВВЕДЕНИЕ

Лекарственная зависимость нередко ассоциируется с мучительными симптомами отмены, которые пациенты испытывают при резком прекращении или быстром снижении дозы наркотических анальгетиков. Предполагается,

что соматический компонент лекарственной зависимости в большей степени связан с мезолимбическими областями мозга, голубым пятном (*locus coeruleus*, LC) и серой периакведуктальной зоной (*periaqueductal grey area*) [1, 2]. Гиперактивность и растормаживание норадренергических нейронов ствола головного мозга считаются ключевыми механизмами аверсивного состояния и многих соматических симптомов,

\* Адресат для корреспонденции.

возникающих во время острой опийной абстиненции [3].

Нейротрофин-3 (NT-3), принадлежащий к семейству нейротрофинов, взаимодействует с тропомиозинассоциированными протеинкиназами типа А, В и С (TRKA, TRKB и TRKC), связываясь преимущественно с TRKC-рецепторами, которые экспрессируются в норадренергических нейронах LC [4]. Известно, что LC экспрессирует высокие уровни NT-3 и TRKC [5, 6], а также NT-3 увеличивает выживаемость LC-нейронов *in vitro* [7]. Вовлеченность сигнальных путей TRKC в индуцированную опиатами адаптацию катехоламинергической системы была показана в экспериментах *in vitro* [7] и *in vivo* [8]. У трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих TRKC-рецепторы (TgNTRK3), была выявлена измененная частота спонтанного возбуждения нейронов LC и реакция норадренергической системы на хроническое воздействие опиатов, что, вероятно, связано со сдвигами в регуляции нейротрофинов [9]. Накопленные данные позволяют предположить, что изменяющиеся комбинации и уровень активности TRK-рецепторных сигнальных путей в нейронных цепях, которые взаимосвязаны с норадренергическими нейронами, могут регулировать и тонко настраивать связанные с опиатами адаптации норадренергической системы. Учитывая трудности доставки полноразмерных нейротрофинов в ЦНС при системном введении, в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» разрабатываются низкомолекулярные миметики NT-3, дизайн которых проводили с использованием авторской технологии создания дипептидных миметиков нейротрофинов [10]. Наиболее экспонированной является четвертая петля, фрагмент которой (-Ser91-Glu92-Asn93-Asn94-Lys95-Leu96-), предположительно, занимает геометрически наиболее выгодное положение для взаимодействия с рецептором. При конструировании соединения ГТС-301 дипептидный фрагмент (-Asn93-Asn94-) бета-поворот-подобного участка был сохранен, а предшествующий аминокислотный остаток Glu92 заменен на остаток янтарной кислоты. Димерную структуру нейротрофина воспроизводили с помощью гексаметилендиаминового спайсера по С-концу (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-аспарагинил-L-аспарагина) [11]. Другой миметик NT-3, соединение ГТС-302, сконструирован на основе этого же фрагмента четвертой петли,

но со сдвигом на один аминокислотный остаток влево относительно (-Asn93-Asn94-), при этом дипептидный участок (-Glu92-Asn93-) сохраняли, а предшествующий аминокислотный остаток Ser91 заменили остатком гамма-оксимасляной кислоты; димеризацию вели также с помощью гексаметилендиамина (гексаметилендиамид бис-(N- $\gamma$ -оксибутирил-L-глутамил-L-аспарагина)) [12]. Цель исследования – сравнительное изучение влияния миметиков четвертой петли NT-3 на проявление признаков отмены морфина у животных со сформированной опиатной зависимостью, а также особенностей активации миметиками пострецепторных сигнальных путей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Эксперименты *in vivo*.** Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах с массой тела 230–250 г ( $n = 112$ ) (ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая»). Животных содержали по 8 особей в клетке в условиях вивария ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (температура – 21–23 °C; относительная влажность воздуха – 40–60%) при естественной освещенности и свободном доступе к воде и брикетированному корму в течение 10 суток до начала тестирования.

**Препараты.** Морфина гидрохлорид (Минмедбиопром объединение «Чимкентбиофарм», субстанция) растворяли в дистиллированной воде для инъекций и вводили внутрибрюшинно (в/б) из расчета 0,1 мл/100 г массы тела крысы. Синтезированные в отделе химии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» ГТС-301 (температура плавления – 214–229 °C (с разложением);  $[\alpha]_D^{22} = 20,2^\circ$  (с = 1, DMSO)) и ГТС-302 (температура плавления – 173–178 °C (с разложением);  $[\alpha]_D^{23} = 7,76^\circ$  (с = 1, DMSO)) [11] вводили в/б в виде суспензии в 1%-ном водном растворе Tween 80 из расчета 0,1 мл/100 г массы животного.

**Методика формирование опиатной зависимости и оценка соматических проявлений синдрома отмены морфина.** У крыс вырабатывали зависимость от морфина и оценивали поведение на наличие специфических признаков синдрома отмены (СО) в соответствии со схемой, описан-

Принятые сокращения: СИ – суммарный индекс; СО – синдром отмены; АКТ – протеинкиназа В; ERK – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами; LC – голубое пятно; МАРК – митогенактивируемая протеинкиназа; mTOR – рапамициновый комплекс 1; NT-3 – нейротрофин-3; Р1ЗК – фосфатидилинозитол-3-киназа; PLC – фосфолипаза С; TRKA, TRKB, TRKC – тропомиозинассоциированные протеинкиназы типа А, В и С соответственно.

**Таблица 1.** Специфические признаки синдрома отмены морфина у крыс

Признаки абстиненции	Оценка	Признаки абстиненции	Оценка
Диарея	баллы 1–5	судороги	да/нет
Скрежет зубами	кол-во эпизодов	стереотипия	да/нет
Отряхивания по типу «мокрой собаки»	кол-во эпизодов	вокализация	да/нет
Попытки бегства	да/нет	жевание	да/нет
Уринация	да/нет	носовое кровотечение	да/нет
Нарушение позы	да/нет	ринорея	да/нет
Пилоэрекция	да/нет	встряхивания головой	да/нет
Диспноэ	да/нет	встряхивания лапами	да/нет
Птоз	да/нет	корчи	да/нет

Примечание. Среднее значение выраженности СО в контрольной группе (группа «0,0») принимали за 100%.

ной ранее [13]. Для получения животных, зависимых от морфина, препарат вводили животным в возрастающих дозах (10–20 мг/кг) 2 раза в день с промежутком в 8 ч в течение 5 суток: 1-е сутки – 10 и 10 мг/кг; 2-е сутки – 10 и 20 мг/кг; 3-и сутки – 20 и 20 мг/кг; 4-е сутки – 20 и 20 мг/кг; 5-е сутки – 20 мг/кг. На 5-й день эксперимента через 5 ч после последней инъекции морфина вводили ГТС-301 и ГТС-302 в дозах 0,1, 1,0 и 10,0 мг/кг (в/б), а животным из контрольных групп (группы «0,0») – воду для инъекций, содержащую 1% (v/v) Tween 80, в эквивалентном объеме за 60 мин до тестирования. Тестирование животных на наличие специфических признаков СО морфина проводили в течение 5 мин в «открытом поле» (освещенная круглая аrena диаметром 80 см) через 15 мин после введения антагониста опиатных рецепторов налоксона («Du Pont De Nemours Int.», Швейцария) в дозе 1,0 мг/кг (в/б). Для всех групп регистрировали специфические признаки СО морфина. Суммарный индекс (СИ) выраженности СО для каждого животного и средние значения для опытных и контрольных групп рассчитывали на основании альтернативных признаков (наличие признака – 1 балл, отсутствие признака – 0 баллов), всего регистрировали 18 признаков СО, у каждого животного отмечали свой индивидуальный набор признаков (табл. 1).

**Оценку изменений тактильной чувствительности** у крыс выполняли, используя стандартный набор из 20 нейлоновых монофиламентов (филаменты фон Фрея – «von Frey filaments set»; «Ugo Basile», Италия). В ходе тестирования отдельный филамент через сетчатую поверхность платформы прикладывали к поверхности задних лап крысы в течение 1–2 с, отдергивание или сме-

щение лапы считали положительной реакцией. Пороговый уровень тактильного стимула определяли по его наименьшему значению, вызывавшему реакцию у крыс, в соответствии с градуировкой в граммах, указанной на каждом филаменте. В ходе исследования процедуру тестирования проводили дважды: в день, предшествующий первому дню введения морфина, и через 24 ч после отмены морфина [13].

**Эксперименты *in vitro*. Культивирование клеток.** Эксперименты проводились на клетках гиппокампа мыши линии НТ-22 (из клеточного банка Уtrechtского университета, Голландия). Все манипуляции с клетками выполнялись в строго стерильных условиях. Клетки культивировали при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в среде ДМЕМ (среда Игла, модифицированная по методу Дульбекко; «HyClone», США) [14], содержащей 5% FBS (фетальная бычья сыворотка; «Gibco», США) и 2 mM L-глутамина («ICN Pharmaceuticals», США). Смену культуральной среды производили через 24 ч после рассева и каждые последующие 2–3 дня. Пересев на культуральные флаконы площадью 75 см<sup>2</sup> («ТРР», Швейцария) осуществляли 3 раза в неделю.

**Вестерн-блот-анализ.** Пробы лизировали в 50 mM Tris-HCl (рН 7,5), содержащем 5 mM ЭДТА, 1 mM дитиотреитола, 1% (w/v) Triton X-100, через 5, 15, 30, 60 и 180 мин после внесения NT-3 (10<sup>-9</sup> M) («Sigma», США), или ГТС-301 (L,L) (10<sup>-6</sup> M), или ГТС-302 (L,L) (10<sup>-6</sup> M). NT-3 (10<sup>-9</sup> M) использовали в качестве положительного контроля. Нефосфорилированные протеинкиназы В (АКТ), киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK1/ERK2) и фосфолипаза С (PLCγ1) были использованы в качестве контроля загрузки.

Содержание белков исследовали в цитозольной фракции. Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Фолина–Лоури [15]. На дорожку в геле наносили 75 мкг белка. Белки разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле с использованием электрофоретической системы Mini-Protean Tetra Cell («Bio-Rad», США) [16]. Далее, белки переносили на мембрану PVDF («Santa Cruz», США) в системе для переноса Trans-Blot Turbo («Bio-Rad»). Преинкубацию всех вестерн-блотов проводили в буфере TBS-T (20 мМ Tris-HCl, 137 мМ NaCl, 1% (v/v) Tween 20; pH = 7,5), содержащем 3% (w/v) BSA («Bio-Rad»), в течение 1 ч с использованием первичных антител anti-p-AKT (#PA5-104445; «Invitrogen, ThermoFisher», США), anti-p-ERK1/ERK2 (#PA5-37828; «Invitrogen, ThermoFisher»), anti-p-PLC $\gamma$ 1 (#2821S; «Cell Signaling Technology», США), против AKT (#PA5-77855; «Invitrogen, ThermoFisher»), ERK1/ERK2 (#61-7400; «Invitrogen, ThermoFisher») и PLC $\gamma$ 1 (#2822S; «Cell Signaling Technology») в разведении 1 : 1000 в течение ночи при +4 °C. Затем, после отмычки в буфере TBS-T, содержащем 0,05% (w/v) BSA, мембранны инкубировали в присутствии вторичных антител goat anti-rabbit IgG (#31460; «Thermo Fisher Scientific»), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1 : 1000) в течение 1 ч. Детектирование белков осуществляли после отмычки от вторичных антител в буфере с ECL-реагентами (#32106; Pierce ECL WB Substrate («ThermoFisher», США)) с использованием гель-документирующей системы Alliance («UVITEC», Великобритания). Денситометрию полученных изображений проводили с помощью программы GIMP2.

**Статистический анализ** в опытах *in vivo* проводили при помощи программы Statistica 10, описательной статистики, однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), ANOVA для повторных измерений для зависимых групп; в опытах *in vitro* – с использованием U-критерия Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты показывают, что ГТС-301 и ГТС-302 (рис. 1) оказывали зависимое от дозы влияние на специфические признаки отмены морфина у крыс. В сравнении с контрольной группой (группа «0,0»), снижение суммарного индекса СО морфина для группы «ГТС-301; 0,1 мг/кг» составило 12% ( $F_{(1,14)} = 4,66$ ;  $p < 0,05$ ); для группы «ГТС-301; 1,0 мг/кг» – 31,3% ( $F_{(1,14)} = 9,14$ ;  $p < 0,01$ ); для группы «ГТС-301; 10,0 мг/кг» – 26,5% ( $F_{(1,14)} = 21,44$ ;  $p < 0,001$ ). Для группы «ГТС-302; 0,1 мг/кг» падение СИ СО составило 26,9% ( $F_{(1,14)} = 10,19$ ;  $p < 0,01$ ); для группы «ГТС-302; 1,0 мг/кг» – 41,4% ( $F_{(1,14)} = 12,49$ ;

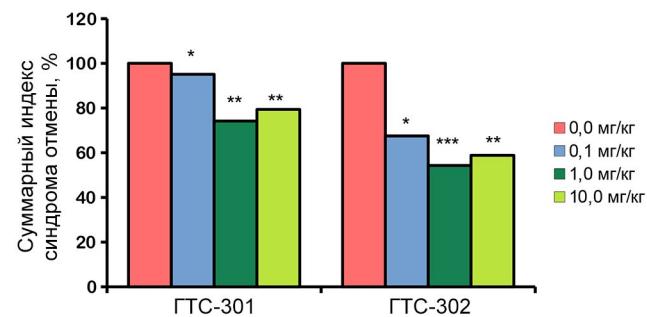


Рис. 1. Влияние миметиков четвертой петли нейротрофина-3 на суммарный индекс наркотик-индированных синдрома отмены морфина у беспородных крыс-самцов (в % от контроля). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – достоверное отличие от контроля (группа «0,0»); в каждой группе по 8 животных, данные представлены в виде среднего значения ± стандартной ошибки среднего (M ± SEM)

$p < 0,01$ ) и для группы «ГТС-302; 10,0 мг/кг» – 36,5% ( $F_{(1,14)} = 25,64$ ;  $p < 0,001$ ). Эффект миметиков NT-3 наиболее выражен в дозе 1,0 мг/кг. Оценивая коррекцию отдельных показателей СО морфина, следует отметить характерное для ГТС-301 снижение диареи во всех изученных дозах, устранение нарушения позы, птоза, встрихивания лапами, вокализации и ринореи (табл. 2). Для ГТС-302 регистрировали снижение выраженности или полное устранение таких показателей, как диарея, нарушение позы, скрежет зубами, отряхивания по типу «мокрой собаки», вокализация, встрихивания головой и лапами (табл. 3).

В целом, ГТС-301 и ГТС-302 ослабляли 7 из 18 анализируемых признаков СО морфина, при этом наибольшее снижение суммарного индекса СО (41,1%) наблюдалось у ГТС-302 в дозе 1,0 мг/кг (табл. 3).

К основным клиническим проявлениям опийного абстинентного синдрома, помимо вегетативных нарушений (зевота, ринорея, слезотечение, диарея, расширение зрачка, пилоэрекция и др.), часто присоединяются болевой синдром и гиперестезия, которые считаются важными диагностическими признаками, относящимися к категории расстройств, наиболее тяжело переживаемых пациентами. В дополнительной серии опытов изучено влияние ГТС-301 и ГТС-302 на пороги тактильной чувствительности в условиях отмены морфина у зависимых крыс. При предварительном тестировании (пре-тест) животных с помощью филаментов фон Фрея показано, что крысы, в частности, не отличались статистически значимо по исходному уровню чувствительности к механическому тактильному воздействию: для ГТС-301 –  $F_{(3,28)} = 0,957$ ,  $p = 0,426$ ; для ГТС-302 –  $F_{(3,28)} = 1,159$ ,  $p = 0,342$ . В условиях моделирования отмены морфина в контрольной и в опытных

**Таблица 2.** Влияние ГТС-301 на отдельные признаки отмены морфина

Поведенческие признаки	ГТС-301, дозы, мг/кг			
	0,0	0,1	1,0	10,0
Диарея	4,13 ± 0,30	2,50 ± 0,60*	2,50 ± 0,70*	1,87 ± 0,77*
Нарушение позы	0,87 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,75 ± 0,16	0,38 ± 0,18*
Птоз	0,38 ± 0,18	0,00 ± 0,00*	0,25 ± 0,16	0,25 ± 0,16
Скрежет зубами	1,13 ± 0,78	1,75 ± 0,88	0,13 ± 0,12*	0,50 ± 0,50
Отряхивания по типу «мокрой собаки»	2,50 ± 1,12	1,00 ± 0,42	1,00 ± 0,53	0,75 ± 0,52
Вокализация	0,50 ± 0,19	0,62 ± 0,18	0,13 ± 0,12*	0,75 ± 0,16
Встряхивания головой	0,50 ± 0,19	0,38 ± 0,18	0,25 ± 0,16	0,25 ± 0,16
Встряхивания лапами	0,75 ± 0,16	0,25 ± 0,16*	0,38 ± 0,18	0,13 ± 0,13**
Ринорея	1,00 ± 0,00	0,88 ± 0,12	0,38 ± 0,18**	0,38 ± 0,18**

Примечание. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  – достоверное отличие от контроля (группа «0,0»); в каждой группе по 8 животных, данные представлены в виде среднего значения ± стандартной ошибки среднего ( $M \pm SEM$ ).

**Таблица 3.** Влияние ГТС-302 на отдельные признаки отмены морфина

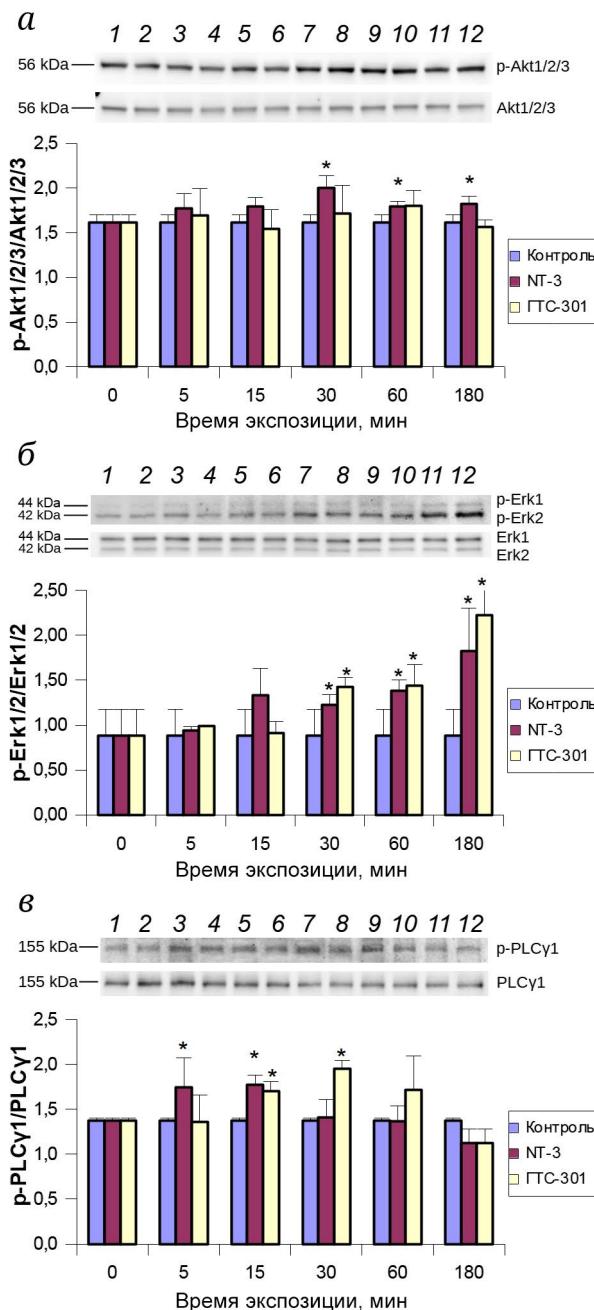
Поведенческие признаки	ГТС-302, дозы, мг/кг			
	0,0	0,1	1,0	10,0
Диарея	3,10 ± 0,71	3,9 ± 0,22	1,60 ± 0,70	1,50 ± 0,59
Нарушение позы	1,00 ± 0,00	0,25 ± 0,16***	0,25 ± 0,16***	0,38 ± 0,18**
Птоз	0,38 ± 0,18	0,37 ± 0,18	0,25 ± 0,16	0,13 ± 0,11
Скрежет зубами	1,88 ± 0,81	0,25 ± 0,25*	0,50 ± 0,50	0,13 ± 0,13*
Отряхивания по типу «мокрой собаки»	0,70 ± 0,15	0,25 ± 0,25	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
Вокализация	0,65 ± 0,17	0,63 ± 0,18	0,13 ± 0,11*	0,49 ± 0,17
Встряхивания головой	0,75 ± 0,16	0,61 ± 0,18	0,13 ± 0,13**	0,50 ± 0,19
Встряхивания лапами	0,75 ± 0,16	0,25 ± 0,16*	0,38 ± 0,18	0,25 ± 0,16*
Ринорея	0,62 ± 0,18	0,38 ± 0,18	0,50 ± 0,19	0,88 ± 0,12

Примечание. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – достоверное отличие от контроля (группа «0,0»); в каждой группе по 8 животных, данные представлены в виде среднего значения ± стандартной ошибки среднего ( $M \pm SEM$ ).

группах с ГТС-301 наблюдалось значительное снижение порога чувствительности по сравнению с исходными значениями ( $F_{(3,28)} = 4,078$ ;  $p = 0,0002$ ), что согласуется с ранее опубликованными данными [13]. Однако ГТС-301 в изученных дозах при однократном введении не влиял на сформированную при отмене морфина механическую аллодинию. При оценке эффективности ГТС-302 показано, что при отмене морфина в контролль-

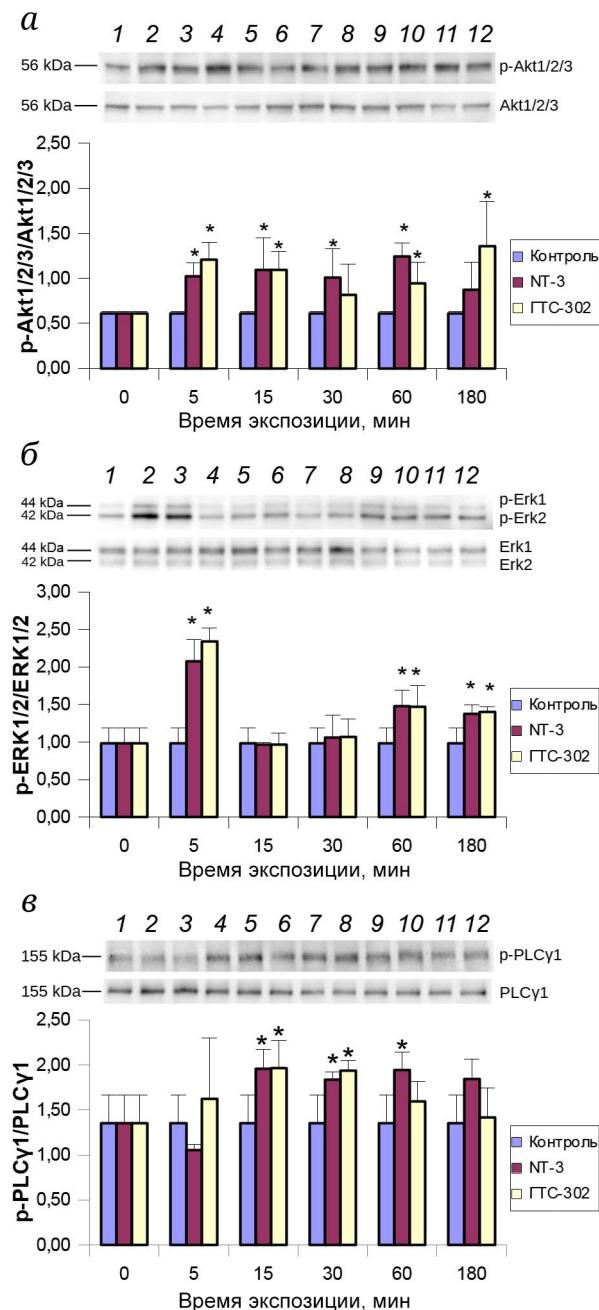
ной и опытных группах происходит значительное снижение порога чувствительности по сравнению с исходным уровнем (пре-тест) ( $F_{(3,28)} = 5,125$ ;  $p = 0,0059$ ). В отличие от ГТС-301, ГТС-302 при остром введении дозозависимо увеличивал порог реакции во всех изученных дозах с максимально эффективной дозой 1,0 мг/кг, при которой отмечалось повышение регистрируемого показателя в 3 раза по сравнению с контрольной группой

( $F_{(1,14)} = 17,42; p = 0,009$ ). Тем не менее уровень тактильной чувствительности оставался во всех опытных группах ниже, чем при предварительном (пре-тест) тестировании (табл. 4).



**Рис. 2.** Фосфорилирование AKT1/2/3 (а), ERK1/2 (б), PLC $\gamma$ 1 (в) после внесения NT-3 и GTC-301 ( $10^{-6}$  М) в культуру клеток гиппокампа мыши линии НТ-22 (оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии). Дорожки: 1, 6 – Контроль; 2 – GTC-301, 5 мин; 3 – NT-3, 5 мин; 4 – GTC-301, 15 мин; 5 – NT-3, 15 мин; 7 – GTC-301, 30 мин; 8 – NT-3, 30 мин; 9 – GTC-301, 60 мин; 10 – NT-3, 60 мин; 11 – GTC-301, 180 мин; 12 – NT-3, 180 мин. Данные представлены в виде среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ) трех независимых экспериментов; \*  $p < 0,05$  – достоверное отличие от контроля

Фармакологические преимущества ГТС-302 перед ГТС-301, выявленные при моделировании опиоидной зависимости *in vivo*, могут быть обусловлены особенностями активации пострецеп-



**Рис. 3.** Фосфорилирование AKT1/2/3 (а), ERK1/2 (б), PLC $\gamma$ 1 (в) после внесения NT-3 и GTC-302 ( $10^{-6}$  М) в культуру клеток гиппокампа мыши линии НТ-22 (оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии). Дорожки: 1, 6 – Контроль, 2 – GTC-302, 5 мин; 3 – NT-3, 5 мин; 4 – GTC-302, 15 мин; 5 – NT-3, 15 мин; 7 – GTC-302, 30 мин; 8 – NT-3, 30 мин; 9 – GTC-302, 60 мин; 10 – NT-3, 60 мин; 11 – GTC-302, 180 мин; 12 – NT-3, 180 мин. Данные представлены в виде среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ) трех независимых экспериментов; \*  $p < 0,05$  – достоверное отличие от контроля

**Таблица 4.** Влияние ГТС-302 на пороги тактильной чувствительности у крыс при механическом раздражении стопы

Группы	Дозы, мг/кг			
	0,0	0,1	1,0	10,0
Пре-тест	1,35 ± 0,15	1,23 ± 0,14	1,05 ± 0,14	1,05 ± 0,09
Тест	0,040 ± 0,005***	0,060 ± 0,005***,##	0,12 ± 0,02***,##	0,08 ± 0,01***,##

Примечание. Число животных в каждой группе – 8; \*\*\*  $p < 0,001$  – достоверное отличие от группы «Пре-тест»; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  – достоверное отличие от группы контроль. Данные представлены в граммах в виде среднего значения ± стандартной ошибки среднего (M ± SEM).

торных сигнальных путей. Поэтому была исследована активация сигнальных путей PI3K/AKT, MAPK/ERK, PLC $\gamma$ 1 миметиками ГТС-301 и ГТС-302 на культуре гиппокампальных клеток НТ-22. ГТС-301 ( $10^{-6}$  М) и ГТС-302 ( $10^{-6}$  М) вносили в культуральную среду в виде стерильного раствора в эффективных концентрациях, установленных в экспериментах по нейропротекторному действию этих соединений на культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22 [17, 12]. В качестве положительного контроля использовали NT-3 ( $10^{-9}$  М). Клетки лизировали через 5, 15, 30, 60 и 180 мин после внесения пептидов.

Хотя ранее нами было показано, что оба миметика активируют TRKB- и TRKC-рецепторы, оказалось, что при этом они имеют разную картину пострецепторного сигналинга: ГТС-302 ( $10^{-6}$  М), подобно NT-3, активирует все три MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR и PLC $\gamma$ 1, в то время как ГТС-301 ( $10^{-6}$  М) – только MAPK/ERK- и PLC $\gamma$ 1-сигнальные пути. Как видно из рис. 2 и 3, достоверное увеличение фосфорилирования AKT-киназ наблюдалось через 5, 15, 60 и 180 мин после внесения ГТС-302 ( $10^{-6}$  М), через 5, 15, 30 и 60 мин после внесения NT-3; достоверное увеличение фосфорилирования Erk-киназ под действием ГТС-302 – через 5, 60 и 180 мин, под действием ГТС-301 – через 30, 60 и 180 мин. Сигнальный путь PLC $\gamma$ 1 активировался через 15 и 30 мин после внесения и ГТС-302, и ГТС-301.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При моделировании лекарственной зависимости от морфина у крыс наркотон в низких дозах провоцирует возникновение общего негативного аффективного состояния (мотивационный компонент), а в высоких дозах – проявление соматических признаков отмены [18], что и было продемонстрировано в данной работе: при использовании наркотона в дозе 1 мг/кг через 15 мин у крыс наблюдали развитие сомато-вегетативных нарушений, характерных для опийного абстинент-

ного синдрома. Ранее в опытах *in vitro* показано, что обработка нейронов LC морфином приводила к снижению поглощения норадреналина на 20% и уменьшению на 12% количества тирозингидроксилазных-иммунореактивных (TH+) клеток, а при введении в культуру клеток NT-3 отмечалось увеличение захвата норадреналина и числа клеток TH+ [7]. В опытах *ex vivo* инфузия NT-3 непосредственно в центральную тегментальную область крысам предотвращала биохимические изменения в мезолимбической дофаминергической системе, возникающие при продолжительном действии морфина [19]. Несмотря на изменение уровней мРНК NT-3 и TRKC в нескольких областях мозга во время отмены опиатов, доказательств роли NT-3 в развитии опиоидной абстиненции *in vivo* крайне мало. У мышей с условной аблацией NT-3 в головном мозге соматические симптомы отмены опиатов ослаблялись в сочетании со сниженной экспрессией тирозингидроксилазы в LC [20]. Отмена опиатов приводила к значительному снижению в LC уровней мРНК NT-3 через 20 и 70 ч после отмены морфина, при этом уровни мРНК TRKC были также ниже контрольных значений [4]. Нельзя исключить, что миметики NT-3 могут обладать определенными преимуществами при использовании в качестве средств для быстрой фармакотерапии опийного абстинентного синдрома.

В настоящей работе впервые в опытах *in vivo* показано, что дипептидные миметики NT-3 при системном однократном введении статистически значимо ослабляли проявления соматических признаков спровоцированной наркотоном отмены морфина у крыс, что согласуется с представлениями об участии нейротрофинов в механизмах, ассоциируемых с формированием зависимости от опиатов [21]. С помощью метода гибридизации *in situ* еще в 1995 г. было показано, что отдельные нейроны ЦНС могут совместно экспрессировать мРНК для высокоаффинных рецепторов NT-3, TRKB- и TRKC-рецепторов [22]. Способность ГТС-301 и ГТС-302 активировать, подобно полноразмерному нейротрофину, два типа рецепторов (TRKB

и TRKC) на клетках гиппокампа НТ-22 при моделировании окислительного стресса [17, 12] позволяет предположить высокий уровень регуляторной активности низкомолекулярных миметиков NT-3 при патологических состояниях, возникающих при отмене психоактивных веществ, включая наркотические анальгетики. Соединения ГТС-301 и ГТС-302 статистически значимо ослабляли 7 из 18 признаков отмены морфина, однако при остром системном введении ГТС-302 вызывал не только наибольшее снижение суммарного индекса синдрома отмены, но и дозозависимо ослаблял механическую аллодинию у крыс со сформированной лекарственной зависимостью, что не исключает наличие взаимосвязи «структура–свойства».

В настоящей работе впервые показаны различия в паттернах активации миметиками NT-3 пострецепторных путей при взаимодействии с TRK-рецепторами. Особенностью ГТС-302 является способность активировать внутриклеточные каскады, подобно NT-3, тогда как ГТС-301 не проявлял активности в отношении сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. Известно, что PI3K/AKT/mTOR ингибирует рапамициновый комплекс 1 (mTOR), изменение функционирования которого установлено при злоупотреблении психоактивными веществами [23]. В работе Zhu et al. [24], опубликованной в 2021 г., была раскрыта возможная роль сигнального пути PI3K/AKT/mTOR при героиновой зависимости, поскольку авторами была показана вовлеченность фосфорилирования PI3K/AKT/mTOR в прилежащем ядре в формировании поведения, связанного с поиском героина, у крыс. Анализ экспрессии генов продемонстрировал статистическое увеличение экспрессии mTOR при снижении уровней экспрессии AKT, а также PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа) среди пациентов с героиновой зависимостью, по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,001$ ), при этом наблюдался недостаточный уровень фосфорилирования PI3K и AKT, а в некоторых случаях – избыточная экспрессия mTOR ( $p < 0,001$ ) [25].

Следует отметить, что нейропротекторные свойства в отношении ослабления механической аллодинии в условиях гипергликемии могут быть реализованы в том числе за счет фосфорилирования AKT, а также ее нижестоящего фактора-мишени mTOR, то есть повышение жизнеспособности шванновских клеток, по-видимому, опосредуется через сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR [26]. Однако в другой работе антагонист рецептора опиоидного пептида ноцицептина (NOP), также известный как receptor ноцицептина/орфанина FQ (N/OFQ), облегчал механическую аллодинию, связанную с вызванной химиотерапией нейропатической болью, за счет ингибиции увеличенной под действием паклитаксела экспрессии

PI3K и фосфо-AKT в дорсальном корневом ганглии [27]. В целом, роль PI3K, идентифицированной в проявлении центральной сенсибилизации после воздействия вредных стимулов, остается до конца неясной в проявлении отдельных симптомов опиатной зависимости. Однако выявленная нами способность ГТС-302 не только копироровать основные проявления синдрома отмены морфина, но и заметно ослаблять механическую аллодинию у крыс со сформированной лекарственной зависимостью позволяет предположить, что эти эффекты миметика NT-3 могут быть обусловлены вовлечением активации сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, в том числе и в процессы центральной сенсибилизации. Данный факт требует дальнейшего изучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые экспериментально доказана способность низкомолекулярных миметиков нейротрофина-3 снижать проявления синдрома отмены морфина у крыс с опиатной зависимостью, при этом фармакологически более значимый эффект наблюдается у миметика, который, подобно полноразмерному нейротрофину, активирует все три основных пострецепторных сигнальных каскада: PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLCγ1.

**Вклад авторов.** Л.Г. Колик – руководство работой, обсуждение результатов исследования, написание текста; М.А. Константинопольский – проведение экспериментов *in vivo*, статистическая обработка данных; С.В. Николаев – проведение экспериментов *in vitro*, редактирование текста и рисунков; И.О. Логвинов – проведение экспериментов *in vitro*, биохимические исследования; Т.А. Антипова – статистическая обработка данных и обсуждение полученных результатов исследования *in vitro*, написание текста; Т.А. Гудашева – концепция и обсуждение результатов исследования.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (тема № FGFG-2022-0002 «Доклиническая оценка безопасности лекарств и экспериментальная разработка средств для здоровье-сбережения и профилактики заболеваний, обусловленных взаимодействием организма с неблагоприятными факторами окружающей среды»).

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

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам и одобрены Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

(Протокол № 01 от 02 февраля 2023 года). Содержание животных соответствовало межгосударственным стандартам серии «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными»

ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 (Приложение А к Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123)).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frenois, F., Cador, M., Caillé, S., Stinus, L., and Le Moine, C. (2002) Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal, *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 1377-1389, <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02187.x>.
2. Alvarez-Bagnarol, Y., Marchette, R. C. N., Francis, C., Morales, M. M., and Vendruscolo, L. F. (2022) Neuronal correlates of hyperalgesia and somatic signs of heroin withdrawal in male and female mice, *eNeuro*, **9**, ENEURO.0106-22.2022, <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0106-22.2022>.
3. Maldonado, R. (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **21**, 91-104, [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(95\)00061-5](https://doi.org/10.1016/0149-7634(95)00061-5).
4. Numan, S., Lane-Ladd, S. B., Zhang, L., Lundgren, K. H., Russell, D. S., Seroogy, K. B., and Nestler, E. J. (1998) Differential regulation of neurotrophin and TRK receptor mRNAs in catecholaminergic nuclei during chronic opiate treatment and withdrawal, *J. Neurosci.*, **18**, 10700-10708, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-24-10700.1998>.
5. Smith, M. A., Makino, S., Altemus, M., Michelson, D., Hong, S. K., Kvettansky R, and Post, R. M. (1995) Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3 mRNA expression in the locus coeruleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 8788-8792, <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8788>.
6. Zhang, C., Guo, Y. Q., Qiao, J. T., and Dafny, N. (1998) Locus coeruleus modulates thalamic nociceptive responses via adrenoceptors, *Brain Res.*, **784**, 116-122, [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01197-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01197-9).
7. Sklair-Tavron, L., and Nestler, E. J. (1995) Opposing effects of morphine and the neurotrophins, NT-3, NT-4, and BDNF, on locus coeruleus neurons *in vitro*, *Brain Res.*, **702**, 117-125, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01029-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01029-8).
8. Sklair-Tavron, L., Shi, W. X., Lane, S. B., Harris, H. W., Bunney, B. S., and Nestler, E. J. (1996) Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11202-11207, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11202>.
9. Gallego, X., Murtra, P., Zamalloa, T., Canals, J. M., Pineda, J., Amador-Arjona, A., Maldonado, R., and Dierssen, M. (2010) Increased opioid dependence in a mouse model of panic disorder, *Front. Behav. Neurosci.*, **3**, 60, <https://doi.org/10.3389/neuro.08.060.2009>.
10. Gudasheva, T. A., Povarnina, P. Y., Tarasiuk, A. V., and Seredenin, S. B. (2021) Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: design and pharmacological properties, *Med. Res. Rev.*, **41**, 2746-2774, <https://doi.org/10.1002/med.21721>.
11. Sazonova, N. M., Tarasiuk, A. V., Melnikova, M. V., Zhanataev I. A., Logvinov, I. O., Nikolaev, S. V., Nikiforov, D. M., Antipova, T. A., Povarnina, P. Yu., Gudasheva, T. A., and Seredenin, S. B. (2024). Stereospecificity of the cytoprotective and antidepressant-like activities of GTS-301, a dimeric dipeptide mimetic of neurotrophin-3, *Pharmaceut. Chem. J.*, **57**, 1888-1897, <https://doi.org/10.1007/s11094-024-03093-2>.
12. Tarasiuk, A. V., Sazonova, N. M., Melnikova, M. V., Pomogaybo, S. V., Logvinov, I. O., Nikolaev, S.V., Nikiforov, D. M., Antipova, T. A., Povarnina, P. Yu., Vakhitova, Yu. V., Gudasheva, T. A., and Seredenin, S. B. (2023) Design and synthesis of a novel dipeptide mimetic of the 4th loop of neurotrophin-3 and its pharmacological effects, *Mendeleev Commun.*, **33**, 786-789, <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2023.10.016>.
13. Kolik, L. G., and Konstantinopolsky, M. A. (2019) Comparative assessment of the effectiveness of noncompetitive NMDA receptor antagonists amantadine and hemantane in morphine withdrawal syndrome model, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **166**, 739-743, <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04430-2>.
14. Freshney, R. I. (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Wiley.
15. Noble, J. E., and Bailey, M. J. A. (2009) Chapter 8 Quantitation of Protein. B, in *Methods in Enzymology*, Elsevier, pp. 73-95.
16. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354, <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.
17. Gudasheva, T. A., Sazonova, N. M., Tarasiuk, A. V., Logvinov, I. O., Antipova, T. A., Nikiforov, D. M., Povarnina, P. Yu., and Seredenin, S. B. (2022) The first dipeptide mimetic of neurotrophin-3: design and pharmacological properties, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **505**, 160-165, <https://doi.org/10.1134/S1607672922040032>.

18. Fdez Espejo, E., Cador, M., and Stinus, L. (1995) Ethopharmacological analysis of naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome in rats: a newly-developed “etho-score”, *Psychopharmacology (Berl)*, **122**, 122-130, <https://doi.org/10.1007/BF02246086>.
19. Berhow, M. T., Russell, D. S., Terwilliger, R. Z., Beitner-Johnson, D., Self, D. W., Lindsay, R. M., and Nestler, E. J. (1995) Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system, *Neuroscience*, **68**, 969-979, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00207-y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00207-y).
20. Akbarian, S., Bates, B., Liu, R. J., Skirboll, S. L., Pejchal, T., Coppola, V., Sun, L. D., Fan, G., Kucera, J., Wilson, M. A., Tessarollo, L., Kosofsky, B. E., Taylor, J. R., Bothwell, M., Nestler, E. J., Aghajanian, G. K., and Jaenisch, R. (2001) Neurotrophin-3 modulates noradrenergic neuron function and opiate withdrawal, *Mol. Psychiatry*, **6**, 593-604, <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000897>.
21. Kolik, L. G., Konstantinopolsky, M. A., Nadorova, A. V., Kruglov, S. V., Antipova, T. A., Gudasheva, T. A., and Seredenin, S. B. (2020) Peptide mimetic of BDNF loop 4 blocks Behavioral signs of morphine withdrawal syndrome and prevents the increase in ΔFosB level in the striatum of rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **170**, 30-34, <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04998-0>.
22. Kokaia, Z., Metsis, M., Kokaia, M., Elmér, E., and Lindvall, O. (1995) Co-expression of TRKB and TRKC receptors in CNS neurones suggests regulation by multiple neurotrophins, *Neuroreport*, **6**, 769-772, <https://doi.org/10.1097/00001756-199503270-00016>.
23. Ucha, M., Roura-Martínez, D., Ambrosio, E., and Higuera-Matas, A (2020) The role of the mTOR pathway in models of drug-induced reward and the behavioral constituents of addiction, *J. Psychopharmacol. (Oxf)*, **34**, 1176-1199, <https://doi.org/10.1177/0269881120944159>.
24. Zhu, H., Zhuang, D., Lou, Z., Lai, M., Fu, D., Hong, Q., Liu, H., and Zhou, W. (2021) AKT and its phosphorylation in nucleus accumbens mediate heroin-seeking behavior induced by cues in rats, *Addict Biol.*, **26**, e13013, <https://doi.org/10.1111/adb.13013>.
25. Khalifa, F. N., Hussein, R. F., Mekawy, D. M., Elwi, H. M., Alsaeed, S. A., Elnawawy, Y., and Shaheen, S. H. (2024) Potential role of the lncRNA “HOTAIR”/miRNA “206”/BDNF network in the alteration in expression of synaptic plasticity gene arc and BDNF level in sera of patients with heroin use disorder through the PI3K/AKT/mTOR pathway compared to the controls, *Mol. Biol. Rep.*, **51**, 293, <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09265-3>.
26. Zhang, X., Liang, Z., Zhou, Y., Wang, F., Wei, S., Tan, B., and Guo, Y. (2023) Artesunate inhibits apoptosis and promotes survival in Schwann cells via the PI3K/AKT/mTOR axis in diabetic peripheral neuropathy, *Biol. Pharm. Bull.*, **46**, 764-772, <https://doi.org/10.1248/bpb.b22-00619>.
27. Huang, J., Chen, D., Yan, F., Wu, S., Kang, S., Xing, W., Zeng, W., and Xie, J. (2020) JTC-801 alleviates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain through the PI3K/AKT/mTOR pathway, *Eur. J. Pharmacol.*, **883**, 173306, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173306>.

## LOW MOLECULAR WEIGHT NEUROTROPHIN-3 MIMETICS, DISTINCT IN THE PATTERN OF ACTIVATION OF POSTRECEPTOR SIGNALING, ATTENUATE THE MANIFESTATIONS OF MORPHINE WITHDRAWAL IN RATS IN DIFFERENT WAYS

**L. G. Kolik\*, M. A. Konstantinopolsky, S. V. Nikolaev, I. O. Logvinov,  
T. A. Antipova, and T. A. Gudasheva**

*FSBI “Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies”,  
125315 Moscow, Russia; e-mail: kolik\_lg@academpharm.ru*

The accumulated data suggest that changing activity levels of tyrosine kinase receptor signaling pathways may regulate opiate-related neuroadaptation of the noradrenergic system. Neurotrophin-3 (NT-3) interacts with tropomyosin receptor kinases (TRK), binding predominantly to TRKC receptors, which are expressed in noradrenergic neurons of locus coeruleus. Taking into account the difficulties of delivering full-size neurotrophins to the CNS after systemic administration, low-molecular mimetics of the 4th loop of NT-3, hexamethylenediamide bis-(N-monosuccinyl-L-asparaginyl-L-asparagine) (GTS-301) and hexamethylenediamide bis-(N-γ-hydroxybutyryl-L-glutamyl-L-asparagine) (GTS-302), interacting with TRKC and TRKB receptors, were synthesized. The aim of this work was a comparative study of NT-3 mimetics effect on the manifestations of morphine withdrawal symptoms in albino rats with opiate dependence, as well as the features of activation of postreceptor signaling pathways

by NT-3 mimetics. The dipeptides GTS-301 and GTS-302 after acute administration at doses of 0.1, 1.0 and 10.0 mg/kg, i.p., had a dose-dependent effect on the specific signs of morphine withdrawal with the most effective dose of 1.0 mg/kg. The maximum reduction in the total morphine withdrawal syndrome index for GTS-301 was 31.3% and for GTS-302 – 41.4%. Unlike GTS-301, GTS-302 weakened mechanical allodynia, reducing tactile sensitivity. When studying the activation of postreceptor signaling pathways by NT-3 mimetics on a culture of HT-22 hippocampal cells, it was shown that they had a different pattern of postreceptor signaling: GTS-302 ( $10^{-6}$  M), like NT-3, activated all three MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR and PLC $\gamma$ 1, while GTS-301( $10^{-6}$  M) – only MAPK/ERK- and PLC $\gamma$ 1. Thus, the revealed features of attenuation of morphine withdrawal syndrome in rats after acute GTS-301 and GTS-302 administration may be associated with a different pattern of activation of postreceptor pathways.

*Keywords:* neurotrophin-3 mimetics, withdrawal syndrome, morphine, rats, MAPK/ERK, PI3K/AKT, PLC $\gamma$ 1, HT-22

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ АДДИКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

### Обзор

© 2024 В.В. Северцев<sup>1,2\*</sup>, М.А. Павкина<sup>1</sup>, Н.Н. Иванец<sup>1</sup>,  
М.А. Винникова<sup>1,3</sup>, А.А. Яковлев<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),  
119048 Москва, Россия; электронная почта: severtsevmed@gmail.com

<sup>2</sup> ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины  
имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России», 143007 Москва, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ «Московский научно-практический центр наркологии  
Департамента здравоохранения города Москвы», 109390 Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, Россия

<sup>5</sup> ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева  
Департамента здравоохранения города Москвы», 115419 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.04.2024

После доработки 03.08.2024

Принята к публикации 09.08.2024

Изучение роли и состояния малых внеклеточных везикул (мВВ) при психических и наркологических расстройствах является крайне перспективным направлением. Малые ВВ содержат на мембране белки, защищающие от уничтожения собственным иммунитетом, и благодаря своему размеру способны проникать через гематоэнцефалический барьер. Эти свойства позволяют рассматривать мВВ в качестве потенциальных биомаркеров, отражающих процессы, происходящие в головном мозге, и при этом доступных для изучения в образцах периферической крови. В исследованиях было показано, что количество, биогенез и содержимое ВВ значительно меняется при воздействии психоактивных веществ как *in vitro*, так и *in vivo*. Результаты анализа современной литературы демонстрируют наличие многочисленных потенциальных маркеров наркологической патологии среди грузов, переносимых мВВ, тем не менее реальная диагностическая значимость каждого из них требует дополнительного изучения. Многие данные указывают на влияние психоактивных веществ (ПАВ) на GТразы семейства Rab, Toll-like-рецепторы, систему комплемента и цитокины. Также в нескольких исследованиях были обнаружены половые различия изменений мВВ в ответ на воздействие ПАВ. Большинство исследований указывают на участие мВВ в регуляции нейровоспалительных процессов, обеспечении взаимодействия между глиальными клетками и нейронами, а также между периферическими клетками и клетками центральной нервной системы. Авторами обзора сформулирована гипотеза о наличии двух механизмов-этапов, в которых участвуют мВВ: «быстрый» – в ответ на воздействие ПАВ, обеспечивающий нейропластичность, и «медленный» – результат нарушения биогенеза мВВ и появления аберрантных вариантов везикул.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** малые внеклеточные везикулы, экзосомы, биомаркеры в психиатрии, аддиктология, фундаментальные механизмы аддиктивных расстройств, синдром зависимости.

DOI: 10.31857/S0320972524110115 EDN: IKHPDY

### ВВЕДЕНИЕ

Аддиктивные расстройства – острая проблема в современном мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), распространение

ненность расстройств, связанных с употреблением алкоголя, высока и в Европе составляет 14,8% среди мужчин и 3,5% среди женщин, а в США – 11,5% среди мужчин и 5,1% среди женщин. В России, по состоянию на 2020 г., под диспансерным наблюдением по поводу синдрома зависимости от алкоголя и пагубного употребления алкоголя

\* Адресат для корреспонденции.

состояло 1,2 млн человек. Количество потребителей наркотиков, по данным Организации Объединенных Наций (ООН), в мире в 2021 г. приблизительно равно 296 млн человек, а количество людей, имеющих расстройства, связанные с употреблением наркотиков, приблизительно равно 40 млн человек [1]. В России в 2020 г. под диспансерным наблюдением по поводу синдрома зависимости и пагубного употребления наркотиков находилось 341 000 человек [2].

Несмотря на то что термины «аддикция» и «зависимость» нельзя назвать полностью эквивалентными, все чаще в современном лексиконе фигурирует термин «аддиктивные расстройства», который замещает более традиционный «болезнь зависимости». Аддикция или зависимость – это хроническое прогредиентное заболевание, которое проявляется в стремлении к употреблению психоактивного вещества (ПАВ) или к поведению, вызывающему удовольствие, несмотря на очевидные негативные последствия для индивида [3]. Аддиктивные расстройства – это понятие, которое включает в себя ряд расстройств, объединенных в первую очередь в связи с наличием общих клинических феноменов, проявляющихся в особенностях взаимодействия индивида и объекта аддиктивного поведения [3, 4]. В настоящий момент считается, что значимую роль в патофизиологии болезни зависимости играют изменения сигналинга в системах «вознаграждения» и «стресса», а также их архитектоники за счет морфологических изменений, обусловленных ПАВ-индуцированной нейропластичностью [3].

Помимо хорошо изученных нейромедиаторных систем, в обеспечении межклеточного сигналинга важным элементом считается секреция малых внеклеточных везикул (мВВ) [5]. Малые ВВ представляют собой пузырьки с содержимым биологического происхождения, ограниченные липидным бислоем и имеющие размер порядка сотен нанометров. Ранее было принято считать, что мВВ являются средством, с помощью которого клетки избавляются от ненужных веществ, но сейчас это уже не основная точка зрения. Два хорошо изученных типа мВВ – экзосомы и эктосомы – секретируются практически всеми клетками организма и могут быть обнаружены практически в любой жидкости биологического происхождения. Эктосомы и экзосомы отличаются биогенезом, но по ряду функциональных и структурных свойств представляют собой очень

ближкие друг другу объекты. Классификация везикул в настоящее время разработана недостаточно хорошо [6]. Для удобства принятая простая система обозначений, когда везикулы размером меньше 200 нм считаются малыми, а больше 200 нм – большими ВВ [6].

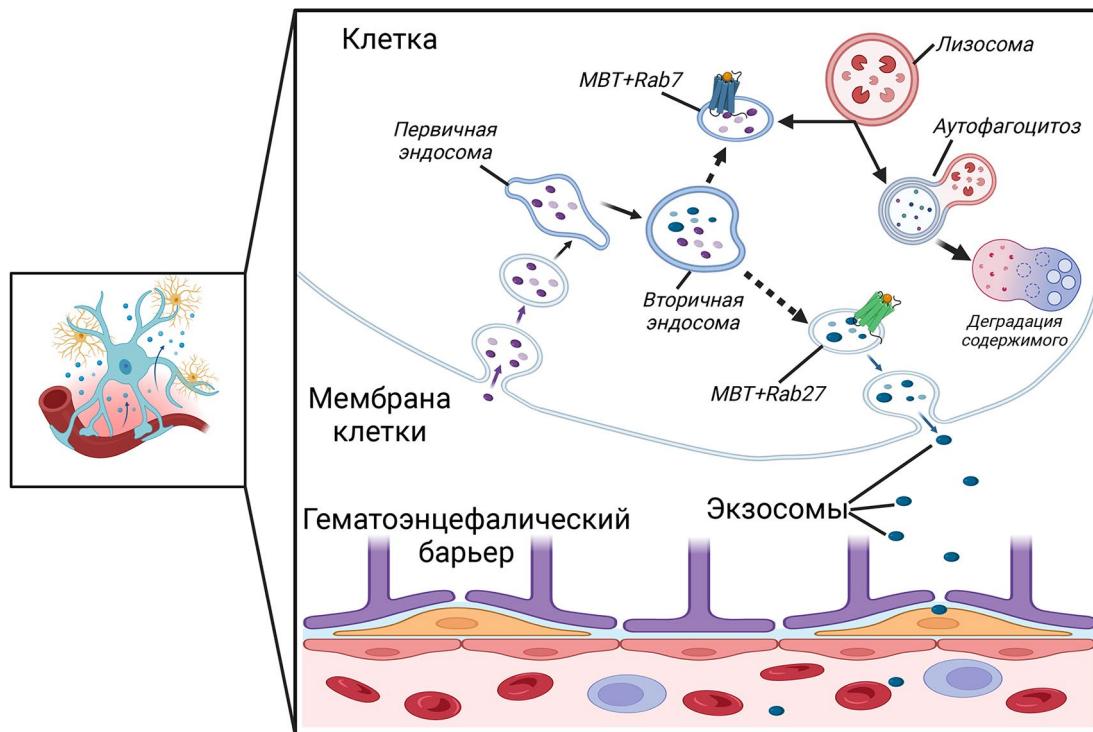
Современный интерес к мВВ определяется их несколькими простыми особенностями: малые ВВ организма содержат на мемbrane опознавательные знаки для макрофагов организма, что позволяет этим мВВ относительно длительное время распространяться по тканям без угрозы быть уничтоженными иммунной системой [7]. Кроме того, мВВ способны проникать через гистогематические барьеры, включая гематоэнцефалический [8]. Благодаря этим двум свойствам мВВ проникают во все биологические жидкости, откуда впоследствии могут быть выделены для анализа. Эти свойства обуславливают растущий интерес к мВВ и в контексте наркологической и психиатрической патологии. В данном обзоре мы постарались наибольшее внимание уделить тем исследованиям, посвященным мВВ, результаты которых помогают пролить свет на отдельные звенья патогенеза наркологической патологии и потенциально могут быть адаптированы для реальных клинических задач.

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ

**Биогенез везикул.** Биогенез мВВ в настоящее время описан довольно подробно [9]. Экзосомы являются продуктом эндолизосомальной системы клетки. Первичная эндосома созревает, становясь вначале вторичной эндосомой, а затем мультивезикулярным телом (МВТ). Интраплазматические везикулы после слияния МВТ с плазматической мемброй становятся экзосомами [9]. Для МВТ существует и другой путь – слияние с лизосомами и деградация содержащего. Судьба МВТ – слияние с плазматической мемброй и секреция или слияние с лизосомами и деградация – в существенной степени зависит от представленных на мембране МВТ малых GTPаз семейства Rab. Наличие на мембране МВТ Rab27 приводит к слиянию МВТ с плазматической мемброй и секреции экзосом [10], а наличие Rab7 приводит МВТ к слиянию с лизосомой и деградации содержащего [11]. Описанные пути визуализированы на рис. 1. Впрочем, в разных ситуациях и в разных типах клеток в регуляции внутриклеточного транспорта МВТ могут принимать участие и другие представители семейства Rab [12].

Эктосомы образуются при отшнуровывании участка плазматической мембранны во внеклеточное пространство и уносят в своем составе часть

Принятые сокращения: ДА – дофамин; мВВ – малые внеклеточные везикулы; МВТ – мультивезикулярное тело; ПАВ – психоактивное вещество; DR – рецептор к дофамину; ESCRT – эндосомальный сортиrovочный комплекс; TLR – toll-like-рецепторы.



**Рис. 1.** Первичная эндосома созревает, становясь вначале вторичной эндосомой, а затем мультивезикулярным телом. Интраплазматические везикулы после слияния МВТ с Rab27 с плазматической мембраной становятся экзосомами. Второй путь – слияние МВТ с Rab7 с лизосомами и деградация содержимого

цитоплазмы родительской клетки [9]. Таким образом, под термином «экзосома» в настоящее время подразумеваются те везикулы, которые ранее было принято называть микровезикулы или онкосомы. При секреции экзосом вначале образуется микродомен из липидов и белков в составе плазматической мембранны, а затем этот участок отшнуровывается наружу [9]. Есть несколько довольно специфических путей для механизма экзосомной секреции, но во многом механизмы биогенеза и секреции экзосом и экзосом пересекаются [13].

В образование мВВ вовлечена разнообразная клеточная машина. Основным специализированным механизмом, полностью вовлеченным в образование и транспорт внутриклеточных везикул, является эндосомальный сортировочный комплекс ESCRT [14]. Этот комплекс включает в себя четыре компонента, ESCRT-0, -1, -2 и -3, которые последовательно связываются с сайтами на плазматической или эндосомальной мемbrane, привлекают с собой некоторые специализированные белки и в конце концов вызывают отшнуровывание вновь образованной везикулы [15]. Кроме этого механизма, в образовании везикул принимают участие молекулярный каскад синденкан-синтенин-ALIX [16], тетраспанины [17], изменения актинового цитоскелета [18], нейтральная сфингомиелиназа [19], так же, как и церамид сам

по себе [20], и белок, содержащий арестиновый домен (ARRDC1) [21]. Несколько посттрансляционных белковых модификаций, хорошо известных по участию в иных внутриклеточных процессах, также принимают участие в упаковке везикул. Самым известным примером является убиквитинирование [22]. В общем, можно заключить, что биогенез мВВ задействует многие известные внутриклеточные механизмы и клетка не привлекает отдельные специальные механизмы для образования и секреции мВВ. Механизмы образования и секреции экзосом и экзосом во многом одни и те же. При этом стоит иметь в виду гетерогенность популяций мВВ, так что даже одна и та же клетка может секретировать мВВ с помощью разных механизмов в зависимости от своего функционального состояния.

**Фундаментальная роль везикул в сигналинге между клетками организма.** В последнее время появляется все больше доказательств, что мВВ выполняют некоторые важные функции в организме. В частности, предполагается, что посредством мВВ клетки организма обмениваются информацией друг с другом. В пользу такого предположения постоянно находятся подтверждения, вплоть до того, что в некотором смысле отдельные исследователи уже говорят об особой везикулярной системе сигналинга [23]. Судя по всему, впервые идея о том, что мВВ могут являться

межклеточными посредниками и представлять собой новую систему коммуникации клеток, появилась в 90-х гг. прошлого века [24]. Работы, послужившие основой для возникновения этой идеи, касались обмена информацией между клетками иммунной системы. Оказалось, что антигенпрезентирующие клетки могут секретировать белки главного комплекса гистосовместимости II типа в составе экзосом. Это не очень быстрый процесс, но тем не менее с его помощью антигенпрезентирующие клетки представляют антиген Т-клеткам.

Возможно, примеров коммуникации посредством мВВ более всего накоплено для клеток головного мозга. Более того, нетрудно найти свидетельства того, что со структурной точки зрения мВВ мозга – это одна из нейромедиаторных систем со своими безусловными отличиями от классических нейромедиаторов, но и с несомненным сходством [25]. Олигодендроциты секрецируют мВВ, которые стимулируют аксональный транспорт в окружающих нейронах [26]. Астроцитарные мВВ изменяют спонтанную активность нейронов [27], существенно изменяют вызванную активность нейронов [28], а также изменяют морфологию синаптического аппарата нейронов [29]. Нейроны секрецируют мВВ, влияющие на работу других нейронов [30] и окружающих эндотелиальных клеток [31]. Работы по везикулярной коммуникации в мозге, в принципе, объединены одним сценарием: в норме клетки мозга с помощью мВВ помогают нейронам выполнять свою работу или с помощью мВВ другие клетки мозга оказывают нейронам трофическую поддержку [32, 33]. Однако при возникновении в мозге достаточно продолжительной патологической ситуации мВВ мозга начинают оказывать губительное действие на нейроны [34].

Таким образом, в настоящее время факт обмена информацией между клетками организма посредством мВВ не ставится под сомнение. Тем не менее молекулярные механизмы адресной доставки мВВ, их интернализации и внутриклеточной сортировки изучены совершенно недостаточно. Единичные работы указывают на роль специфических молекул в распознавании мВВ клетками и роль конкретных молекул в составе мВВ в реализации тех или иных функций. Причина в том, что такие эксперименты сложны в реализации и для их проведения зачастую не хватает возможностей соответствующих технологий изучения везикул. Такое положение дел, однако, не является препятствием для разработки диагностических тестов и даже для создания терапии на основе мВВ [35].

**Диагностика на основе экзосом и эктосом.** Последнее время перед экспериментальными биологами все шире открываются перспективы

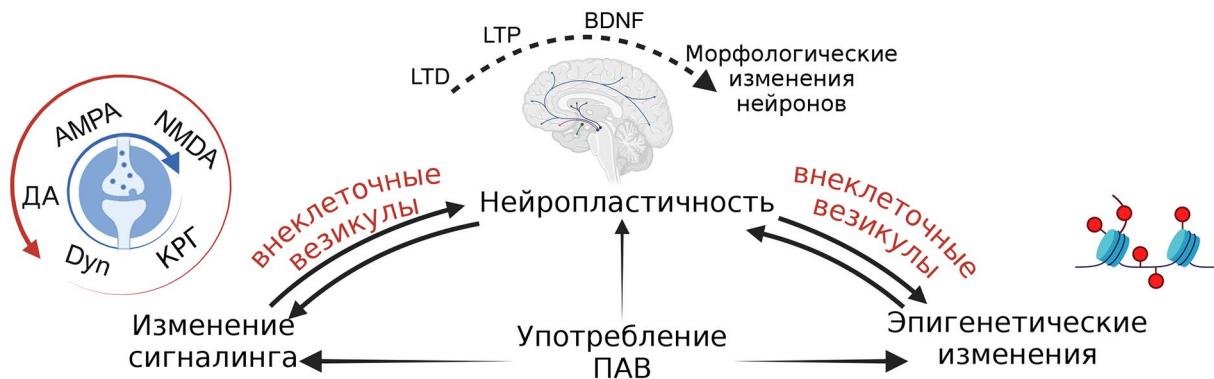
практического использования экзосом и эктосом. Основным направлением практического применения является диагностика на основе мВВ, хотя и попыток использования везикул для терапии тоже немало. Малые ВВ крови могут эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер, а мВВ, полученные из нервных и глиальных клеток, могут быть найдены в периферической крови, что позволяет наблюдать результаты изменений в мозге на основании состава мВВ мозга, полученных из периферической крови.

Можно сказать наверняка, что лучшие результаты получены в области диагностики онкологических заболеваний с помощью мВВ. Эта область изучена достаточно подробно и некоторые находки уже проходят клинические испытания. Уже первые попытки исследования мВВ в онкологии привели к идентификации поверхностных белков мВВ раковых клеток [36]. Кроме того, что на основании таких маркеров можно осуществить диагностику заболевания, были проведены и исследования функции мВВ раковых клеток. Оказалось, что важная функция мВВ в этой ситуации – подавление иммунитета в преметастатических нишах для последующего метастазирования [37].

Терапевтическое применение мВВ во многом сводится к использованию мВВ стволовых клеток для лечения самых разных заболеваний [38]. В настоящее время разрабатываются подходы для выделения и культивирования стволовых клеток так, чтобы можно было собирать максимальное число мВВ [39]. Полученные везикулы можно сохранять и использовать при необходимости в качестве средства лечения или предотвращения патологий.

## МАЛЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ В КОНТЕКСТЕ АДДИКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

Как и в психиатрии в целом, в современной аддиктологии ведущую роль в патогенезе зависимости отводят «функциональному» изменению обмена нейромедиаторов. Обобщенный механизм ответа нейронов на воздействие ПАВ представляется таким [3]: ПАВ действует на клетку, изменяя работу одной из нейромедиаторных систем; активация соответствующих рецепторов приводит к каскаду реакций, запускающему синтез соответствующих молекул, которые, в свою очередь, вызывают долговременные изменения в нейроне. Очевидно, что долговременные изменения в нейроне обеспечивают процессы обучения и памяти, в том числе в ответ на употребление (опьянение и толерантность) и ожидание употребления ПАВ (влечение). Сохранение и поддержание этих изменений на молекулярном уровне обеспечи-



**Рис. 2.** Место мВВ-сигналинга в патогенезе ПАВ-индуцированных изменений. BDNF – Нейротрофический фактор мозга; LTD – долговременная депрессия; LTP – долговременная потенциация; AMPA – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота; NMDA – N-метил-D-аспартат; ПАВ – психоактивное вещество; Dyp – динорфины; KRF – кортикотропин-рилизинг-гормон; DA – дофамин

вает нейропластичность, обусловленная употреблением ПАВ [40, 41]. Современные исследования подтверждают принципиальную роль глиальных клеток в обеспечении процессов нейропластичности. Вероятно, мВВ являются связующим звеном между этими хорошо изученными процессами, вовлеченными в патогенез аддиктивных расстройств, их положение отражено на рис. 2. Для целевой доставки необходимых молекул мВВ представляются эффективным транспортом, так как благодаря поверхностным белкам могут достигать непосредственно «адресата», не влияя на иные, нецелевые клетки.

Первая функция мВВ в данном контексте – «отправка» сигнальных молекул из астроцитарных клеток для обеспечения долговременных изменений в нейронах [28]. Вторая функция – активация микроглиальных клеток для обеспечения прунинга или других реактивных изменений [42]. Обнаружена и третья функция – «рассылка сообщений» к периферическим тканям [43].

При этом нейрон-глиальное взаимодействие в значительной степени обеспечивается АТР-зависимыми процессами и зависит от ионного баланса в межклеточном матриксе [44]. В исследовании на крысах было показано, что астроциты участвуют в формировании долговременной памяти: активация рецепторов к гамма-аминомаслянной кислоте (ГАМК) и ацетилхолиновых рецепторов (и соответствующих сопряженных G-белков) астроцитов влияет на консолидацию долговременной памяти через долговременные изменения  $\text{Ca}^{2+}$ , модуляции и экспрессию cFos [45]. Также активация рецепторов к дофамину (DR) приводит к долговременным изменениям в нейрональных стволовых клетках [46]. При этом в нейрональных стволовых клетках у пациентов с психиатрическими расстройствами чувствительность к дофамину (ДА) изменена по сравнению

с клетками психически здоровых людей. Авторы из Университета Рио-де-Жанейро выяснили, что в центре изменений, вызываемых ДА, лежит важнейший фермент энергетического метаболизма, митохондриальная гексокиназа (mt-HK). Таким образом, ДА может выступать как регулятор энергетического метаболизма нейронов, и чувствительность энергетического метаболизма к ДА зависит от генетической предрасположенности [46]. Следовательно, нарушения энергетического обмена представляются важным звеном патофизиологического механизма аддиктивных расстройств. В свою очередь, энергетический обмен напрямую связан с биогенезом мВВ, что приводит к предложению о его связи с изменениями в мВВ-сигналинге при наркологической патологии.

В последние десятилетия именно изучение генетических основ многих расстройств было в центре внимания психиатрического научного сообщества. Наиболее значимые ассоциации с аддиктивными расстройствами демонстрируют полиморфизм генов, кодирующих: белок, связанный с ожирением (fat mass and obesity-associated protein, FTO); receptor к дофамину 2-типа (DRD2) и фосфодиэстеразу 4B (PDE4B) [47]. В свою очередь, экспрессия генов регулируется эпигенетическими изменениями: посттрансляционной модификацией гистонов, метилированием ДНК и миРНК (некодирующими РНК). Регуляция экспрессии генов при помощи некодирующих РНК тесно связана с мВВ, так как такие РНК являются одним из самых распространенных «грузов», переносимых мВВ [48]. Роль ВВ в изменении плотности дендритных шипиков и количестве DR была подтверждена при изучении воздействия оксикодона на мышей как внутриутробно, так и в постнатальном периоде: было установлено, что повышение экспрессии miR-504 в мозговых ВВ приводит к уменьшению плотности дендритных шипиков

и повышению экспрессии DRD1 и DRD2 [49]. Генетически обусловленные особенности функционирования ЦНС определяют значительную предрасположенность к формированию зависимости: дети 9–10 лет, никогда не употреблявшие ПАВ, с наследственной отягощенностью по синдрому зависимости и психическим заболеваниям, имеют генетический «профиль», соответствующий высокому полигенному риску зависимости [47]. Также существуют данные и о сохранении эпигенетических изменений в половых клетках на животных моделях [50].

В контексте репродуктивных функций и сохранения эпигенетических изменений в потомстве роль мВВ также представляется весьма значимой. В частности, исследователи из США установили, что введение экзосом из спермы потребителей кокаина и ВИЧ-положительных людей в клеточную культуру моноцитов приводит к их адгезии, реорганизации цитоскелета и хемотаксической миграции [51]. Вопрос о содержащихся в сперме мВВ малоизучен и преимущественно представлен данными о предположительных маркерах рака простаты.

Было обнаружено, что ПАВ действуют на многие аспекты биогенеза мВВ, а также на их размеры, количество и «интернализацию». В эксперименте, проведенном на мышах, было установлено, что у мышей, вводивших себе самостоятельно кокаин, в микроглиальных клетках и астроцитах прилежащего ядра было значительно снижено количество «интернализированных» флуорисцентно-помеченных нейрональных экзосом [52]. Этот же коллектив авторов ранее продемонстрировал, что экзосомы участвуют в регуляции активности транспортера глутамата GLT1, транспортируя из нейронов в астроциты miR-124-3р [53]. В комбинированном исследовании, включавшем эксперимент на тканях печени мышей, клеточной культуре и образцах человеческих тканей, было установлено, что при воздействии повышенного содержания алкоголя на гепатоциты повышается экспрессия miR-155, и это приводит к снижению активности аутофагии и значительному повышению выработки экзосом [54]. На клеточной культуре микроглии (BV-2) были описаны изменения в экзосомах после 24- и 72-часового воздействия этанола. Было установлено, что количество экзосом уменьшается со временем пребывания клеток в алкогольной среде, а также повышается концентрация Rab7 и снижается концентрация CD63 [55]. В эксперименте на крысах, самостоятельно вводивших себе никотин в течение 22 дней, было установлено, что средний размер мВВ значимо увеличивался у крыс женского пола; аналогичный эффект наблюдался и у крыс мужского пола, но не был статистически значим; также у женских

особей было обнаружено повышение экспрессии генов, задействованных в ESCRT-зависимом и независимом путях. Кроме этого, исследователями обозначен широкий ряд изменений в составе белков, переносимых мВВ [56]. Кроме этого, обнаружено влияние астроцитарных мВВ, переносящих miR-106b-5р [57] и белок sonic hedgehog (SHH) [58], на цилиогенез астроцитов с выработанной толерантностью к морфину, что отражает участие мВВ и в морфологических изменениях клеток ЦНС.

Вышеописанное позволяет предположить, что при воздействии ПАВ на различные клетки организма в результате нарушения нормального биогенеза мВВ возникают аберрантные варианты мВВ, которые действуют на нецелевые клетки и органы или действуют на целевые, но нежелательным образом или с нежелательной силой. Одной из систем, нарушающихся при воздействии ПАВ, является иммунитет, в патогенезе этих изменений играет роль в том числе и непосредственное воздействие дофамина на экспрессию воспалительных факторов в иммунных клетках, саму клеточную активность и даже модуляцию дифференциации Т-лимфоцитов [59]. Также многие исследования демонстрируют вовлеченность экзосом в межклеточное взаимодействие в качестве переносчиков медиаторов воспаления. Испанскими исследователями было описано, что изменения в содержимом экзосом, выделенных из культуры астроцитов, на которые действовали алкоголем в течение 24 часов, включают повышение хорошо известных связанных с воспалением белков (COX-2), генов (*IL-1B*, *Traf6*, *Mapk14*, *Foxo3*) и miR (miR-146a). Но наиболее важной находкой является то, что у астроцитов с «отключенным» (*knocked out*) toll-like receptor 4 (TLR4) в экзосомах описанные изменения не наблюдаются [60]. С другой стороны, существуют данные, что кокаин повышает активность miR-124, что приводит к снижению экспрессии TLR4 и других провоспалительных белков [61].

В масштабном исследовании Chand et al. [62] было обнаружено, что у макак и крыс, вводивших себе самостоятельно метамфетамин обнаруживается множество изменений в экзосомах. Авторы описывают изменение размера экзосом с диапазона 100–200 нм до диапазона 50–500 нм, а также повышение экспрессии генов, задействованных в реализации комплекса ESCRT Alix. Далее, описано повышение количества поверхностных белков экзосом Alix, TSG101, HSP70 и CD63, что авторы интерпретируют как изменение в соотношении определенных подтипов экзосом. Также было обнаружено, что содержание miR-29a повышается только после длительного массивного воздействия на клеточную культуру метамфетамином и только в мВВ, но не в крупных ВВ.

Авторы предполагают, что miR-29a действует через повышение активности TLR7-сигналинга и повышение выработки в микроглии провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  и рецепторов CCR5 и CXCR3 [62]. Важной деталью является то, что TLR4 и TLR7 являются не только участниками воспалительных реакций, но и участвуют в работе эндосомальной системы, что связывает их функции с биогенезом мВВ.

На клеточной культуре было обнаружено, что альфа-синуклеин может транспортироваться из нейронов в астроциты с помощью экзосом [63]. В исследовании на обезьянах, самостоятельно вводивших себе оксикодон в течение трех лет, в выделенных из крови экзосомах нейронального и астроглиального происхождения была обнаружена достоверно более высокая концентрация легких цепей нейрофиламентов, а в выделенных из крови экзосомах нейронального происхождения была обнаружена достоверно более высокая концентрация альфа-синуклеина [64]. Повышение концентрации этих белков в экзосомах в крови коррелировало со снижением объема лобных и теменных долей. Довольно неожиданным оказалось, что размер экзосом в группе животных, хронически употреблявших оксикодон, составил 133 нм, что достоверно выше, чем размер экзосом в крови контрольных животных (102 нм). Концентрация нескольких микроРНК различается в экзосомах нейронального, астроглиального и микроглиального происхождения у контрольных и хронически наркотизировавшихся животных [64]. Также исследователи из Университета Небраски обнаружили повышение бета-амилоида в астроцитах лобной коры и базальных ганглиев макак, зависимых от морфина, а также повторили этот эффект на культуре астроцитов человека, подтвердив повышение количества мВВ, переносящих бета-амилоид, а также повышение экспрессии провоспалительных медиаторов [65]. Более того, добавление экзосом нейронального, астроглиального и микроглиального происхождения к моноцитам в культуре приводит к провоспалительному ответу. Авторы предполагают, что с помощью везикул из клеток мозга в крови могут судить об интенсивности нейродегенерации в головном мозге. Но и не только, так как экзосомы хронически наркотизированных животных по многим исследованным показателям отличаются от контрольных. Среди этих параметров и содержание микроРНК, и провоспалительный потенциал, и даже такая, казалось бы, оторванная от биологического эффекта характеристика, как размер. Все исследование говорит о том, что экзосомы крови могут служить источником информации о самых разнообразных процессах, происходящих в мозге при хронической наркотизации. Связь

обнаруживаемых в периферической крови мВВ с нейровоспалением была подтверждена экспериментально: экзосомы, полученные из плазмы мышей, которые получили инъекции с липополисахаридом *Escherichia coli*, вводили внутривенно интактным мышам, после чего наблюдали у них повышение экспрессии многих факторов воспаления, а также микроглиоз и астроглиоз [66].

На клеточной культуре мононуклеарных клеток крови, выделенных из плазмы здоровых доноров, зараженных ВИЧ и подвергнутых воздействию морфина, было установлено, что существуют дозозависимые изменения регулирующих воспаление микроРНК (miR-627-5p, miR-378e, miR-150-5p, miR-1290), при этом уровень miR-1290 был в 12 раз выше в мВВ исследуемых клеток, чем в мВВ контрольных [67]. В Университете Нью-Джерси было установлено, что в микроглиальных экзосомах, выделенных посмертно из гипоталамуса крыс, подвергавшихся ежедневному воздействию алкоголя, повышенено содержание таких апоптотических факторов, как C1q-белок комплемента, мембраноатакующий комплекс и активные формы кислорода [68]. На клеточной культуре микроглиальных клеток были продемонстрированы нарушения биогенеза и изменение состава микроглиальных экзосом, а также изменение экспрессии экзосомальных белков под воздействием кокаина [69]. Оказывается, под действием этого психостимулятора меняется внутриклеточная экспрессия малых GTPаз семейства Rab, так что можно обоснованно предположить изменение внутриклеточного транспорта везикул. Обнаруженное авторами снижение секреции экзосом может быть связано как раз с изменением внутриклеточного траффика, скажем, изменением доли МВТ, попадающих в лизосомы для последующей деградации. Также авторы обнаружили некоторое снижение жизнеспособности клеток под действием кокаина. В другом исследовании в мВВ, выделенных из мозга мышей, подвергавшихся воздействию кокаина в течение 12 дней, было выявлено повышение ганглиозида GD1a у мышей мужского пола, что говорит о наличии половых различий в липидном составе в ответ на воздействие кокаина [70].

В комбинированном исследовании, включавшем оценку микроРНК во внеклеточных везикулах людей и эксперимент на мышах, было продемонстрировано, что во время алкогольной интоксикации у женщин и мышей женского пола повышаются уровни противовоспалительных микроРНК miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-182-5p, а у мужчин они понижаются. В коре головного мозга мышей женского пола этанол снижал уровни miR-146a-5p и miR-21-5p и одновременно с этим повышал экспрессию генов воспалительных

молекул *Traf6*, *Stat3* и *Camk2a* [71]. В небольшом исследовании (6 пациентов с синдромом зависимости от алкоголя и 6 здоровых добровольцев) было выделено 149 повышенных и 105 сниженных кольцевых РНК, содержащихся в экзосомах плазмы. Было установлено, что has-circ-0004771 потенциально может быть чувствительным биомаркером тяжести синдрома зависимости от алкоголя [72].

Китайские исследователи изучили 140 пациентов мужского пола, проходящих лечение в Медицинском Университете Кунмина с января 2018 г. по октябрь 2019 г.: 60 зависимых от героина, 60 зависимых от метамфетамина и 20 здоровых контролей. Они обнаружили, что уровни экзосомальных *hsa-miR-451a* и *hsa-miR-21a* обладают прогностической способностью (0,966 и 0,861 (area under curve, AUC)) для героина и метамфетамина соответственно). Также обнаружено, что повышение уровня *hsa-miR-744-5p* было ассоциировано с острой фазой синдрома отмены и положительно коррелировало с уровнем серотонина у зависимых от героина и метамфетамина [73]. На этой же выборке была установлена связь между *miR-92a-3p*, *miR-363-3p*, *miR-16-5p*, *miR-129-5p* и общим баллом по шкале тревоги Гамильтона. *miR-92a-3p*, *miR-363-3p*, *miR-16-5p* и *miR-129-5p* значимо коррелировали с общим баллом по шкале депрессии Гамильтона у пациентов, зависимых от метамфетамина, но не от героина. Исследователи предполагают, что эти миРНК смогут послужить биомаркерами особенностей психопатологической картины [74].

В исследовании, включавшем 37 пациентов, зависимых от метамфетамина, и 35 сопоставимых по возрасту и полу здоровых добровольцев, было выявлено устойчивое снижение концентрации *miR-137*, отвечающей за нейрогенез и созревание нейронов, у пациентов во время синдрома отмены метамфетамина в циркулирующих в периферической крови мВВ [75]. В исследовании, включавшем 20 пациентов, зависимых от героина и воздерживающихся в течение 7–14 дней (ранняя ремиссия), 21 пациента, воздерживающихся приблизительно в течение года (пролонгированная ремиссия), и 38 сопоставимых по возрасту здоровых добровольцев, были установлены особенности воспалительного ответа. В период ранней ремиссии были повышены уровни транскрипции хемокинов *PF4* и *PPBP*. На этапе пролонгированной ремиссии было обнаружено повышение количества РНК, ответственных за *CD74*, *HLA-E*, *SELENOH-205*, *RPL18-207*, *ABCA7*, RIG-1-подобный рецептор [76]. Экзосомы в крови этих пациентов содержали длинные некодирующие РНК, которые также могут быть вовлечены в повышение провоспалительного ответа у пациентов с зависимо-

стью. В исследовании на выборке пациентов со сформированным в раннем возрасте синдромом зависимости от каннабиноидов было показано повышение концентрации в мозговых мВВ пропердина и белка *SHANK1*, которые также участвуют в регуляции воспаления и синаптогенеза [77].

Американскими исследователями была изучена выборка ВИЧ-позитивных субъектов, которых разделили на группы в зависимости от потребления алкоголя и табака. На этой выборке были показаны статистически значимые различия между здоровыми добровольцами, пациентами с ВИЧ и курильщиками по концентрации пропердина, а также здоровыми, пациентами с ВИЧ и потребителями алкоголя по концентрации хемопексина в мВВ [78]. Этой же группой исследователей, на той же выборке, было показано повышение концентрации *GFAP* и *L1CAM* в циркулирующих в периферической крови мВВ у ВИЧ-положительных потребителей алкоголя и табака по сравнению с контрольной группой [79]. Также ими были обнаружены некоторые различия между содержанием интерлейкинов и хемокинов в плазме и в экзосомах пациентов с ВИЧ, употребляющих и не употребляющих алкоголь и табак, однако исследование было проведено на выборке из 15 человек, что значительно усложняет интерпретацию результата, кроме того, некоторые из искомых цитокинов не определялись в образцах вообще [80]. В табл. 1 кратко резюмированы все потенциальные биомаркеры, описанные выше в тексте.

Терапевтический потенциал экзосом при наркологической патологии также был обнаружен в ряде исследований. Например, экзосомы, выделенные из стволовых мезенхимальных клеток, снижали потребление алкоголя крысами, уменьшали признаки оксидативного стресса, нейровоспаление, активацию астроцитов и плотность микроглии, а также повышали экспрессию *GLT1* в прилежащем ядре [81]. В исследовании испанских ученых, проведенном на молодых мышах, было установлено, что внутривенное введение экзосом, выделенных из стволовых мезенхимальных клеток, предотвращает развитие нейровоспаления, снижая активность ответственных генов, а также уменьшает повреждение миелина и синапсов, что в результате положительно сказывается на когнитивных функциях [82]. Кроме этого, было показано, что ВВ, загруженные *lincRNA-Cox2-siRNA*, при интраназальном введении могут останавливать пролиферацию микроглии, вызванную бактериальным липополисахаридом [42].

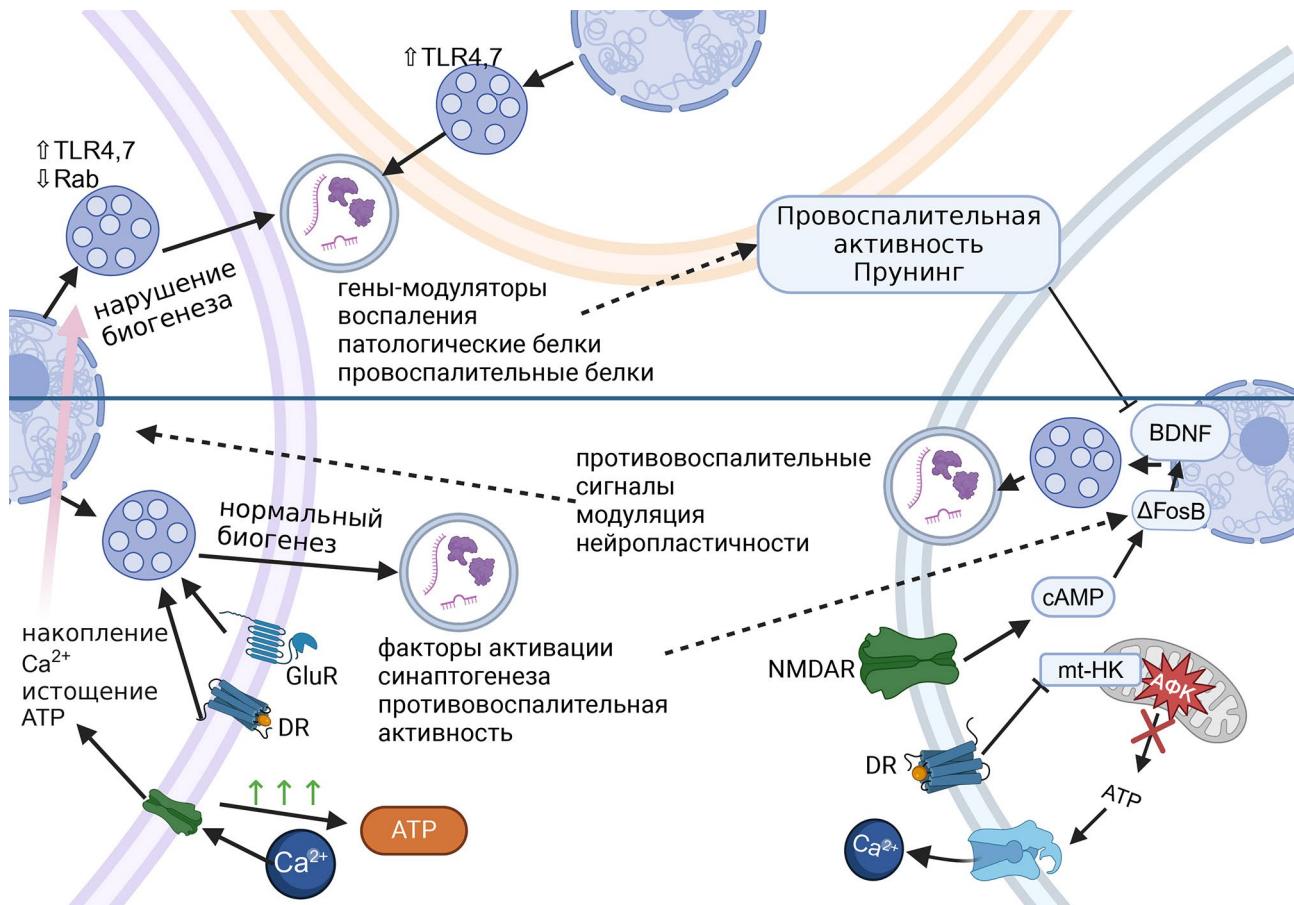
Таким образом, эффекты от воздействия ПАВ на мВВ-сигналинг обнаруживаются во многих контекстах: распространяемых в экзосомах сигнальных миРНК, ассоциированных с регуляцией воспаления; изменении биогенеза экзосом

**Таблица 1.** Грузы мВВ, обнаруженные в исследованиях за последние годы, рассматриваемые в качестве потенциальных маркеров

Материал	Потенциальный маркер	Ассоциированный процесс	Ссылка
Крысы, получавшие оксикодон 14 дней	miR-504	изменения в экспрессии рецепторов к дофамину DRD1 и DRD2	[49]
Сперма ВИЧ-позитивных потребителей наркотиков	обратная транскриптаза, p24-антитело для ВИЧ, бензоилэгконин	прогрессия ВИЧ и употребление кокаина	[51]
Мышь, вводившие себе кокайн	нарушение интернализации экзосом	нарушение нейрон-глиального сигналинга	[52]
Препарат мозга мышей	miR-124-3p	повышение активности транспортера глутамата астроцитов	[53]
Культура клеток мышевой и человеческой печени после воздействия этанола	miR-155	снижение аутофагии гепатоцитов и повышение количества экзосом	[54]
Культура микроглиальных клеток после воздействия этанола	повышение концентрации Rab7; снижение концентрации CD63	нарушение биогенеза экзосом	[55]
Мозг крыс	мужского пола: циклин Y, GABA <sub>A</sub> ( $\gamma$ 2-длинная изоформа), АТР-цитрат синтаза, долихол-фосфат манносилтрансфераза 1-субъединица, мезодермальный специфический транскрипт гомолога белка женского пола: аквапорин-1, эзрин, фосфотидилинозитол 5-фосфат 4-киназа 2α-типа	различные регуляторные функции	[56]
Культура астроцитов мышей с выработанной толерантностью к морфину	miR-106b-5p	активация цилиогенеза через экспрессию CEP97	[57]
Культура астроцитов мышей с выработанной толерантностью к морфину	sonic hedgehog-белок (SHH)	увеличение числа обладающих цилией астроцитов и ее длины	[58]
Культура астроцитов после воздействия этанола	белок COX-2; гены <i>IL-1B</i> , <i>Traf6</i> , <i>Mapk14</i> , <i>Foxo3</i> ; miR-146a	провоспалительные изменения, зависимые от активности TLR4	[60]
Макаки и крысы, самостоятельно вводившие себе метамфетамин	Alix, TSG101, HSP70 и CD63; miR-29a; изменение размера экзосом	изменение биогенеза, провоспалительные изменения микроглии	[62]
Культура клеток SH-SY5Y после воздействия метамфетамина	α-синуклеин	когнитивный дефицит	[63]
Экзосомы нейронального и астроглиального происхождения, выделенные из крови обезьян, самостоятельно вводивших себе оксикодон в течение трех лет	α-синуклеин; легкие цепи нейрофиламента	когнитивный дефицит	[64]

Таблица 1 (окончание)

Материал	Потенциальный маркер	Ассоциированный процесс	Ссылка
Астроциты, полученные из препарата мозга макак, получавших морфин	токсичные формы амилоида	когнитивный дефицит	[65]
Культура периферических моноцитов, зараженных ВИЧ, на которые воздействовали морфином	miR-627-5p, miR-378e, miR-150-5p, miR-1290	множество предполагаемых сигнальных путей, ассоциированных с модуляцией воспаления	[67]
Культура микроглиальных клеток, на которые воздействовали алкоголем	C1q-белок комплемента	активация провоспалительных путей	[68]
Культура микроглиальных клеток	экспрессия малых GTPаз семейства Rab	биогенез мВВ	[69]
Мозг мышей, получавших кокаин	GD1a ганглиозид повышен у мужских особей	регуляция BDNF	[70]
Мозг женских и мужских особей мышей, а также женщин и мужчин после воздействия этанола	у женских особей и женщин: повышение экспрессии miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-182-5p, miR-146a-5p, miR-21-5p; повышение экспрессии генов <i>Traf6</i> , <i>Stat3</i> , <i>Camk2a</i>	проводоспалительный ответ	[71]
Люди с синдромом зависимости от алкоголя	hsa-circ-0004771	модуляция различных клеточных процессов	[72]
Люди с синдромом зависимости от героина и от метамфетамина; острая фаза синдрома отмены героина и метамфетамина	различия между зависимыми людьми и контрольной группой: hsa-miR-451a и hsa-miR-21a; в острой фазе синдрома отмены: hsa-miR-744-5p	модуляция различных клеточных процессов	[73]
Плазма пациентов, зависимых от героина и метамфетамина	miR-16-5p, miR-129-5p, miR-363-3p, miR-92a-3p	синаптогенез, клеточная адгезия, фокальные контакты и комплекс гистосовместимости II типа	[74]
Люди в период синдрома отмены метамфетамина	miR-137	регуляция клеточных функций	[75]
Люди, зависимые от героина, в период ранней ремиссии (7–14 дней) и прологированной ремиссии (около года)	во время ранней ремиссии: хемокины PF4 и PPBP; во время пролонгированной ремиссии: повышение количества РНК, кодирующих CD74, HLA-E, SELENOH-205, RPL18-207, ABCA7, RIG-1-подобный рецептор	иммунитет	[76]
Плазма пациентов с зависимостью от каннабиноидов	пропердин, SHANK1	регуляция воспаления и синаптогенез	[77]
Плазма ВИЧ-позитивных потребителей алкоголя и табака	хемопексин, пропердин	регуляция воспаления	[78]
мВВ, выделенные из крови ВИЧ-позитивных потребителей алкоголя и табака	GFAP и L1CAM	белки, идентифицирующие происхождение мВВ	[79]



**Рис. 3.** Иллюстрация предложенной авторами обзора гипотезы об участии мВВ в патогенезе наркологических заболеваний. На рисунке условно обозначена система из астроцита (слева), микроглии (в верхней части) и нейрона (справа). Ниже разделительной линии представлены «быстрые изменения»: 1) при первых воздействиях ПАВ на нейрон реализуются механизмы синаптогенеза, запускающие выделение мВВ, содержащие факторы, снижающие провоспалительную активность, и «запросы» на поддержку синаптогенеза в астроците; 2) астроцит в ответ на «запрос» нейрона выделяет мВВ, содержащие противовоспалительные факторы и факторы, поддерживающие синаптогенез; 3) это обеспечивает консолидацию нейронных связей и снижение активности микроглиальных клеток; 4) параллельно ПАВ нарушают метаболизм клеток, что приводит к накоплению кальция и активных форм кислорода внутри клетки. Выше разделительной линии представлены «медленные изменения»: 1) накопление энергетических и ионных нарушений приводит к нарушению биогенеза везикул; 2) в результате повышается выработка провоспалительных факторов и патологических белков; 3) это, в свою очередь, приводит к активации микроглии, снижению синаптогенеза и нарушению нормальной нейрофизиологии. ΔFosB – дельта-FosB-белок; BDNF – нейротрофический фактор мозга;  $\text{Ca}^{2+}$  – ионизированный кальций; cAMP – циклический аденоцимонофосфат; GluR – рецептор к глутамату; NMDAR – N-метил-D-аспартат-рецептор; mt-HK – митохондриальная гексокиназа; АФК – активные формы кислорода

микроглиальными клетками, ответственными за иммунный ответ; повышении количества патологических белков. К сожалению, большинство из этих данных могут лишь в незначительной степени быть экстраполированы на клиническую действительность и оставляют большое пространство для рассуждения.

Авторами, по результатам обзора, была сформулирована гипотеза, представленная на рис. 3: предполагается, что существует два этапа клеточного ответа на воздействие ПАВ в контексте мВВ. Первый из них – «быстрый» и обусловлен воздействием ПАВ непосредственно на рецепторы клеток ЦНС и запуск молекулярных каскадов, при-

водящих в результате к изменению в процессе биогенеза и «загрузки» мВВ. Эти изменения, вероятно, лежат в основе процессов нейропластичности, то есть обучения и памяти.

Второй – «медленный» и, вероятно, связан с накоплением «воспалительно-подобных» изменений и нарушением клеточного метаболизма. В нем мВВ играют роль основных модуляторов воспаления, активации иммунитета и, возможно, сенсибилизации иммунных клеток к собственным антигенам. Эти изменения могут играть роль в формировании когнитивного дефицита и нарушении импульс-контроля, ассоциированного с длительным употреблением ПАВ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопленные к настоящему времени данные позволяют заключить, что изучение экзосом и других малых внеклеточных везикул в свете аддиктивных расстройств является весьма перспективным направлением. Ключевое преимущество везикул, свободно циркулирующих в периферической крови, перед другими биологическими маркерами – возможность прохождения гематоэнцефалического барьера. Резонно будет предположить, что в результате подробного изучения роли мВВ в патофизиологических процессах, лежащих в основе аддиктивных расстройств, возможно будет обнаружить многофункциональные биомаркеры. Во-первых, выявление чувствительных и специфичных различий между особенностями мВВ здоровых людей и людей со сформированной зависимостью может обеспечить реализацию ранней диагностики и выявление групп риска. Во-вторых, выявление изменений в процессах, в

которых участвуют мВВ, на фоне сформированной зависимости может позволить обнаружить новые терапевтические мишени для разработки лечебных методик. И, в-третьих, с помощью мониторинга мВВ, вероятно, возможно изучение ответа на терапию не только по клиническим признакам, но и на молекулярном уровне.

**Вклад авторов.** В.В. Северцев, А.А. Яковлев, М.А. Винникова – разработка концепции, анализ существующей литературы; В.В. Северцев, А.А. Яковлев – написание текста статьи; А.А. Яковлев, В.В. Северцев, М.А. Павкина – создание иллюстраций; Н.Н. Иванец, М.А. Винникова – редактирование финального текста статьи.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. УНП ООН (2023) Всемирный доклад о наркотиках за 2023 год, URL: [https://www.unodc.org/res/WDR-2023/WDR23\\_ExSum\\_Russian.pdf](https://www.unodc.org/res/WDR-2023/WDR23_ExSum_Russian.pdf).
2. Киржанова В. В., Григорова Н. И., Бобков Е. Н., Киржанов В. Н., Сидорюк О. В. (2022) Деятельность наркологической службы Российской Федерации в 2019-2020 года. Аналитический обзор, ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва.
3. Иванец Н. Н., Винникова М. А. (2024) Наркология: национальное руководство, 3-е изд., ГЭОТАР-Медиа, Москва.
4. Hauck, C., Cook, B., and Ellrott, T. (2020) Food addiction, eating addiction and eating disorders, *Proc. Nutr. Soc.*, **79**, 103-112, <https://doi.org/10.1017/S0029665119001162>.
5. Kalluri, R., and LeBleu, V. S. (2020) The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, **367**, <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>.
6. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A. C., Bergese, P., Bielska, E., et al. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *J. Extracell. Vesicles*, **7**, 1535750, <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
7. Kamerkar, S., Lebleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., Lee, J. J., and Kalluri, R. (2017) Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer, *Nature*, **546**, 498-503, <https://doi.org/10.1038/nature22341>.
8. Khaspekov, L. G., and Yakovlev, A. A. (2023) Prospects for the use of small extracellular vesicles as a transport vehicle through the blood-brain barrier, *Neurochem. J.*, **17**, 1-9, <https://doi.org/10.1134/s1819712423010087>.
9. Van Niel, G., Carter, D. R. F., Clayton, A., Lambert, D. W., Raposo, G., and Vader, P. (2022) Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 369-382, <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00460-3>.
10. Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., and Thery, C. (2009) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 19-30, <https://doi.org/10.1038/ncb2000>.
11. Vanlandingham, P. A., and Ceresa, B. P. (2009) Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration, *J. Biol. Chem.*, **284**, 12110-12124, <https://doi.org/10.1074/jbc.M809277200>.

12. Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 513-525, <https://doi.org/10.1038/nrm2728>.
13. Gurunathan, S., Kang, M.-H., Qasim, M., Khan, K., and Kim, J.-H. (2021) Biogenesis, membrane trafficking, functions, and next generation nanotherapeutics medicine of extracellular vesicles, *Int. J. Nanomed.*, **16**, 3357-3383, <https://doi.org/10.2147/IJN.S310357>.
14. Henne, W. M., Buchkovich, N. J., and Emr, S. D. (2011) The ESCRT pathway, *Dev. Cell*, **21**, 77-91, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>.
15. Turchinets, A. M., and Yakovlev, A. A. (2023) Structural determinants of small extracellular vesicles (exosomes) and their role in biological functions, *Neurochem. J.*, **17**, 547-559, <https://doi.org/10.1134/s1819712423040220>.
16. Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., and David, G. (2012) Syndecan-syntenin-Alix regulates the biogenesis of exosomes, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 677-685, <https://doi.org/10.1038/ncb2502>.
17. Van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis, *Dev. Cell*, **21**, 708-721, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>.
18. Thom, S. R., Bhopale, V. M., Yu, K., Huang, W., Kane, M. A., and Margolis, D. J. (2017) Neutrophil microparticle production and inflammasome activation by hyperglycemia due to cytoskeletal instability, *J. Biol. Chem.*, **292**, 18312-18324, <https://doi.org/10.1074/jbc.m117.802629>.
19. Menck, K., Sönmezler, C., Worst, T. S., Schulz, M., Dihazi, G. H., Streit, F., Erdmann, G., Kling, S., Boutros, M., Binder, C., and Gross, J. C. (2017) Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane, *J. Extracell. Vesicles*, **6**, 1378056, <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1378056>.
20. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes, *Science*, **319**, 1244-1247, <https://doi.org/10.1126/science.1153124>.
21. Anand, S., Foot, N., Ang, C., Gembus, K. M., Keerthikumar, S., Adda, C. G., Mathivanan, S., and Kumar, S. (2018) Arrestin-domain containing protein 1 (Arrdc1) regulates the protein cargo and release of extracellular vesicles, *Proteomics*, **18**, e1800266, <https://doi.org/10.1002/pmic.201800266>.
22. Buschow, S. I., Liefhebber, J. M. P., Wubbolts, R., and Stoorvogel, W. (2005) Exosomes contain ubiquitinylated proteins, *Blood Cells Mol. Dis.*, **35**, 398-403, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.08.005>.
23. Stahl, P. D., and Raposo, G. (2019) Extracellular vesicles: exosomes and microvesicles, integrators of homeostasis, *Physiology*, **34**, 169-177, <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2018>.
24. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendecker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., and Geuze, H. J. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *J. Exp. Med.*, **183**, 1161-1172, <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>.
25. Yakovlev, A. A. (2023) Neuronal exosomes as a new signaling system, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 457-465, <https://doi.org/10.1134/s0006297923040028>.
26. Frühbeis, C., Kuo-Elsner, W. P., Müller, C., Barth, K., Peris, L., Tenzer, S., Möbius, W., Werner, H. B., Nave, K.-A., Fröhlich, D., and Krämer-Albers, E.-M. (2020) Oligodendrocytes support axonal transport and maintenance via exosome secretion, *PLOS Biol.*, **18**, e3000621, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000621>.
27. Chaudhuri, A. D., Dasgheyb, R. M., DeVine, L. R., Bi, H., Cole, R. N., and Haughey, N. J. (2019) Stimulus-dependent modifications in astrocyte-derived extracellular vesicle cargo regulate neuronal excitability, *Glia*, **68**, 128-144, <https://doi.org/10.1002/glia.23708>.
28. Chun, C., Smith, A. S. T., Kim, H., Kamenz, D. S., Lee, J. H., Lee, J. B., Mack, D. L., Bothwell, M., Clelland, C. D., and Kim, D.-H. (2021) Astrocyte-derived extracellular vesicles enhance the survival and electrophysiological function of human cortical neurons *in vitro*, *Biomaterials*, **271**, 120700, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120700>.
29. Patel, M. R., and Weaver, A. M. (2021) Astrocyte-derived small extracellular vesicles promote synapse formation via fibulin-2-mediated TGF-β signaling, *Cell Rep.*, **34**, 108829, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108829>.
30. Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F. J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., and Sadoul, R. (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity, *Mol. Cell. Neurosci.*, **46**, 409-418, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.11.004>.
31. Schiera, G., Proia, P., Alberti, C., Mineo, M., Savettieri, G., and Di Liegro, I. (2007) Neurons produce FGF2 and VEGF and secrete them at least in part by shedding extracellular vesicles, *J. Cell. Mol. Med.*, **11**, 1384-1394, <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00100.x>.
32. Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., and Lo, E. H. (2016) Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke, *Nature*, **535**, 551-555, <https://doi.org/10.1038/nature18928>.

33. Krämer-Albers, E., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., Nave, K., Schild, H., and Trotter, J. (2007) Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin. Appl.*, **1**, 1446-1461, <https://doi.org/10.1002/prca.200700522>.
34. Yakovlev, A. A. (2022) Neuroprotective effects of astrocyte extracellular vesicles in stroke, *Neurochem. J.*, **16**, 121-129, <https://doi.org/10.1134/s1819712422020143>.
35. Druzhkova, T. A., and Yakovlev, A. A. (2018) Exosome drug delivery through the blood-brain barrier: experimental approaches and potential applications, *Neurochem. J.*, **12**, 195-204, <https://doi.org/10.1134/s1819712418030030>.
36. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmer, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J. M., Dumont-Cole, V. D., Kramer, K., et al. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, *Nature*, **527**, 329-335, <https://doi.org/10.1038/nature15756>.
37. 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>.
38. Onkar, A., Khan, F., Goenka, A., Rajendran, R. L., Dmello, C., Hong, C. M., Mubin, N., Gangadaran, P., and Ahn, B.-C. (2024) Smart nanoscale extracellular vesicles in the brain: unveiling their biology, diagnostic potential, and therapeutic applications, *ACS Appl. Mater. Interf.*, **16**, 6709-6742, <https://doi.org/10.1021/acsami.3c16839>.
39. Basalova, N. A., Dzhauari, S. S., Yurshev, Yu. A., Primak, A. L., Efimenko, A. Yu., Tkachuk, V. A., and Karagyaur, M. N. (2023) State-of-the-art: the use of extracellular vesicles and preparations based on them for neuroprotection and stimulation of brain tissue regeneration after injury, *Neurochem. J.*, **17**, 560-570, <https://doi.org/10.1134/s1819712423040074>.
40. Перегуд Д. И., Баронец В. Ю., Теребилина Н. Н., Гуляева Н. В. (2023) Роль BDNF в нейропластичности при формировании зависимости от алкоголя, *Биохимия*, **88**, 491-507, <https://doi.org/10.31857/S0320972523030090>.
41. Speranza, L., di Porzio, U., Viggiano, D., de Donato, A., and Volpicelli, F. (2021) Dopamine: the neuromodulator of long-term synaptic plasticity, reward and movement control, *Cells*, **10**, 735, <https://doi.org/10.3390/cells10040735>.
42. Hu, G., Liao, K., Niu, F., Yang, L., Dallon, B. W., Callen, S., Tian, C., Shu, J., Cui, J., Sun, Z., Lyubchenko, Y. L., Ka, M., Chen, X.-M., and Buch, S. (2018) Astrocyte EV-induced lincRNA-Cox2 regulates microglial phagocytosis: implications for morphine-mediated neurodegeneration, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **13**, 450-463, <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.09.019>.
43. Chivero, E. T., Dagur, R. S., Peebles, E. S., Sil, S., Liao, K., Ma, R., Chen, L., Gurumurthy, C. B., Buch, S., and Hu, G. (2021) Biogenesis, physiological functions and potential applications of extracellular vesicles in substance use disorders, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 4849-4865, <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03824-8>.
44. Dzyubenko, E., and Hermann, D. M. (2023) Role of glia and extracellular matrix in controlling neuroplasticity in the central nervous system, *Semin. Immunopathol.*, **45**, 377-387, <https://doi.org/10.1007/s00281-023-00989-1>.
45. Kim, S., and Son, Y. (2021) Astrocytes stimulate microglial proliferation and M2 polarization *in vitro* through crosstalk between astrocytes and microglia, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8800, <https://doi.org/10.3390/ijms22168800>.
46. Assis-de-Lemos, G., Monteiro, J., Oliveira-Valença, V. M., Melo, G. A., Reis, R. A. de M., Rehen, S. K., Silveira, M. S., and Galina, A. (2021) Dopamine signaling impairs ROS modulation by mitochondrial hexokinase in human neural progenitor cells, *Biosci. Rep.*, **41**, BSR20211191, <https://doi.org/10.1042/BSR20211191>.
47. Hatoum, A. S., Colbert, S. M. C., Johnson, E. C., Huggett, S. B., Deak, J. D., Pathak, G. A., Jennings, M. V., Paul, S. E., Karcher, N. R., Hansen, I., Baranger, D. A. A., Edwards, A., Grotzinger, A. D., Substance Use Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Adkins, D. E., Adkins, A. E., Alanne-Kinnunen, M., Alexander, J. C., Aliev, F., Bacanu, S.-A., Batzler, A., Biernacka, J. M., Bierut, L. J., Bigdeli, T. B., Blagonravova, A., et al. (2023) Multivariate genome-wide association meta-analysis of over 1 million subjects identifies loci underlying multiple substance use disorders, *Nat. Mental Health*, **1**, 210-223, <https://doi.org/10.1038/s44220-023-00034-y>.
48. Abels, E. R., and Breakefield, X. O. (2016) Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **36**, 301-312, <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>.
49. Shahjin, F., Guda, R. S., Schaal, V. L., Odegaard, K., Clark, A., Gowen, A., Xiao, P., Lisco, S. J., Pendyala, G., and Yelamanchili, S. V. (2019) Brain-derived extracellular vesicle microRNA signatures associated with *in utero* and postnatal oxycodone exposure, *Cells*, **9**, 21, <https://doi.org/10.3390/cells9010021>.

50. Ben Maamar, M., Nilsson, E. E., and Skinner, M. K. (2021) Epigenetic transgenerational inheritance, gametogenesis and germline development, *Biol. Reprod.*, **105**, 570-592, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab085>.
51. Lyu, Y., Kaddour, H., Kopcho, S., Panzner, T. D., Shouman, N., Kim, E.-Y., Martinson, J., McKay, H., Martinez-Maza, O., Margolick, J. B., Stapleton, J. T., and Okeoma, C. M. (2019) Human immunodeficiency virus (HIV) infection and use of illicit substances promote secretion of semen exosomes that enhance monocyte adhesion and induce actin reorganization and chemotactic migration, *Cells*, **8**, 1027, <https://doi.org/10.3390/cells8091027>.
52. Jarvis, R., Tamashiro-Orrego, A., Promes, V., Tu, L., Shi, J., and Yang, Y. (2020) Cocaine self-administration and extinction inversely alter neuron to glia exosomal dynamics in the nucleus accumbens, *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00581>.
53. Men, Y., Yelick, J., Jin, S., Tian, Y., Chiang, M. S. R., Higashimori, H., Brown, E., Jarvis, R., and Yang, Y. (2019) Exosome reporter mice reveal the involvement of exosomes in mediating neuron to astroglia communication in the CNS, *Nat. Commun.*, **10**, 4136, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11534-w>.
54. Babuta, M., Furi, I., Bala, S., Bukong, T. N., Lowe, P., Catalano, D., Calenda, C., Kodys, K., and Szabo, G. (2019) Dysregulated autophagy and lysosome function are linked to exosome production by micro-RNA 155 in alcoholic liver disease, *Hepatology*, **70**, 2123, <https://doi.org/10.1002/hep.30766>.
55. Crenshaw, B. J., Kumar, S., Bell, C. R., Jones, L. B., Williams, S. D., Saldanha, S. N., Joshi, S., Sahu, R., Sims, B., and Matthews, Q. L. (2019) Alcohol modulates the biogenesis and composition of microglia-derived exosomes, *Biology*, **8**, 25, <https://doi.org/10.3390/biology8020025>.
56. Koul, S., Schaal, V. L., Chand, S., Pittenger, S. T., Nanoth Vellichirammal, N., Kumar, V., Guda, C., Bevins, R. A., Yelamanchili, S. V., and Pendyala, G. (2020) Role of brain derived extracellular vesicles in decoding sex differences associated with nicotine self-administration, *Cells*, **9**, 1883, <https://doi.org/10.3390/cells9081883>.
57. Ma, R., Kutchy, N. A., Wang, Z., and Hu, G. (2023) Extracellular vesicle-mediated delivery of anti-miR-106b inhibits morphine-induced primary ciliogenesis in the brain, *Mol. Ther.*, **31**, 1332-1345, <https://doi.org/10.1016/j.mtthe.2023.03.030>.
58. Ma, R., Kutchy, N. A., and Hu, G. (2021) Astrocyte-derived extracellular vesicle-mediated activation of primary ciliary signaling contributes to the development of morphine tolerance, *Biol. Psychiatry*, **90**, 575-585, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.06.009>.
59. Channer, B., Matt, S. M., Nickoloff-Bybel, E. A., Pappa, V., Agarwal, Y., Wickman, J., and Gaskill, P. J. (2023) Dopamine, immunity, and disease, *Pharmacol. Rev.*, **75**, 62-158, <https://doi.org/10.1124/pharmrev.122.000618>.
60. Ibáñez, F., Montesinos, J., Ureña-Peralta, J. R., Guerri, C., and Pascual, M. (2019) TLR4 participates in the transmission of ethanol-induced neuroinflammation via astrocyte-derived extracellular vesicles, *J. Neuroinflamm.*, **16**, 136, <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1529-x>.
61. Periyasamy, P., Liao, K., Kook, Y. H., Niu, F., Callen, S. E., Guo, M.-L., and Buch, S. (2018) Cocaine-mediated down-regulation of miR-124 activates microglia by targeting KLF4 and TLR4 signaling, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 3196-3210, <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0584-5>.
62. Chand, S., Gowen, A., Savine, M., Moore, D., Clark, A., Huynh, W., Wu, N., Odegaard, K., Weyrich, L., Bevins, R. A., Fox, H. S., Pendyala, G., and Yelamanchili, S. V. (2021) A comprehensive study to delineate the role of an extracellular vesicle-associated microRNA-29a in chronic methamphetamine use disorder, *J. Extracell. Vesicles*, **10**, e12177, <https://doi.org/10.1002/jev2.12177>.
63. Meng, Y., Ding, J., Li, C., Fan, H., He, Y., and Qiu, P. (2020) Transfer of pathological  $\alpha$ -synuclein from neurons to astrocytes via exosomes causes inflammatory responses after METH exposure, *Toxicol. Lett.*, **331**, 188-199, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.06.016>.
64. Kumar, A., Kim, S., Su, Y., Sharma, M., Kumar, P., Singh, S., Lee, J., Furdui, C. M., Singh, R., Hsu, F.-C., Kim, J., Whitlow, C. T., Nader, M. A., and Deep, G. (2021) Brain cell-derived exosomes in plasma serve as neurodegeneration biomarkers in male cynomolgus monkeys self-administrating oxycodone, *EBioMedicine*, **63**, 103192, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103192>.
65. Sil, S., Singh, S., Chempathy, D. T., Chivero, E. T., Gordon, L., and Buch, S. (2021) Astrocytes & astrocyte derived extracellular vesicles in morphine induced amyloidopathy: implications for cognitive deficits in opiate abusers, *Aging Disease*, **12**, 1389-1408, <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0406>.
66. Li, J. J., Wang, B., Kodali, M. C., Chen, C., Kim, E., Patters, B. J., Lan, L., Kumar, S., Wang, X., Yue, J., and Liao, F.-F. (2018) *In vivo* evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation, *J. Neuroinflamm.*, **15**, 8, <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1038-8>.
67. Caobi, A., Bonilla, J., Gomez, M., Andre, M., Yndart, A., Fernandez-Lima, F. A., Nair, M. P., and Raymond, A. D. (2023) HIV-1 and opiates modulate miRNA profiles in extracellular vesicles, *Front. Immunol.*, **14**, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1259998>.

68. Mukherjee, S., Cabrera, M. A., Boyadjieva, N. I., Berger, G., Rousseau, B., and Sarkar, D. K. (2020) Alcohol increases exosome release from microglia to promote complement C1q-induced cellular death of proopiomelanocortin neurons in the hypothalamus in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders, *J. Neurosci.*, **40**, 7965-7979, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0284-20.2020>.
69. Kumar, S., Crenshaw, B. J., Williams, S. D., Bell, C. R., Matthews, Q. L., and Sims, B. (2021) Cocaine-specific effects on exosome biogenesis in microglial cells, *Neurochem. Res.*, **46**, 1006-1018, <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03231-2>.
70. Landfield, Q., Saito, M., Hashim, A., Canals-Baker, S., Sershen, H., Levy, E., and Saito, M. (2021) Cocaine induces sex-associated changes in lipid profiles of brain extracellular vesicles, *Neurochem. Res.*, **46**, 2909-2922, <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03395-x>.
71. Ibáñez, F., Ureña-Peralta, J. R., Costa-Alba, P., Torres, J.-L., Laso, F.-J., Marcos, M., Guerri, C., and Pascual, M. (2020) Circulating microRNAs in extracellular vesicles as potential biomarkers of alcohol-induced neuroinflammation in adolescence: gender differences, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6730, <https://doi.org/10.3390/ijms21186730>.
72. Liu, Y., Li, J., Bu, H., Wang, H., Zhang, Y., Shen, Q., Li, M., Lu, Z., Rong, X., Zheng, D., and Peng, Y. (2021) Circular RNA expression alteration identifies a novel circulating biomarker in serum exosomal for detection of alcohol dependence, *Addict Biol.*, **26**, e13031, <https://doi.org/10.1111/adb.13031>.
73. Chen, F., Xu, Y., Shi, K., Zhang, Z., Xie, Z., Wu, H., Ma, Y., Zhou, Y., Chen, C., Yang, J., Wang, Y., Robbins, T. W., Wang, K., and Yu, J. (2022) Multi-omics study reveals associations among neurotransmitter, extracellular vesicle-derived microRNA and psychiatric comorbidities during heroin and methamphetamine withdrawal, *Biomed. Pharmacother.*, **155**, 113685, <https://doi.org/10.1016/j.bioph.2022.113685>.
74. Chen, F., Zou, L., Dai, Y., Sun, J., Chen, C., Zhang, Y., Peng, Q., Zhang, Z., Xie, Z., Wu, H., Tian, W., Yu, X., Yu, J., and Wang, K. (2021) Prognostic plasma exosomal microRNA biomarkers in patients with substance use disorders presenting comorbid with anxiety and depression, *Sci. Rep.*, **11**, 6271, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84501-5>.
75. Kim, B., Tag, S. H., Kim, Y. S., Cho, S. N., and Im, H.-I. (2022) Circulating microRNA miR-137 as a stable biomarker for methamphetamine abstinence, *Psychopharmacology (Berl)*, **239**, 831-840, <https://doi.org/10.1007/s00213-022-06074-z>.
76. Zhang, Z., Wu, H., Peng, Q., Xie, Z., Chen, F., Ma, Y., Zhang, Y., Zhou, Y., Yang, J., Chen, C., Li, S., Zhang, Y., Tian, W., Wang, Y., Xu, Y., Luo, H., Zhu, M., Kuang, Y.-Q., Yu, J., and Wang, K. (2021) Integration of molecular inflammatory interactome analyses reveals dynamics of circulating cytokines and extracellular vesicle long non-coding RNAs and mRNAs in heroin addicts during acute and protracted withdrawal, *Front. Immunol.*, **12**, 730300, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.730300>.
77. Ganesh, S., Lam, T. T., Garcia-Milian, R., Cyril D'Souza, D., Nairn, A. C., Elgert, K., Eitan, E., and Ranganathan, M. (2023) Peripheral signature of altered synaptic integrity in young onset cannabis use disorder: a proteomic study of circulating extracellular vesicles, *World J. Biol. Psychiatry*, **24**, 603-613, <https://doi.org/10.1080/15622975.2023.2197039>.
78. Kodidela, S., Wang, Y., Patters, B. J., Gong, Y., Sinha, N., Ranjit, S., Gerth, K., Haque, S., Cory, T., McArthur, C., Kumar, A., Wan, J. Y., and Kumar, S. (2020) Proteomic profiling of exosomes derived from plasma of HIV-infected alcohol drinkers and cigarette smokers, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **15**, 501-519, <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09853-2>.
79. Kodidela, S., Gerth, K., Sinha, N., Kumar, A., Kumar, P., and Kumar, S. (2020) Circulatory astrocyte and neuronal EVs as potential biomarkers of neurological dysfunction in HIV-infected subjects and alcohol/tobacco users, *Diagnostics*, **10**, 349, <https://doi.org/10.3390/diagnostics10060349>.
80. Kodidela, S., Ranjit, S., Sinha, N., McArthur, C., Kumar, A., and Kumar, S. (2018) Cytokine profiling of exosomes derived from the plasma of HIV-infected alcohol drinkers and cigarette smokers, *PLoS One*, **13**, e0201144, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201144>.
81. Ezquer, F., Quintanilla, M. E., Morales, P., Santapau, D., Ezquer, M., Kogan, M. J., Salas-Huenuleo, E., Herrera-Marschitz, M., and Israel, Y. (2019) Intranasal delivery of mesenchymal stem cell-derived exosomes reduces oxidative stress and markedly inhibits ethanol consumption and post-deprivation relapse drinking, *Addict Biol.*, **24**, 994-1007, <https://doi.org/10.1111/adb.12675>.
82. Mellado, S., Cuesta, C. M., Montagud, S., Rodríguez-Arias, M., Moreno-Manzano, V., Guerri, C., and Pascual, M. (2023) Therapeutic role of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in neuroinflammation and cognitive dysfunctions induced by binge-like ethanol treatment in adolescent mice, *CNS Neurosci. Ther.*, **29**, 4018-4031, <https://doi.org/10.1111/cns.14326>.

## EXTRACELLULAR VESICLES AS PROMISING MARKERS OF ADDICTIVE DISORDERS

### Review

V. V. Severtsev<sup>1,2\*</sup>, M. A. Pavkina<sup>1</sup>, N. N. Ivanets<sup>1</sup>,  
M. A. Vinnikova<sup>1,3</sup>, and A. A. Yakovlev<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Sechenov First Moscow State Medical University  
of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University),  
119048 Moscow, Russia; e-mail address: severtsevmed@gmail.com

<sup>2</sup> Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine  
of Federal Medical Biological Agency, 143007 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Moscow Scientific and Practical Center of Narcology  
of Moscow Healthcare Department, 109390 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,  
117485 Moscow, Russia

<sup>5</sup> Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department  
115419 Moscow, Russia

The studying the role and condition of small extracellular vesicles (sEV) in mental and addictive disorders is an extremely promising area. sEV contain proteins on the membrane that protect against destruction by their own immunity, and due to their size, they are able to cross the blood-brain barrier. These properties make it possible to consider sEV as potential biomarkers reflecting the processes occurring in the brain, and at the same time available for study in peripheral blood samples. Studies have shown that the amount, biogenesis and contents of explosives change significantly when exposed to psychoactive substances both *in vitro* and *in vivo*. The results of the analysis of modern literature demonstrate the presence of numerous potential markers of addictive pathology among the loads carried by sEV, nevertheless, the real diagnostic significance of each of them requires to be studied. Many data indicate the effect of psychoactive substances on GTPases of the Rab family, Toll-like receptors, the complement system and cytokines. Also, in several studies, sex differences in sEV changes were found in response to substance exposure. Most studies indicate the involvement of sEV in the regulation of neuroinflammatory processes, interaction between glial cells and neurons, as well as between peripheral cells and cells of the central nervous system. The authors of the review formulated a hypothesis about the presence of two mechanisms-stages in which sEV is involved: "fast" – in response to the effects of substances, providing neuroplasticity, and "slow" – the result of impaired biogenesis of sEV and the appearance of aberrant vesicle variants.

**Keywords:** small extracellular vesicles, exosomes, biomarkers in psychiatry, addictology, fundamental mechanisms of addictive disorders, dependence syndrome

## РАЗНООБРАЗИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ

### Обзор

© 2024 Е.Ш. Кулигина<sup>1\*</sup>, Г.А. Янус<sup>1,2</sup>, Е.Н. Имянитов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,  
197758 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: kate.kuligina@gmail.com

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

Поступила в редакцию 26.08.2024

После доработки 30.09.2024

Принята к публикации 01.10.2024

За последнее десятилетие жидкостная биопсия (ЖБ) стала одним из рутинных диагностических тестов, применяемых в практической онкологии. Её возможности включают раннюю диагностику, молекулярное типирование, уточнение прогноза онкологических заболеваний, а также предсказание и мониторинг ответа опухоли на терапию. Обычно ЖБ представляет собой экспрессию из плазмы крови и молекулярный анализ только одной из фракций опухоль-ассоциированных молекул или клеточных элементов – циркулирующих опухолевых ДНК (цодНК), опухолевых клеток (ЦОК), РНК (цоРНК) или содергимого внеклеточных везикул (экзосом, ВВ). Несмотря на техническое совершенство методов молекулярного анализа циркулирующих онкомаркеров, такой вариант диагностики имеет ограниченную информативность. У значительного числа онкологических пациентов (10–50% случаев, в зависимости от типа опухоли) не удается выявить и проанализировать ни одного из этих анализов, несмотря на наличие в организме крупных прогрессирующих неопластических очагов. Есть основания полагать, что разнородные фракции циркулирующих в крови опухоль-специфических биомаркеров дополняют друг друга, и что одновременный анализ нескольких фракций поможет не только повысить чувствительность метода, но и более точно охарактеризовать и спрогнозировать клиническую ситуацию. Данный обзор рассматривает возможности и преимущества применения комбинированного мультипараметрического подхода к ЖБ, подразумевающего тестирование нескольких циркулирующих анализов в одном образце крови.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** жидкостная биопсия, цодНК, экзосомы, ЦОК, цоРНК, белковые онкомаркеры, прогностические маркеры, предиктивные маркеры, рак.

DOI: 10.31857/S0320972524110121 EDN: IKGNCM

### ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия жидкостная биопсия (ЖБ) преодолела путь от сугубо экспериментальной методики до рутинного диагностического инструмента, внедрённого в онкологическую практику. Её возможности включают раннюю

диагностику, молекулярное типирование, уточнение прогноза онкологических заболеваний, а также предсказание и мониторинг ответа опухоли на терапию. Одним из примечательных свойств ЖБ является способность преодолевать ограничения, присущие традиционной «тканевой» биопсии. Обходя такие сложности, как пространственная

Принятые сокращения: ВВ – внеклеточные везикулы; ЖБ – жидкостная биопсия; РЖ – рак желудка; РЛ – рак лёгкого; РМЖ – рак молочной железы; РП – рак простаты; РПЖ – рак поджелудочной железы; РТК – рак толстой кишки; РЯ – рак яичника; цодНК – циркулирующая опухолевая ДНК; ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки; СА-125 – раковый антиген-125; PSA – prostate-specific antigen, простатический специфический антиген.

\* Адресат для корреспонденции.

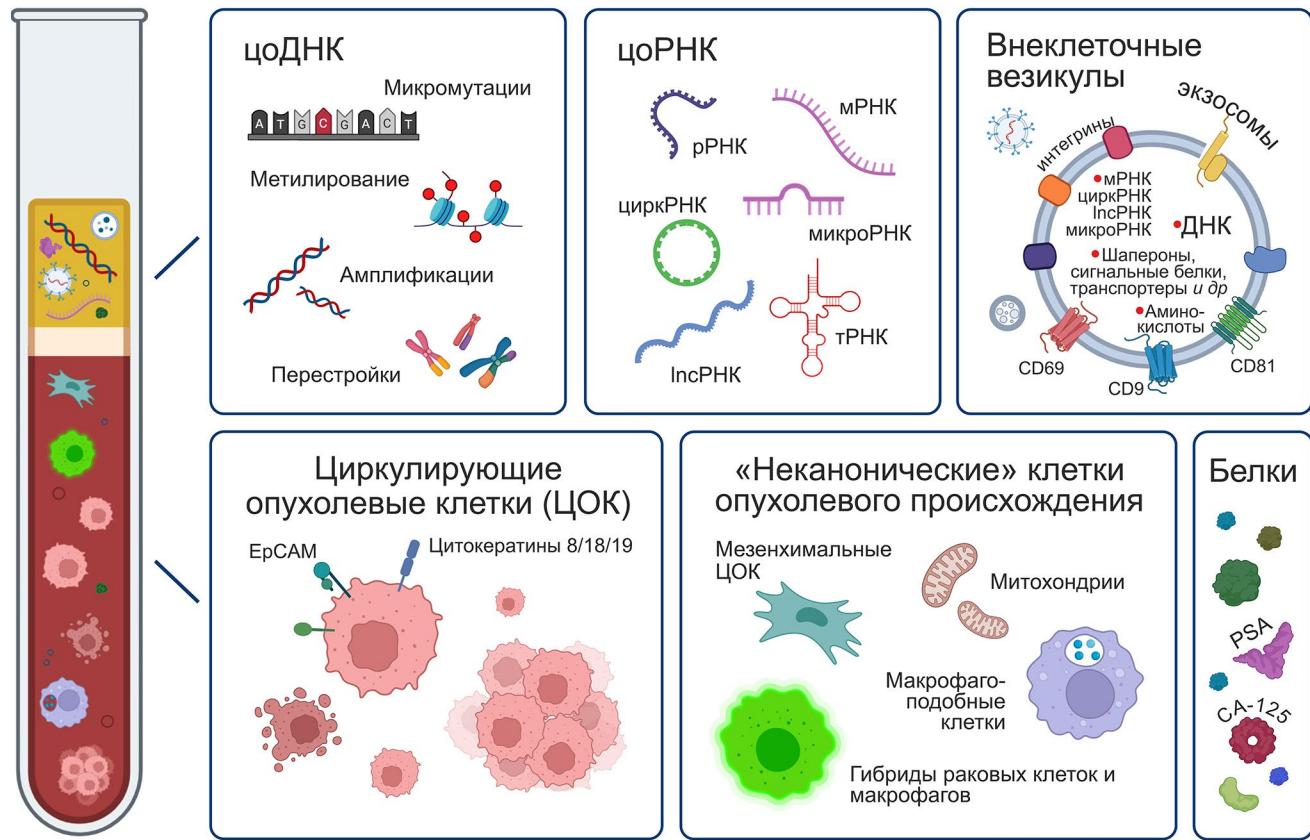


Рис. 1. Циркулирующие в периферической крови молекулы и клеточные элементы опухолевого происхождения, используемые для ЖБ

гетерогенность и травматичность серийного забора материала, ЖБ позволяет в режиме реального времени анализировать развивающуюся картину заболевания, обеспечивает количественную и качественную оценку эволюции опухоли.

Самый распространённый и стандартизованный вариант ЖБ подразумевает использование свободно циркулирующих опухолевых ДНК (цоДНК), поскольку этот анализ проще всех остальных поддаётся экстракции, количественной оценке и в значительных количествах существует даже на начальных этапах заболевания. Несколько реже в клинических целях анализируют циркулирующие в кровотоке опухолевые клетки (ЦОК) и экзосомы, в которых нуклеиновые кислоты и белки защищены от деградации мембранами. За истекшее десятилетие более ста циркулирующих в крови опухолевых белков были одобрены для клинической диагностики [1]. Сами по себе протеины сыворотки крови не являются достаточно надёжными предикторами, однако их включение в цоДНК-панели увеличивает информативность ЖБ, особенно в отношении опухолей на ранних стадиях [2].

Наряду с этими более привычными маркерами в последние годы становятся всё более значимыми и другие молекулы опухолевого происхожде-

ния, свободно циркулирующие в биологических жидкостях (рис. 1). Применение высокочувствительных техник на базе РНК-секвенирования позволило выявить и охарактеризовать разнообразные фракции дрейфующих в крови опухолевых РНК, в частности, таких молекул как информационные (mRNK), длинные некодирующие (lncRNA, lncРНК), микроРНК (miRNA), кольцевые (cirRNA, циркРНК) и транспортные (tRNK) РНК [3, 4]. С помощью сканирующей лазерной цитометрии и иммуноферментного анализа было показано, что одновременно с «каноническими» неопластическими клетками из злокачественного очага в кровеносное русло проникают и другие элементы – мезенхимальные и эпителиально-мезенхимальные ЦОК (EMT-CTC), ассоциированные с опухолью макрофагоподобные клетки (cancer-associated macrophage-like cells, CAMLs), гибриды раковых клеток и макрофагов (dual-positive cells, DPcells), свободные митохондрии и т.д. [5, 6]. Соотношение фракций этих клеток и их молекулярные особенности отражают процессы, происходящие в «материнской» опухоли, и могут служить прогностическими маркерами, дополняя возможности традиционной ЖБ. Наряду с плазмой крови в качестве источника циркулирующих опухоль-специфических маркеров могут быть использо-

ваны и другие биологические жидкости – моча, спинномозговая жидкость, плевральная или перитонеальная жидкость, слюна и др. [7].

Данный обзор рассматривает преимущества применения комбинированного подхода к ЖБ, подразумевающего тестирование нескольких циркулирующих анализов в одном образце крови (т.н. мультипараметрическая ЖБ). Есть все основания полагать, что разнородные опухоль-специфические биомаркеры не конкурируют, а являются комплементарными; таким образом, одновременный анализ нескольких фракций поможет не только увеличить чувствительность метода, но и достовернее охарактеризовать и спрогнозировать клиническую ситуацию [8].

## МНОГООБРАЗИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ

**Циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК).** ЦоДНК представляет собой малочисленную фракцию свободных фрагментов ДНК длиной 160–2000 пар оснований (п.о.), которые проникают в кровеносное русло или в другие жидкости организма из опухолевого очага в результате разрушения неопластических клеток путём апоптоза, некроза, пироцитоза или других биологических процессов – активной секреции, эксцизионной репарации и т.д. [9]. ЦоДНК, как правило, более фрагментирована, чем внеклеточная ДНК из «здоровых» клеток, эта фракция обогащена фрагментами длиной 90–150 п.о. [10]. Период полураспада цоДНК в периферической крови варьирует от 15 минут до нескольких часов [11], что делает цоДНК очень подходящим маркером для оценки динамики опухоли в реальном времени [12]. В настоящее время этот циркулирующий анализ является наиболее изученным; для него оптимизированы и стандартизованы методы сбора и процессинга биоматериала [13, 14].

Прогностическая ценность динамики и состава цоДНК подтверждена практически для всех типов неоплазм, включая наиболее распространённые и социально значимые – рак лёгкого (РЛ), толстой кишки (РТК), молочной железы (РМЖ), яичника (РЯ), простаты (РП), меланомы и др. [15–17]. Концентрация в крови цоДНК при постановке диагноза, т.е. до начала лечения, может служить прогностическим маркером для пациентов с ранним РМЖ, РЯ, РЛ, РТК, меланомой [18–21]. Как правило, высокий исходный уровень цоДНК коррелирует с худшими результатами лечения и показателями продолжительности жизни. Быстрое падение уровня цоДНК вплоть до полного исчезновения в первые сутки или недели после начала таргетной терапии [22, 23], химиотерапии [24] или иммуно-

терапии [25] является благоприятным показателем и ассоциируется с лучшим ответом опухоли на воздействие и более продолжительным временем до прогрессирования (progression-free survival, PFS). Кроме того, анализ цоДНК позволяет охарактеризовать спектр молекулярных мишней опухоли, что делает его ценным инструментом для выбора таргетного лечения. При этом возможна детекция как отдельных мутаций [26], так и интегральных показателей, таких как опухолевая мутационная нагрузка (tumor mutation burden, TMB) и уровень дефицита гомологичной рекомбинации (homologous recombination deficiency, HRD) [27].

«Золотым стандартом» молекулярного анализа цоДНК признано использование сверхчувствительных модификаций полимеразной цепной реакции (droplet digital PCR (ddPCR), реже BEAMing PCR) [28, 29] и высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Safe-SeqS, TEC-Seq, CAPP-Seq + iDES, Duplex Sequencing) [21, 30]. Считается, что аналитический этап ЖБ на основе цоДНК уже приблизился к пределу своей разрешающей способности и позволяет детектировать даже единичные «мутантные» молекулы, циркулирующие в периферической крови в ничтожной концентрации 0,003–0,005% [31, 32]. Тем не менее в значительной доле случаев мутированные фрагменты опухолевой ДНК в плазме не обнаруживаются никакими методами. На практике от 10% (рак лёгкого (РЛ), рак прямой кишки, до 50% (рак щитовидной железы (РЩЖ) или почки) пациентов оказываются «плазма-негативными», несмотря на наличие у них достаточно больших прогрессирующих неопластических очагов [33, 34]. Возможным подходом к увеличению чувствительности ЖБ является использование aberrаций метилирования в качестве молекулярных маркеров [35], привлечение для экстракции цоДНК других биологических жидкостей, контактирующих с неоплазмами (поджелудочный сок, спинномозговая жидкость, слюна и др.), а также включение в анализ циркулирующих опухолевых маркеров иной природы, таких как ЦОК, экзосомы, белки, микроРНК.

**ЦОК.** Злокачественные клетки, подобно циркулирующим белковым комплексам и нуклеиновым кислотам, проникают в кровоток из первичных очагов солидных опухолей. Затем они могут выходить из кровеносных сосудов, инфильтрировать ткани, колонизировать «метастатические ниши», поэтому исследование их молекулярных особенностей очень ценно для понимания биологических механизмов метастазирования [36]. ЦОК могут дрейфовать в периферической крови как отдельные клетки или образовывать кластеры; последние обнаруживаются реже, полагают, что они более эффективно формируют метастазы [37].

Наличие и количество ЦОК используются для определения стадии злокачественного заболевания, а также в роли маркеров его прогрессирования и вероятности рецидива. Эффективность такого применения была продемонстрирована при различных локализациях карцином, включая РМЖ, РТК, РЛ, РП, рак мочевого пузыря и др. [38, 39]. Появление ЦОК наиболее характерно для метастазирующих неоплазм, требующих немедленной и интенсивной терапии, в то время как медленно растущие или «латентные» опухоли, как правило, не продуцируют ЦОК [40]. Другим многообещающим свойством ЦОК является то, что они могут сохранять жизнеспособность при изоляции и служить материалом для *in vitro* культивирования, объектом для функциональных тестов, в том числе тестирования препаратов [41] или изготовления ксеногraftов и других экспериментальных моделей [42].

Проблема использования ЦОК в качестве материала для ЖБ связана с тем, что они составляют очень небольшую долю от общего числа клеток, присутствующих в крови пациента – как правило, не более 1–10 клеток на 10 мл крови [43]. Следовательно, их обнаружение и изоляция является технически непростой задачей и требует предварительного этапа селекции и обогащения. Большинство клинических исследований ЦОК было выполнено с использованием автоматической платформы CellSearch® («Menarini Silicon Biosystems, Inc.», США, <https://www.siliconbiosystems.com/en-us/cellsearch-system>), определяющей ЦОК как ядроодержащие клетки, экспрессирующие EpCAM и цитокератины 8, 18 и/или 19, но лишенные CD45. Ограничением метода CellSearch является то, что некоторые ЦОК могут претерпевать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), в процессе которого теряется маркер EpCAM – такие трансформированные клетки становятся невидимыми для данной тест-системы. Чтобы идентифицировать клетки, совершившие ЭМП, рекомендуется использовать маркеры пластин-3 и виментин [44, 45]. Наличие таких мезенхимальных ЦОК в кровотоке само по себе является плохим прогностическим признаком и часто свидетельствует о резистентности опухоли к химиотерапии [46].

**Преимущества использования комбинации цодНК и ЦОК для увеличения информативности ЖБ.** Несмотря на существование выраженной корреляции между количеством ЦОК и концентрацией цодНК в препаратах крови онкологических пациентов, регressiveонный анализ данных Shaw et al. (2017) свидетельствует о том, что эти показатели являются независимыми предикторами выживаемости и, следовательно, могут использоваться в комбинации [47]. Взаимодополняющая

ценность ЦОК и цодНК для прогнозирования течения РЛ, РМЖ, рака печени, мочевого пузыря, а также детекции минимальной остаточной болезни (minimal residual disease, MRD) подчёркивается в целом ряде работ [48–50]. По сведениям Ye et al. [51], у больных РМЖ с высоким уровнем обоих маркеров в крови риск смерти повышен более чем в 17 раз ( $p < 0,001$ ). Интересно, что в данном исследовании синергический эффект цодНК и ЦОК был менее выражен при предсказании периода PFS, чем общей выживаемости (overall survival, OS), то есть комбинирование маркеров даёт незначительные преимущества при анализе эффективности конкретной лечебной схемы, но является очень показательным для оценки рисков метастазирования, прогрессирования и клинической агрессивности заболевания. Уровень цодНК может демонстрировать сложную динамику в ходе ответа опухоли на лечение, он напрямую отражает изменения опухолевой нагрузки в режиме реального времени. В то же время проникновение в кровоток ЦОК нарастает только во время прогрессирования заболевания [49, 52]. Примечательно, что только у 13% пациентов с РМЖ, вошедших в клиническое исследование COMET, в исходной точке не было обнаружено в плазме крови ни цодНК, ни ЦОК, при этом процент «плазма-негативных» случаев при детекции каждого маркера по отдельности был значительно выше – 26–28% [53].

Анализ спектра мутаций в цодНК с помощью метода секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) в сочетании с иммунофенотипированием ЦОК имеет ещё одно потенциально важное применение: полученные таким образом данные с высокой достоверностью предсказывают вероятные маршруты метастатического распространения первичной опухоли [52].

**Циркулирующие внеклеточные везикулы.** Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой устойчивые фосфолипидные двухслойные пузырьки, активно секретируемые живыми клетками (в том числе злокачественными) и в достаточных концентрациях циркулирующие в крови, асцитной жидкости, грудном молоке, слюне, спинномозговой жидкости и других биологических средах организма [54]. Полагают, что основным назначением ВВ является межклеточная коммуникация [55]. Согласно классификации Extracellular Vesicle Association, везикулы различного происхождения и размера подразделяются на три типа: экзосомы (40–150 нм), микровезикулы (40–1000 нм) и апоптотические тельца (800–5000 нм) [30, 56]. Экзосомы являются наиболее изученным подтипов ВВ; благодаря стабильности в крови, проникающим и миграционным способностям они влияют на развитие и диссеминацию

опухолевых клеток посредством репрограммирования иммунного микроокружения и молекулярного транспорта [57].

Экзосомы наполнены разнообразными молекулами, в основном РНК и белками, которые могут выполнять роль медиаторов онкологически значимых клеточных процессов и, таким образом, способствовать росту опухоли в отдалённых преметастатических нишах [48]. Помимо белок-кодирующих РНК, в экзосомальной фракции из плазмы крови были обнаружены регуляторные микроРНК и lncРНК, тРНК, малые ядрышковые РНК (snorNA) [58]. Все перечисленные экзосомальные молекулярные маркеры поддаются экстракции, количественному и качественному анализу и, ввиду своего обилия в периферической крови, они даже более информативны, чем микроКоличества цДНК или единичные ЦОК [5]. В отличие от свободно циркулирующих бесклеточных молекул, экзосомальные РНК защищены от деградации липидной мембраной. Они годятся для ранней диагностики, прогнозирования течения болезни и, что особенно ценно, мониторинга её ответа на терапию в реальном времени, так как производятся живыми опухолевыми клетками непосредственно в момент воздействия [48, 59]. Важно, что подобные циркулирующие везикулы потенциально способны влиять на эффективность терапии. Так, например, HER2-положительные экзосомы синтезируются клетками РМЖ в качестве «приманки» для анти-HER2-препараторов, тем самым ограничивая их активность в отношении неопластических клеток [60]. Экзосомы, синтезированные опухолевыми фибробластами, могут способствовать приобретению устойчивости неоплазмы к радиотерапии за счёт усиления роста стволовых клеток и распространению свойств резистентности между очагами. Предполагается, что медиатором этого процесса является микроРНК miR-93-5р [61]. miR-934, miR-186-5р, miR-497-5р и miR-29a-3р, переносимые экзосомами, были идентифицированы как регуляторы прогрессии РЛ, что позволяет рассматривать их как потенциальные биомаркеры [62, 63]. Экзосомальные lncРНК, такие как ZEB2-AS1, UFC1 и circUSP7, а также circSATB2 и опухолевые экзосомальные белки продемонстрировали потенциал для ранней диагностики РЛ [30, 64]. По некоторым данным, иммуногистохимическая окраска ВВ с большой точностью и чувствительностью характеризует статус экспрессии в опухоли некоторых клинически значимых молекул, таких как HER2 или PD-L1 [65, 66]. На поверхности экзосом располагаются тканеспецифические белки-интегрины, которые обеспечивают доставку содержимого по заданному «адресу» – в клетки преметастатической ниши [67, 68]. Анализ «интегринового кода» экзосом с помощью

иммуноблоттинга или иммуноферментного анализа (ELISA) может предоставлять информацию о потенциальной локализации метастазов, а поверхностные эпитопы мембран дают сведения о клетках-продуцентах экзосом [30].

Ключевым и наиболее сложным этапом молекулярной диагностики на основе экзосом является их эффективная экстракция и очистка. Для этого разработаны методы с использованием гель-фильтрационной хроматографии исключения по размеру (size exclusion chromatography, SEC), преципитационной иммуноаффинной хроматографии, микрофлюидики и ультрацентрифугирования [48, 69]. Техническая нетривиальность преаналитических этапов препятствует широкому внедрению этого варианта ЖБ в клиническую практику. Привлекательной является идея применения в терапии искусственных экзосом, нагруженных онкосупрессорными микроРНК или токсичными препаратами [70]. Встраивание в мембрану таких карго-конструкций специфического набора интегринов обеспечит таргетную доставку содержимого в опухолевые клетки определённого гистотипа [71].

**Белковые маркеры.** ЖБ, основанная на обнаружении белковых биомаркеров в периферической крови, была внедрена в клиническую практику значительно раньше других разновидностей ЖБ, но до сих пор имеет большой потенциал для выявления и мониторинга онкологических заболеваний [72]. В табл. 1 представлен обзор циркулирующих белковых маркеров, которые ассоциированы с разными видами рака, включая как признанные и повсеместно распространённые (CA-125, CEA, PSA, NSE), так и менее изученные (ITGAV, GAL-1, HE4 и др.). Измерение в крови уровня простатического специфического антигена (prostate-specific antigen, PSA, ПСА) было рекомендовано Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) для идентификации рака предстательной железы ещё в 1986 году, и этот онкомаркер до сих пор широко используется, однако его реальная клиническая значимость постоянно обсуждается. Дело в том, что повышенный уровень PSA специфичен не только для РП, но и для других распространённых патологий, таких как простатит и доброкачественная гиперплазия предстательной железы [73]. Более того, существует целый ряд факторов (возраст, расовая принадлежность, индекс массы тела, приём лекарств и др.), которые необходимо учитывать, чтобы корректно определять индивидуальное пороговое значение этого показателя. По этим причинам диагностика на основании одного только PSA в значительной доле случаев приводит к ложноположительным результатам тестирования [74].

**Таблица 1.** Белковые онкомаркеры, циркулирующие в крови

Белок	Локализация опухоли	Комментарий	Ссылка
CA-125	РЯ, другие раки: РТМ, РЛ, РМЖ, РПЖ, лимфомы	входит в CancerSEEK	[75, 76]
CEA	РТК, РЖ, РМЖ, РПЖ, РЛ, РШЖ	входит в CancerSEEK	[75, 76]
CA19-9	РПЖ, холангiocарцинома, РТК, РЖ, рак пищевода, печени	входит в CancerSEEK; классический биомаркер	[75–77]
HGF	РЛ, РТК, рак почки, РМЖ, РП	входит в CancerSEEK; проангиогенный фактор	[75, 76]
OPN	РМЖ, РПЖ, рак печени, РЯ, РЛ	входит в CancerSEEK	[75, 76]
MPO	РЯ и другие	входил в первую версию CancerSEEK; маркер активации нейтрофилов	[75]
TIMP-1	РТК, РЖ, РЯ, РПЖ и другие	входит в CancerSEEK; хорошо дополняет CA19-9. Универсальный, но низкоспецифичный маркер	[75–77]
PRL	РМЖ, РЛ, РЯ (?)	входит в CancerSEEK	[75, 76]
CA15-3	РМЖ	вошёл в новую версию CancerSEEK	[76]
AFP	рак печени, герминогенные опухоли	вошёл в новую версию CancerSEEK	[76]
HABP2, CD163, AFP, PIVKA-II	рак печени	достаточная предиктивная ценность. Из дополнений к AFP: PIVKA-II – самый ценный маркер	[78]
HE4	РЯ	дополняет CA-125, более специфичный, менее чувствительный; превосходит CA-125 по аналитическим показателям у premenopausalных женщин	[79]
ITGAV	РЯ	дополняет CA-125 + HE4	[80]
SEZ6L	РЯ	дополняет CA-125 + HE4	[80]
CYFRA21-1	РЛ	известный дополнительный маркер для РЛ	[81]
Pro-SFTPB	РЛ	известный дополнительный маркер для РЛ	[82]
NSE	мелкоклеточный РЛ, нейроэндокринный рак, нейробластома; другие: немелкоклеточный РЛ, рак печени, саркома Меркеля	хорошо известный маркер. Относительно редкие опухоли	[83]
Хромогранин А (chromo-granin A)	нейроэндокринный рак	хорошо известный маркер. Относительно редкие опухоли	[84]

Таблица 1 (окончание)

Белок	Локализация опухоли	Комментарий	Ссылка
ProGRP	мелкоклеточный РЛ	превосходит более традиционный NSE при выявлении этой цели	[81]
S100	меланома	хорошо известный маркер	[84]
SCC	плоскоклеточный РЛ, другие плоскоклеточные раки	низкая чувствительность	[81]
PSA	РП	субоптимальные аналитические характеристики	[85]
SPARC	BRCA1/2+ РЯ	именно у носителей BRCA1/2 очень значительно повышается концентрация при возникновении РЯ	[86]
THBS1	BRCA1/2+ РЯ	именно у носителей BRCA1/2 очень значительно повышается концентрация при возникновении РЯ	[86]
CA 72-4	РЖ, РЯ	—	[84]
CA27.29	РМЖ	—	[84]
Тиреоглобулин (thyroglobulin)	РЩЖ	—	[84]
Кальцитонин (calcitonin)	РЩЖ	работает в случае мутаций RET	рекомендации Американской тиреоидной ассоциации (ATA guidelines)
Мезотелин (mesothelin)	мезотелиома	—	[87]
beta-hCG	трофобластическая болезнь, рак яичка	беременность может быть причиной ложноположительных результатов	[84]
LDH	герминогенные опухоли, меланома	—	[88]
β2-микроглобулин (beta-2 microglobulin, β2-M)	миелома, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфомы	—	[88]
CD20; CD19, CD22, CD25, CD30, CD33	неходжкинская лимфома, другие гемобластозы	—	[88]
GAL-1	РПЖ	—	[89]
GAL-3	РПЖ	—	[89]
THBS2	РПЖ	—	[89]

Примечание. РЖ – рак желудка, РПЖ – рак поджелудочной железы, РТМ – рак тела матки, СА-125 – рако-вый антиген-125

Другой популярный онкомаркер, содержащийся в сыворотке крови, раковый антиген-125 (CA-125), на протяжении последних четырёх десятилетий широко применялся в качестве первичного маркера РЯ [90]. Однако методам, используемым для тестирования уровня CA-125 в крови, не хватает чувствительности (~75%) и специфичности (~94%), необходимых для своевременного выявления РЯ в популяционных масштабах [91]. Рост уровня CA-125 в сыворотке наблюдается при менструации, эндометриозе и беременности, что может быть причиной ложноположительного теста в значительном числе случаев [92, 93]. Высокая концентрация CA-125 в сыворотке обнаруживается у 75–90% больных РЯ на поздних стадиях и только в 23–50% случаях раннего РЯ [93]. Таким образом, сейчас принято считать, что этот биомаркер сам по себе не годится для своевременной диагностики заболевания, он рутинно используется для мониторинга эффективности терапии только в случаях достоверно установленного повышения уровня CA-125 до начала лечения.

Повысить информативность «белковой» ЖБ можно за счёт включения в панели для тестирования дополнительных белковых маркеров [1], однако даже самые современные протеомные методы количественного анализа циркулирующих белков не достигают необходимой диагностической точности [2, 94]. Гораздо более перспективными являются подходы, сочетающие детекцию белковых и цДНК-маркеров, как это было реализовано, например, в коммерческой панели CancerSEEK [8, 75].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При всём техническом совершенстве методов молекулярного анализа циркулирующих онкомаркеров, ЖБ, выполненная на базе единственного анализа, имеет ограниченную информативность. Мультипараметрический подход, объединяющий результаты тестирования нескольких разнородных циркулирующих фракций, может стать гораздо более чувствительным и полнее отражать характеристики заболевания [95, 96]. Однако наряду с дополнительными возможностями в ходе реализации такого комбинированного исследования возникают проблемы, которые важно признать и решить.

Прежде всего, преаналитический этап мульти modalной ЖБ, связанный со сбором, хранением и подготовкой биоматериала, требует стандартизации и унификации протоколов. Действительно, детекция разнородных циркулирующих биомаркеров – нуклеиновых кислот, клеток, экзосом и белков – основана на специфических методи-

ках хранения и экстракции. Таким образом, для надёжного анализа могут понадобиться разные пробирки с консервантами для взятия крови [97]. Следовательно, для проведения комбинированных тестов будет необходим больший объём крови, чем обычно требуется, что может оказаться затруднительным для пациента. Чтобы минимизировать необходимое количество крови и обеспечить сохранность анализов, были разработаны протоколы, позволяющие параллельно изолировать несколько биомаркеров из одной аликвоты. Так, например, многопараметрический подход ELIMA («Всё из одного образца крови») включал в себя анализ экзосомальной РНК, мРНК из ЦОК, геномной ДНК из ЦОК и цДНК всего из 18 мл крови с ЭДТА [98, 99]. Интеграция этих четырёх анализов позволила одновременно учитывать транскрипционную и геномную сложность опухоли; такая модификация ЖБ продемонстрировала высокую чувствительность и прогностическую значимость.

Ещё одним примером успешного применения мульти modalного теста для скрининга онкологических заболеваний явилась коммерческая панель CancerSEEK, сочетающая девять белковых онкомаркеров и 61 мутантный локус в цДНК. В исследовании-прототипе CancerSEEK применяли в отношении 1005 пациентов, у которых были диагностированы карциномы восьми разных локализаций (яичника, печени, желудка, поджелудочной железы, пищевода, колоректальной, лёгких и молочной железы) на разных стадиях прогрессирования. Пациентов, выявленных при скрининге, подвергали верифицирующему исследованию при помощи ПЭТ-КТ. Заболевание было детектировано со специфичностью > 99% и с чувствительностью 43%, 73% и 78% для стадий I, II и III соответственно. Показано клиническое и экономическое преимущество подобного подхода перед стандартными рекомендациями по диспансеризации. Эти результаты обнадёживают, но очевидно, что методу есть куда совершенствоваться – более половины случаев рака I стадии оказались пропущенными [75, 100]. По-видимому, будущее ЖБ лежит именно в области создания специализированных мульти modalных панелей, комбинирующих ДНК-, РНК- и белковые маркеры клеточного и экзосомального происхождения с учётом молекулярно-патогенетических особенностей опухолей разных локализаций и оптимизированных под конкретную задачу – первичный скрининг, детекция остаточной опухоли, прогнозирование или мониторинг ответа на терапию.

**Вклад авторов.** Е.Ш. Кулигина – исходная концепция работы, написание текста, иллю-

стации; Г.А. Янус – обсуждение и доработка; Е.Н. Имянитов – редактирование текста статьи и обсуждение.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-45-10038).

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tran, D., Beeler, J. S., Liu, J., Wiley, B., Chan, I. C. C., Xin, Z., Kramer, M. H., Batchi-Bouyou, A. L., Zong, X., Walter, M. J., Petrone, G. E. M., Chlamydas, S., Ferraro, F., Oh, S. T., Link, D. C., Busby, B., Cao, Y., and Bolton, K. L. (2024) Plasma proteomic signature predicts myeloid neoplasm risk, *Clin. Cancer. Res.*, **30**, 3220-3228, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-3468>.
2. Ding, Z., Wang, N., Ji, N., and Chen, Z. S. (2022) Proteomics technologies for cancer liquid biopsies, *Mol. Cancer*, **21**, 53, <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01526-8>.
3. Hu, H., Song, H., Han, B., Zhao, H., and He, J. (2024) Tumor-educated platelet RNA and circulating free RNA: emerging liquid biopsy markers for different tumor types, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **29**, 80, <https://doi.org/10.31083/j.fbl2902080>.
4. Kan, C. M., Pei, X. M., Yeung, M. H. Y., Jin, N., Ng, S. S. M., Tsang, H. F., Cho, W. C. S., Yim, A. K.-Y., Yu, A. C.-S., and Wong, S. C. C. (2023) Exploring the role of circulating cell-free RNA in the development of colorectal cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 11026, <https://doi.org/10.3390/ijms241311026>.
5. Nicolò, E., Gianni, C., Pontolillo, L., Serafini, M. S., Munoz-Arcos, L. S., Andreopoulou, E., Curigliano, G., Reduzzi, C., and Cristofanilli, M. (2024) Circulating tumor cells: towards a comprehensive liquid biopsy approach in breast cancer, *Transl. Breast Cancer Res.*, **5**, 10, <https://doi.org/10.21037/tbcr-23-55>.
6. Song, X., Hu, W., Yu, H., Wang, H., Zhao, Y., Korngold, R., and Zhao, Y. (2020) Existence of circulating mitochondria in human and animal peripheral blood, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2122, <https://doi.org/10.3390/ijms21062122>.
7. Tivey, A., Church, M., Rothwell, D., Dive, C., Cook, N. (2022) Circulating tumour DNA – looking beyond the blood, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **19**, 600-612, <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00660-y>.
8. Keup, C., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2022) Combinatorial power of cfDNA, CTCs and EVs in oncology, *Diagnostics (Basel)*, **12**, 870, <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040870>.
9. Hu, Z., Chen, H., Long, Y., Li, P., and Gu, Y. (2021) The main sources of circulating cell-free DNA: apoptosis, necrosis and active secretion, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **157**, 103166, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103166>.
10. Mouliere, F., Chandrananda, D., Piskorz, A. M., Moore, E. K., Morris, J., Ahlborn, L. B., Mair, R., Goranova, T., Marass, F., Heider, K., Wan, J. C. M., Supernat, A., et al. (2018) Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis, *Sci. Transl. Med.*, **10**, eaat4921, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat4921>.
11. Fleischhacker, M., and Schmidt, B. (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey, *Biochim. Biophys. Acta*, **1775**, 181-232, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.10.001>.
12. Li, Y. Z., Kong, S. N., Liu, Y. P., Yang, Y., and Zhang, H. M. (2023) Can liquid biopsy based on ctDNA/cfDNA replace tissue biopsy for the precision treatment of EGFR-mutated NSCLC? *J. Clin. Med.*, **12**, 1438, <https://doi.org/10.3390/jcm12041438>.
13. Peng, H., Pan, M., Zhou, Z., Chen, C., Xing, X., Cheng, S., Zhang, S., Zheng, H., and Qian, K. (2024) The impact of preanalytical variables on the analysis of cell-free DNA from blood and urine samples, *Front. Cell Dev. Biol.*, **12**, 1385041, <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1385041>.
14. Diefenbach, R. J., Lee, J. H., Kefford, R. F., Rizos, H. (2018) Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA, *Cancer Genet.*, **228-229**, 21-27, <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2018.08.005>.
15. Ohmura, H., Hanamura, F., Okumura, Y., Ando, Y., Masuda, T., Mimori, K., Akashi, K., and Baba, E. (2024) Liquid biopsy for breast cancer and other solid tumors: a review of recent advances, *Breast Cancer*, Mar 16, <https://doi.org/10.1007/s12282-024-01556-8>.
16. Reichert, Z. R., Morgan, T. M., Li, G., Castellanos, E., Snow, T., Dall'Olio, F. G., Madison, R. W., Fine, A. D., Oxnard, G. R., Graf, R. P., and Stover, D. G. (2023) Prognostic value of plasma circulating tumor DNA fraction across four common cancer types: a real-world outcomes study, *Ann. Oncol.*, **34**, 111-120, <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.09.163>.
17. Tie, J., Cohen, J. D., Lo, S. N., Wang, Y., Li, L., Christie, M., Lee, M., Wong, R., Kosmider, S., Skinner, I., Wong, H. L., Lee, B., Burge, M. E., Yip, D., Karapetis, C. S., Price, T. J., Tebbutt, N. C., Haydon, A. M., Ptak, J., et al. (2021) Prognostic significance of postsurgery circulating tumor DNA in nonmetastatic colorectal cancer: individual patient pooled analysis of three cohort studies, *Int. J. Cancer*, **148**, 1014-1026, <https://doi.org/10.1002/ijc.33312>.

18. Zhang, X., Feng, R., Xu, Y., Yang, L., Xie, F., Yang, H., Wang, S., Peng, Y., Liu, M., Wang, C., and Wang, S. (2024) Baseline circulating tumor DNA predicts long-term survival outcomes for patients with early breast cancer, *Gland Surgery*, **13**, 684-696, <https://doi.org/10.21037/gs-24-115>.
19. Wang, R., Wang, B., Zhang, H., Liao, X., Shi, B., Zhou, Y., Zhou, C., Yan, Y., Zhang, W., Wang, K., Ge, G., Ren, Y., Tang, X., Gan, B., He, J., and Niu, L. (2024) Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy and prognosis in breast cancer patients during primary systemic therapy, *Breast*, **76**, 103738, <https://doi.org/10.1016/j.breast.2024.103738>.
20. Dobilas, A., Chen, Y., Brueffer, C., Leandersson, P., Saal, L. H., and Borgfeldt, C. (2023) Preoperative ctDNA levels are associated with poor overall survival in patients with ovarian cancer, *Cancer Genomics Proteomics*, **20** (6 suppl), 763-770, <https://doi.org/10.21873/cgp.20423>.
21. Phallen, J., Sausen, M., Adleff, V., Leal, A., Hruban, C., et al. (2017) Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA, *Sci. Transl. Med.*, **9**, eaan2415, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan2415>.
22. Moiseyenko, F. V., Kuligina, E. S., Zhabina, A. S., Belukhin, S. A., Laidus, T. A., et al. (2022) Changes in the concentration of EGFR-mutated plasma DNA in the first hours of targeted therapy allow the prediction of tumor response in patients with EGFR-driven lung cancer, *Int. J. Clin. Oncol.*, **27**, 850-862, <https://doi.org/10.1007/s10147-022-02128-6>.
23. Duffy, M. J. (2024) Circulating tumor DNA (ctDNA) as a biomarker for lung cancer: early detection, monitoring and therapy prediction, *Tumour Biol.*, **46** (s1), S283-S295, <https://doi.org/10.3233/TUB-220044>.
24. Thompson, J. C., Scholes, D. G., Carpenter, E. L., and Aggarwal, C. (2023) Molecular response assessment using circulating tumor DNA (ctDNA) in advanced solid tumors, *Br. J. Cancer*, **129**, 1893-1902, <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02445-1>.
25. Kim, S. T., Cristescu, R., Bass, A. J., Kim, K. M., Odegaard, J. I., Kim, K., Liu, X. Q., Sher, X., Jung, H., Lee, M., Lee, S., Park, S. H., Park, J. O., Park, Y. S., Lim, H. Y., Lee, H., Choi, M., Talasaz, A., Kang, P. S., et al. (2018) Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer, *Nat. Med.*, **24**, 1449-1458, <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0101-z>.
26. Bar, Y., Keenan, J. C., Niemierko, A., Medford, A. J., Isakoff, S. J., Ellisen, L. W., Bardia, A., and Vidula, N. (2024) Genomic spectrum of actionable alterations in serial cell free DNA (cfDNA) analysis of patients with metastatic breast cancer, *NPJ Breast Cancer*, **10**, 27, <https://doi.org/10.1038/s41523-024-00633-7>.
27. Lee, K., Lee, J., Choi, J., Sim, S. H., Kim, J. E., Lee, K., Lee, J., Choi, J., Sim, S. H., Kim, J. E., Kim, M. H., Park, Y. H., Kim, J. H., Koh, S.-J., Park, K. H., Kang, M. J., Ahn, M. S., Lee, K. E., Kim, H.-J., Ahn, H. K., Kim, H. J., Park, K. U., and Park, I. H. (2023) Genomic analysis of plasma circulating tumor DNA in patients with heavily pretreated HER2<sup>+</sup> metastatic breast cancer, *Sci. Rep.*, **13**, 1-10, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35925-8>.
28. Visser, E., de Kock, R., Genet, S., van den Borne, B., Soud, M. Y., Soud, M. Y.-E., Belderbos, H., Stege, G., de Saegher, M., van 't Westeinde, S., Broeren, M., Eduati, F., Deiman, B., and Scharnhorst, V. (2023) Up-front mutation detection in circulating tumor DNA by droplet digital PCR has added diagnostic value in lung cancer, *Transl. Oncol.*, **27**, 101589, <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101589>.
29. Gilson, P. (2020) Enrichment and analysis of ctDNA, *Recent results Cancer Res.*, **215**, 181-211, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-26439-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-26439-0_10).
30. Ren, F., Fei, Q., Qiu, K., Zhang, Y., Zhang, H., and Sun, L. (2024) Liquid biopsy techniques and lung cancer: diagnosis, monitoring and evaluation, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **43**, 96, <https://doi.org/10.1186/s13046-024-03026-7>.
31. Sánchez-Martín, V., López-López, E., Reguero-Paredes, D., Godoy-Ortiz, A., Domínguez-Recio, M. E., et al. (2023) Comparative study of droplet-digital PCR and absolute Q digital PCR for ctDNA detection in early-stage breast cancer patients, *Clin. Chim. Acta*, **552**, 117673, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117673>.
32. Kuligina, E. S., Meerovich, R., Zagorodnev, K. A., Kholmatov, M. M., Sokolova, T. N., Laidus, T. A., Romanko, A. A., Martianov, A. S., Anisimova, M. O., Zaitseva, O. A., Yatsuk, O. S., Yanus, G. A., and Imyanitov, E. N. (2021) Content of circulating tumor DNA depends on the tumor type and the dynamics of tumor size but is not influenced significantly by physical exercise, time of the day or recent meal, *Cancer Genet.*, **256-257**, 165-178, <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2021.05.014>.
33. Iam, W. T., Mackay, M., Ben-Shachar, R., Drews, J., Manghnani, K., Hockenberry, A. J., Cristofanilli, M., Nimeiri, H., Guinney, J., and Benson, A. B. (2024) Concurrent tissue and circulating tumor DNA molecular profiling to detect guideline-based targeted mutations in a multicancer cohort, *JAMA Netw. Open*, **7**, e2351700, <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.51700>.
34. Zhang, Y., Yao, Y., Xu, Y., Li, L., Gong, Y., et al. (2021) Pan-cancer circulating tumor DNA detection in over 10,000 Chinese patients, *Nat. Commun.*, **12**, 11, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20162-8>.
35. Liu, J., Dai, L., Wang, Q., Li, C., Liu, Z., et al. (2024) Multimodal analysis of cfDNA methylomes for early detecting esophageal squamous cell carcinoma and precancerous lesions, *Nat. Commun.*, **15**, 3700, <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47886-1>.

36. Visal, T. H., Den Hollander, P., Cristofanilli, M., and Mani, S. A. (2022) Circulating tumour cells in the -omics era: how far are we from achieving the ‘singularity’? *Br. J. Cancer*, **127**, 173-184, <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01768-9>.
37. Zhou, J., Vorobyeva, A., Luan, Q., and Papautsky, I. (2023) Single cell analysis of inertial migration by circulating tumor cells and clusters, *Micromachines (Basel)*, **14**, 787, <https://doi.org/10.3390/mi14040787>.
38. Lawrence, R., Watters, M., Davies, C. R., Pantel, K., and Lu, Y. J. (2023) Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **20**, 487-500, <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00781-y>.
39. Yadav, A., Kumar, A., and Siddiqui, M. H. (2021) Detection of circulating tumour cells in colorectal cancer: emerging techniques and clinical implications, *World J. Clin. Oncol.*, **12**, 1169-1181, <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i12.1169>.
40. Srivastava, S., Koay, E. J., Borowsky, A. D., De Marzo, A. M., Ghosh, S., Wagner, P. D., and Kramer, B. S. (2019) Cancer overdiagnosis: a biological challenge and clinical dilemma, *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 349-358, <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0142-8>.
41. Renzi, G. D., Marco, G. D., Meo, M. D., Rosso, E. D., Gazzaniga, P., and Nicolazzo, C. (2022) *In vitro* cultures of circulating tumor cells: a potential tool to unravel drug sensitivity, *Cancer Drug Resist.*, **5**, 245-260, <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.121>.
42. Kahounová, Z., Píková, M., Drápela, S., Bouchal, J., Szczyrbová, E., et al. (2023) Circulating tumor cell-derived preclinical models: current status and future perspectives, *Cell Death Dis.*, **14**, 530, <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06059-6>.
43. Duffy, M. J., McDermott, E. W., and Crown, J. (2018) Blood-based biomarkers in breast cancer: from proteins to circulating tumor cells to circulating tumor DNA, *Tumour Biol.*, **40**, 1010428318776169, <https://doi.org/10.1177/1010428318776169>.
44. Chai, S., Naghdloo, A., Pore, M., Singh, M., Matsumoto, N., et al. (2022) Identification of epithelial and mesenchymal circulating tumor cells in clonal lineage of an aggressive prostate cancer case, *Npj Precision Oncol.*, **6**, 1-11, <https://doi.org/10.1038/s41698-022-00289-1>.
45. Yokobori, T., Iinuma, H., Shimamura, T., Imoto, S., Sugimachi, K., et al. (2013) Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis, *Cancer Res.*, **73**, 2059-2069, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0326>.
46. Papadaki, M. A., Stoupis, G., Theodoropoulos, P. A., Mavroudis, D., Georgoulias, V., and Agelaki, S. (2019) Circulating tumor cells with stemness and epithelial-to-mesenchymal transition features are chemoresistant and predictive of poor outcome in metastatic breast cancer, *Mol. Cancer Ther.*, **18**, 437-447, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0584>.
47. Shaw, J. A., Guttry, D. S., Hills, A., Fernandez-Garcia, D., Page, K., et al. (2017) Mutation analysis of cell-free DNA and single circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients with high circulating tumor cell counts, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 88-96, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0825>.
48. Wang, X., Wang, L., Lin, H., Zhu, Y., Huang, D., et al. (2024) Research progress of CTC, ctDNA, and EVs in cancer liquid biopsy, *Front. Oncol.*, **14**, 1303335, <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1303335>.
49. Kapeleris, J., Müller Bark, J., Ranjit, S., Irwin, D., Hartel, G., et al. (2022) Prognostic value of integrating circulating tumour cells and cell-free DNA in non-small cell lung cancer, *Heliyon*, **8**, e09971, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09971>.
50. Chalfin, H. J., Glavaris, S. A., Gorin, M. A., Kates, M. R., Fong, M. H., et al. (2021) Circulating tumor cell and circulating tumor DNA assays reveal complementary information for patients with metastatic urothelial cancer, *Eur. Urol. Oncol.*, **4**, 310-314, <https://doi.org/10.1016/j.euro.2019.08.004>.
51. Ye, Z., Wang, C., Wan, S., Mu, Z., Zhang, Z., et al. (2019) Association of clinical outcomes in metastatic breast cancer patients with circulating tumour cell and circulating cell-free DNA, *Eur. J. Cancer*, **106**, 133-143, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.10.012>.
52. Gerratana, L., Davis, A. A., Zhang, Q., Basile, D., Rossi, G., et al. (2021) Longitudinal dynamics of circulating tumor cells and circulating tumor DNA for treatment monitoring in metastatic breast cancer, *JCO Precis. Oncol.*, **5**, 943-952, <https://doi.org/10.1200/PO.20.0034>.
53. Bortolini Silveira, A., Bidard, F., Tanguy, M., Girard, E., Trédan, O., et al. (2021) Multimodal liquid biopsy for early monitoring and outcome prediction of chemotherapy in metastatic breast cancer, *NPJ Breast Cancer*, **7**, 1-9, <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00319-4>.
54. Vaiaki, E. M., and Falasca, M. (2024) Comparative analysis of the minimal information for studies of extracellular vesicles guidelines: advancements and implications for extracellular vesicle research, *Semin. Cancer Biol.*, **101**, 12-24, <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2024.04.002>.
55. Goberdhan, D. C. I. (2023) Large tumour-derived extracellular vesicles as prognostic indicators of metastatic cancer patient survival, *Br. J. Cancer*, **128**, 471-473, <https://doi.org/10.1038/s41416-022-02055-3>.

56. Doyle, L. M., and Wang, M. Z. (2019) Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis, *Cells*, **8**, 727, <https://doi.org/10.3390/cells8070727>.
57. Zhang, F., Guo, J., Zhang, Z., Qian, Y., Wang, G., et al. (2022) Mesenchymal stem cell-derived exosome: a tumor regulator and carrier for targeted tumor therapy, *Cancer Lett.*, **526**, 29-40, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.11.015>.
58. Huang, X., Yuan, T., Tschanne, M., Sun, Z., Jacob, H., et al. (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing, *BMC Genom.*, **14**, 319, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-319>.
59. Keup, C., Mach, P., Aktas, B., Tewes, M., Kolberg, H. C., Hauch, S., Sprenger-Haussels, M., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2018) RNA profiles of circulating tumor cells and extracellular vesicles for therapy stratification of metastatic breast cancer patients, *Clin. Chem.*, **64**, 1054-1062, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.283531>.
60. Ciravolo, V., Huber, V., Ghedini, G. C., Venturelli, E., Bianchi, F., et al. (2012) Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy, *J. Cell Physiol.*, **227**, 658-667, <https://doi.org/10.1002/jcp.22773>.
61. Chen, X., Liu, J., Zhang, Q., Liu, B., Cheng, Y., et al. (2020) Exosome-mediated transfer of miR-93-5p from cancer-associated fibroblasts confer radioresistance in colorectal cancer cells by downregulating FOXA1 and up-regulating TGFB3, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **39**, 65, <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1507-2>.
62. Hsu, X. R., Wu, J. E., Wu, Y. Y., Hsiao, S. Y., Liang, J. L., et al. (2023) Exosomal long noncoding RNA MLETA1 promotes tumor progression and metastasis by regulating the miR-186-5p/EGFR and miR-497-5p/IGF1R axes in non-small cell lung cancer, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **42**, 283, <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02859-y>.
63. Yan, Y., Du, C., Duan, X., Yao, X., Wan, J., et al. (2022) Inhibiting collagen I production and tumor cell colonization in the lung via miR-29a-3p loading of exosome-/liposome-based nanovesicles, *Acta Pharm. Sin. B*, **12**, 939-951, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.011>.
64. Chen, S. W., Zhu, S. Q., Pei, X., Qiu, B. Q., Xiong, D., et al. (2021) Cancer cell-derived exosomal circUSP7 induces CD8(+) T cell dysfunction and anti-PD1 resistance by regulating the miR-934/SHP2 axis in NSCLC, *Mol. Cancer*, **20**, 144, <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01448-x>.
65. Wu, Y., Fu, H., Hao, J., Yang, Z., Qiao, X., et al. (2024) Tumor-derived exosomal PD-L1: A new perspective in PD-1/PD-L1 therapy for lung cancer, *Front. Immunol.*, **15**, 1342728, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1342728>.
66. Nanou, A., Zeune, L. L., Bidard, F. C., Pierga, J. Y., and Terstappen, L. W. M. M. (2020) HER2 expression on tumor-derived extracellular vesicles and circulating tumor cells in metastatic breast cancer, *Breast Cancer Res.*, **22**, 86, <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01323-5>.
67. Grigoryeva, E. S., Tashireva, L. A., Savelieva, O. E., Zavyalova, M. V., Popova, N. O., et al. (2023) The association of integrins  $\beta$ 3,  $\beta$ 4, and  $\alpha$ V $\beta$ 5 on exosomes, CTCs and tumor cells with localization of distant metastasis in breast cancer patients, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2929, <https://doi.org/10.3390/ijms24032929>.
68. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., et al. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, *Nature*, **527**, 329-335, <https://doi.org/10.1038/nature15756>.
69. Heinemann, M. L., Ilmer, M., Silva, L. P., Hawke, D. H., Recio, A., et al. (2014) Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration, *J. Chromatogr. A*, **1371**, 125-135, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.026>.
70. Kalluri, R., and LeBleu, V. S. (2020) The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, **367**, eaau6977, <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>.
71. Schwarzenbach, H. (2024) Potential of exosomes as therapeutics and therapy targets in cancer patients, *Int. J. Transl. Med.*, **4**, 247-261, <https://doi.org/10.3390/ijtm4020015>.
72. Scher, H. I., Morris, M. J., Larson, S., and Heller, G. (2013) Validation and clinical utility of prostate cancer biomarkers, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **10**, 225-234, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.30>.
73. Lin, K., Lipsitz, R., Miller, T., and Janakiraman, S. (2008) Benefits and harms of prostate-specific antigen screening for prostate cancer: an evidence update for the U.S. preventive services task force, *Ann. Intern. Med.*, **149**, 192, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-3-200808050-00009>.
74. Lumbrieras, B., Parker, L. A., Caballero-Romeu, J. P., Gómez-Pérez, L., Puig-García, M., et al. (2022) Variables associated with false-positive PSA results: a cohort study with real-world data, *Cancers (Basel)*, **15**, 261, <https://doi.org/10.3390/cancers15010261>.
75. Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., et al. (2018) Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test, *Science*, **359**, 926-930, <https://doi.org/10.1126/science.aar3247>.
76. Lennon, A. M., Buchanan, A. H., Kinde, I., Warren, A., Honushefsky, A., et al. (2020) Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention, *Science*, **369**, eabb9601, <https://doi.org/10.1126/science.abb9601>.
77. Ben-Ami, R., Wang, Q. L., Zhang, J., Supplee, J. G., Fahrmann, J. F., Lehmann-Werman, R., Brais, L. K., Nowak, J., Yuan, C., Loftus, M., Babic, A., Irajizad, E., Davidi, T., Zick, A., Hubert, A., Neiman, D., Piyanzin, S., Gal-Rosenberg, O., Horn, A., et al. (2024) Protein biomarkers and alternatively methylated cell-free DNA detect early stage pancreatic cancer, *Gut*, **73**, 639-648, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-331074>.

78. Xing, X., Cai, L., Ouyang, J., Wang, F., Li, Z., Liu, M., Wang, Y., Zhou, Y., Hu, E., Huang, C., Wu, L., Liu, J., and Liu, X. (2023) Proteomics-driven noninvasive screening of circulating serum protein panels for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma, *Nat. Commun.*, **14**, 8392, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44255-2>.
79. Anastasi, E., Farina, A., Granato, T., Colaiacovo, F., Pucci, B., et al. (2023) Recent insight about HE4 role in ovarian cancer oncogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10479, <https://doi.org/10.3390/ijms241310479>.
80. Boylan, K. L. M., Petersen, A., Starr, T. K., Pu, X., Geller, M. A., Bast, R. C., Lu, K. H., Cavallaro, U., Connolly, D. C., Elias, K. M., Cramer, D. W., Pejovic, T., and Skubitz, A. P. N. (2022) Development of a multiprotein classifier for the detection of early stage ovarian cancer, *Cancers (Basel)*, **14**, 3077, <https://doi.org/10.3390/cancers14133077>.
81. Huang, H., Yang, Y., Zhu, Y., Chen, H., Yang, Y., et al. (2022) Blood protein biomarkers in lung cancer, *Cancer Lett.*, **551**, 215886, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215886>.
82. Fahrmann, J. F., Marsh, T., Irajizad, E., Patel, N., Murage, E., et al. (2022) Blood-based biomarker panel for personalized lung cancer risk assessment, *J. Clin. Oncol.*, **40**, 876-883, <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01460>.
83. Isgrò, M. A., Bottone, P., and Scatena, R. (2015) Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects, *Adv. Exp. Biol.*, **867**, 125-143, [https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_9).
84. Filella, X., Rodríguez-García, M., and Fernández-Galán, E. (2022) Clinical usefulness of circulating tumor markers, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **61**, 895-905, <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-1090>.
85. Liu, Y., Hatano, K., and Nonomura, N. (2024) Liquid biomarkers in prostate cancer diagnosis: current status and emerging prospects, *World J. Mens Health*, **42**, e45, <https://doi.org/10.5534/wjmh.230386>.
86. Ahn, H. S., Ho, J. Y., Yu, J., Yeom, J., Lee, S., et al. (2021) Plasma protein biomarkers associated with higher ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers, *Cancers (Basel)*, **13**, 2300, <https://doi.org/10.3390/cancers13102300>.
87. Schillebeeckx, E., van Meerbeeck, J. P., and Lamote, K. (2021) Clinical utility of diagnostic biomarkers in malignant pleural mesothelioma: a systematic review and meta-analysis, *Eur. Respir. Rev.*, **30**, 210057, <https://doi.org/10.1183/16000617.0057-2021>.
88. Nagpal, M., Singh, S., Singh, P., Chauhan, P., and Zaidi, M. A. (2016) Tumor markers: a diagnostic tool, *Natl. J. Maxillofac. Surg.*, **7**, 17-20, <https://doi.org/10.4103/0975-5950.196135>.
89. Sok, C. P., Polireddy, K., and Kooby, D. A. (2024) Molecular pathology and protein markers for pancreatic cancer: relevance in staging, in adjuvant therapy, in determination of minimal residual disease, and follow-up, *Hepatobiliary Surg. Nutr.*, **13**, 56-70, <https://doi.org/10.21037/hbsn-22-628>.
90. Charkhchi, P., Cybulski, C., Gronwald, J., Wong, F. O., Narod, S. A., and Akbari, M. R. (2020) CA125 and ovarian cancer: a comprehensive review, *Cancers (Basel)*, **12**, 3730, <https://doi.org/10.3390/cancers12123730>.
91. Sahu, S. A., and Shrivastava, D. (2023) A comprehensive review of screening methods for ovarian masses: towards earlier detection, *Cureus*, **15**, e48534, <https://doi.org/10.7759/cureus.48534>.
92. Dochez, V., Caillon, H., Vaucel, E., Dimet, J., Winer, N., and Ducarme, G. (2019) Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review, *J. Ovarian Res.*, **12**, 28, <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0503-7>.
93. Moss, E. L., Hollingsworth, J., and Reynolds, T. M. (2005) The role of CA125 in clinical practice, *J. Clin. Pathol.*, **58**, 308-312, <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.018077>.
94. Landegren, U., and Hammond, M. (2021) Cancer diagnostics based on plasma protein biomarkers: hard times but great expectations, *Mol. Oncol.*, **15**, 1715-1726, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12809>.
95. Felekkis, K., and Papaneophytou, C. (2024) The circulating biomarkers league: combining miRNAs with cell-free DNAs and proteins, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 3403, <https://doi.org/10.3390/ijms25063403>.
96. Di Sario, G., Rossella, V., Famulari, E. S., Maurizio, A., Lazarevic, D., Giannese, F., and Felici, C. (2023) Enhancing clinical potential of liquid biopsy through a multi-omic approach: a systematic review, *Front. Genet.*, **14**, 1152470, <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1152470>.
97. Schneegans, S., Lück, L., Besler, K., Bluhm, L., Stadler, J. C., et al. (2020) Pre-analytical factors affecting the establishment of a single tube assay for multiparameter liquid biopsy detection in melanoma patients, *Mol. Oncol.*, **14**, 1001-1015, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12669>.
98. Keup, C., Suryaprakash, V., Hauch, S., Storbeck, M., Hahn, P., Sprenger-Haussels, M., Kolberg, H.-C., Tewes, M., Hoffmann, O., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2021) Integrative statistical analyses of multiple liquid biopsy analytes in metastatic breast cancer, *Genome Med.*, **13**, 85, <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00902-1>.
99. Keup, C., Suryaprakash, V., Storbeck, M., Hoffmann, O., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2021) Longitudinal multi-parametric liquid biopsy approach identifies unique features of circulating tumor cell, extracellular vesicle, and cell-free DNA characterization for disease monitoring in metastatic breast cancer patients, *Cells*, **10**, 212, <https://doi.org/10.3390/cells10020212>.
100. Connal, S., Cameron, J. M., Sala, A., Brennan, P. M., Palmer, D. S., et al. (2023) Liquid biopsies: the future of cancer early detection, *J. Transl. Med.*, **21**, 118, <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03960-8>.

## THE DIVERSITY OF CIRCULATING TUMOR MARKERS: A TREND TOWARDS A MULTIMODAL LIQUID BIOPSY

### Review

E. S. Kulagina<sup>1\*</sup>, G. A. Yanus<sup>1,2</sup>, and E. N. Imyanitov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology,  
197758 St. Petersburg, Russia; e-mail: kate.kulagina@gmail.com

<sup>2</sup> St. Petersburg State Pediatric Medical University, 194100 St. Petersburg, Russia

Over the past decade, liquid biopsy (LB) has become a routine diagnostic test essential for the treatment of malignant tumors of various localizations. Its capabilities include early diagnosis, molecular genotyping, prognosis, prediction, and monitoring of tumor response. Typically, liquid biopsy involves the extraction of a single type of tumor-derived molecules or cellular elements from blood and subsequent molecular analysis. These elements may include circulating tumor DNA (ctDNA), circulating tumor cells (CTCs), circulating RNA (ctRNA), or the contents of extracellular vesicles (exosomes). Despite the technical sophistication of molecular analysis methods for circulating biomarkers, this diagnostic approach has limited relevance. In a significant proportion of cancer patients (ranging from 10 to 50%, depending on the tumor type), none of these analytes can be detected and analyzed, despite the presence of large, progressing neoplastic foci in the body. It seems reasonable to posit that heterogeneous fractions of circulating tumor-specific biomarkers complement each other, thus the simultaneous analysis of several fractions will not only increase the sensitivity of the method but also more accurately characterize and predict the clinical situation. This review examines the possibilities and advantages of applying a combined multiparametric approach to liquid biopsy, which involves testing multiple circulating analytes in a single blood sample.

**Keywords:** liquid biopsy, ctDNA, exosomes, CTC, ctRNA, protein tumor markers, prognostic markers, predictive markers, cancer

## РОЛЬ ММП-2 И ММП-9 В РЕАЛИЗАЦИИ СВЯЗИ ПРОЦЕССОВ ВОСПАЛЕНИЯ, ФИБРОЗА И АПОПТОЗА ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПЛАЗМЕННОГО УРОВНЯ ИХ АКТИВНЫХ ФОРМ

© 2024 И.В. Курбатова<sup>1\*</sup>, Л.В. Топчиева<sup>1</sup>, О.П. Дуданова<sup>2</sup>, А.А. Шиповская<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Институт биологии,  
185910 Петрозаводск, Республика Карелия, Россия; электронная почта: irina7m@yandex.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»,  
Медицинский институт имени профессора А.П. Зильбера,  
185910 Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Поступила в редакцию 02.04.2024

После доработки 14.10.2024

Принята к публикации 15.10.2024

Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 играют важную роль в патогенезе хронических заболеваний печени, участвуя в процессах воспаления и фиброза. Их роль в прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) мало изучена. Проведен анализ уровней ММП-2, -9 в плазме крови пациентов с разными формами НАЖБП (стеатозом печени (СП) и неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) слабой (-СА), умеренной (-УА), высокой (-ВА) активности без выраженного фиброза), оценены корреляционные связи между уровнями ММП-2, -9 и мРНК генов *MMP2*, *MMP9*, *ADAM17*, *NLRP3*, активности каспазы 3 в лейкоцитах периферической крови (ЛПК), ФНОα, ИЛ-6, рИЛ-6Р, фрагментов цитокератина-18 в плазме. При СП уровни мРНК гена *MMP2* в ЛПК и ММП-2 в плазме ниже, чем в контроле, и повышена экспрессия гена *NLRP3* в ЛПК относительно других групп. При НАСГ-СА уровень ММП-9 выше, чем у контроля, СП, НАСГ-УА, что можно связать с активацией воспаления при трансформации СП в НАСГ. Плазменный уровень ММП-9 более 389,50 пг/мл диагностически значим для выявления НАСГ-СА среди пациентов СП (*AUC ROC* = 0,818; 95%-ный доверительный интервал равен 0,689–0,948; *p* < 0,001). При НАЖБП уровень ММП-9 может быть связан не только с воспалением, но и с апоптозом. Вероятно, определенную роль в этой связи играет *ADAM17*. При более высокой активности НАСГ усилен апоптоз гепатоцитов, повышен уровень активности каспазы 3 в ЛПК, уровень ММП-9 в крови снижен до уровня контроля и СП. При НАСГ-ВА уровень мРНК гена *ADAM17* в ЛПК повышен по сравнению с контролем, НАСГ-СА и НАСГ-УА. Таким образом, ММП-2 и ММП-9 включены в патогенез НАЖБП уже на ранних стадиях, и их уровень в крови может быть связан с наличием и активностью воспаления в паренхиме печени.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** матриксная металлопротеиназа 2, матриксная металлопротеиназа 9, неалкогольная жировая болезнь печени, стеатоз печени, неалкогольный стеатогепатит, воспаление, фиброз, апоптоз, NLRP3, ADAM17.

DOI: 10.31857/S0320972524110136 EDN: IKGIUP

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; ЗКП – звездчатые клетки печени; ИГА – индекс гистологической активности; ИЛ – интерлейкин; рИЛ-6Р – растворимый ИЛ-6-рецептор; ИМТ – индекс массы тела; ЛПК – лейкоциты периферической крови; ЛПНП и ЛПВП – липопротеины низкой и высокой плотности; ММП – матриксные металлопротеиназы; НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; НАСГ-СА, -УА и -ВА – неалкогольный стеатогепатит слабой, умеренной и высокой активности; ОХС – общий холестерин; СП – стеатоз печени; СРБ – С-реактивный белок; ТГ – триглицериды; ТИМП – тканевой ингибитор металлопротеиназы; ФНОα – фактор некроза опухоли альфа; ФЦК-18 – фрагменты цитокератина-18; МСР-3 – хемоаттрактантный белок-3.

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) представляет собой широко распространенное хроническое, медленно прогрессирующее метаболическое мультифакториальное заболевание, которое является самым частым хроническим заболеванием печени в развитых странах [1]. По последним данным, распространность НАЖБП в мире составляет 29–35% среди взрослого населения [2, 3] и продолжает быстро расти [4]. В России НАЖБП также является чрезвычайно распространенным хроническим заболеванием печени во взрослой популяции. Согласно последнему анализу мультицентровых исследований, обобщенная распространность НАЖБП в России составляет около 32% [5]. Сложные патогенетические механизмы НАЖБП включают в себя липотоксичность вследствие избыточного накопления липидов в печени, развитие инсулинерезистентности, воспаления, гибели гепатоцитов и фиброза и отличаются стадийностью течения от стеатоза к стеатогепатиту и циррозу печени [6–9]. В настоящее время патогенез прогрессирования НАЖБП объясняется теорией «множественных ударов» (multiple hit hypothesis), согласно которой на генетически предрасположенных к НАЖБП лиц синергетически действует множество факторов (резистентность к инсулину, выработка адиопокинов, факторы питания, микробиом кишечника и другие), ряд разнообразных параллельных процессов способствуют развитию стеатоза и воспаления печени [10–12]. Под воздействием диетических, экологических факторов, ожирения нарушается липидный обмен (повышается уровень свободных жирных кислот и холестерола) [13, 14] и развивается инсулинерезистентность [15], формируется дисфункция и усиливается пролиферация адипоцитов [16], а также происходят изменения в кишечном микробиоме [17]. Гиперинсулинемия, вызванная резистентностью к инсулину, приводит к стеатозу за счет увеличения липогенеза в печени *de novo* [13], снижения окисления свободных жирных кислот и секреции липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) в печени и увеличения оттока свободных жирных кислот из-за усиления липолиза из жировой ткани [18]. После развития стеатоза печень становится более уязвимой для «множественного воздействия», включая бактериальные токсины кишечного происхождения, дисбаланс адиопокинов/цитокинов, митохондриальную дисфункцию, окислительное повреждение, нарушение регуляции апоптоза гепатоцитов, высвобождение профиброгенных факторов и провоспалительных медиаторов из поврежденных органелл и активацию звездчатых клеток печени (ЗКП) и клеток Купфера [7, 16].

Действующие многочисленные факторы могут совместно стимулировать воспаление, апоптоз и фиброз, что в конечном итоге приводит к прогрессированию НАЖБП (к НАСГ и циррозу печени) [16]. Согласно стадиям, выделяют ряд клинико-морфологических форм НАЖБП: стеатоз, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) (с фиброзом или без) и цирроз печени [19, 20]. НАСГ представляет собой воспалительную инфильтрацию паренхимы и стромы печени с наличием баллонной дистрофии гепатоцитов и очаговых некрозов и является промежуточным и центральным звеном среди последовательных стадий одного патологического процесса (неалкогольного стеатоза и неалкогольного стеатофиброза). Стеатоз печени (СП) – ранняя форма НАЖБП, характеризующаяся доброкачественным клиническим течением, тогда как НАСГ отличается прогрессирующим течением. Фиброз при НАСГ ассоциирован с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных новообразований и смертности при НАСГ [19, 21]. Ключевые проблемы диагностики НАЖБП – дифференциация НАСГ от простого стеатоза, выявление фиброза печени и поиск малоинвазивных альтернатив биопсии печени, которая имеет серьезные ограничения и может не отражать истинной картины повреждения, воспаления и фиброза вследствие малого объема ткани [22]. Кроме того, острой проблемой диагностики НАЖБП является консенсус относительно определения НАЖБП и диагностических критериев [23, 24]. В настоящий момент идет обсуждение по поводу замены термина «НАЖБП» на термин «МАЖБП» – метаболически ассоциированная жировая болезнь печени (жировая болезнь печени, связанная с метаболической дисфункцией) [25, 26]. Считается, что, в отличие от НАЖБП, МАЖБП представляет собой «активный» диагноз, основанный на наличии избыточного веса/ожирения или, у худощавых субъектов, на сочетании метаболических дисфункций, которые действуют как факторы высокого риска [23]. Сложность патогенеза НАЖБП, широкая распространенность, ограничения биопсии печени и отсутствие согласия в отношении номенклатуры и диагностических критериев обуславливают глубокий интерес к поиску малоинвазивных биомаркеров диагностики и прогрессирования НАЖБП.

Фиброз является одним из важных компонентов прогрессирования хронических патологий печени, в том числе НАЖБП [27]. Фиброз печени характеризуется избыточным накоплением компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в субэндотелиальном пространстве Диссе и в интерстиции, в портальных трактах [28]. В основе развития и прогрессирования фиброза лежит нарушение баланса между процессом фиброгенеза (отложение

нием ВКМ, обусловленным активацией ЗКП и их трансдифференцировкой в продуцирующие ВКМ миофибробласты) и антифибротическими процессами: фибролизисом (деградацией ВКМ [29]), а также инактивацией или апоптозом миофибробластов [30, 31]. Избыточное отложение ВКМ в процессе фиброгенеза приводит к изменениям содержания и состава компонентов ВКМ (ремоделированию ВКМ), что обуславливает изменение его свойств (в том числе повышение жесткости) и способствует возникновению и развитию фиброза печени [32]. В случае фиброзов вообще и печени в частности отмечается не только избыточный синтез измененного матрикса, но также нарушение процессов его разрушения [33]. Одними из ключевых медиаторов ремоделирования ВКМ являются матрикные металлопротеиназы (ММП) [34], в связи с чем они рассматриваются в качестве терапевтических мишней при лечении хронических заболеваний печени [29]. ММП регулируют состав ВКМ печени, наиболее важные структурные компоненты которого: коллаген I, III, IV, V, VI типов, протеогликаны, ламинин, фибронектин и другие белки [35, 36]. ММП представляют собой семейство высокомолекулярных мультидоменных внеклеточных кальций-зависимых цинксодержащих эндопротеиназ, гидролизующих коллаген и другие компоненты ВКМ [29]. ММП различаются по структурной и субстратной специфичности, в частности, ММП-2 и ММП-9 формируют группу желатиназ. ММП-2 обладает свойством как стимулировать фиброз [29, 37], так и снижать его [29, 38–40]. Что касается ММП-9, в настоящее время есть свидетельства ее антифиброзных свойств [41–43], однако нет четких данных о прямом участии ММП-9 в развитии фиброза печени. ММП-9 способна косвенно стимулировать фиброз, но никак не коррелирует с ним [44, 45]. Основными субстратами желатиназ являются частично денатурированный коллаген (желатин), различные нативные типы коллагенов, в том числе коллаген типа IV, образующий базальную мембрану эндотелия, фибронектин, эластин, интерлейкин-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) и TGF- $\beta$ . Кроме того, для ММП-2 субстратом является про-ММП-9 [45]. Путем процессинга цитокинов и хемокинов желатиназы осуществляют регуляцию воспаления [46].

Желатиназы играют важную роль в патогенезе хронических заболеваний печени, участвуя в процессах воспаления и фиброза. Они могут проявлять как провоспалительное (ММП-2, ММП-9) [47–51], так и противовоспалительное (ММП-2) действие [47, 52–54]. Согласно данным зимографии *in situ*, в гепатоцитах фиброзной печени человека и мыши содержание и активность ММП-2 и -9 увеличивались и положительно коррелировали с тяжестью фиброза [55]. ММП-2 в фиброгенезе

печени обладает антифиброзным [29, 38–40] и профибротическим [29, 37] потенциалом, а ММП-9 проявляет главным образом антифиброзные свойства [41–43], при этом есть некоторые доказательства ее косвенного участия в развитии фиброза печени [44, 45].

ММП-2 (желатиназа А, ЕС 3.4.24.24, 72 кДа) экспрессируется различными клетками печени (ЗКП, фибробластами, клетками Купфера), нейтрофилами, макрофагами и моноцитами [29, 47]. Есть свидетельства того, что уровень ММП-2 относительно постоянен и обычно не подвержен влиянию цитокинов или факторов роста [56]. В ряде исследований отмечена связь экспрессии ММП-2 с хроническим гепатитом С [57], фиброзом печени [58], алкогольным циррозом печени [59], ишемией и реперфузионным повреждением [60], гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК) [61]. ММП-2 проявляет антифиброзные свойства. Согласно данным Radbill et al. [39], при CCl4-индуцированном фиброзе у мышей с дефицитом ММП-2 (*Mmp2*<sup>-/-</sup>) развивался гораздо более значительный фиброз печени, чем у мышей дикого типа (*Mmp2*<sup>+/+</sup>). Кроме того, в культуральном эксперименте было показано, что ММП-2 подавляет экспрессию коллагена α1(I) активированными ЗКП [39]. Авторы считают, что повышение уровня ММП-2 во время прогрессирования фиброза печени может быть важным механизмом ингибирования синтеза коллагена I типа активированными ЗКП, обеспечивая тем самым защитную, а не патологическую роль. Onozuka et al. [40] показали, что дефицит ММП-2 ускоряет фиброз, индуцированный CCl4 и холестазом, за счет активации ЗКП. Было показано, что ММП-2 способна подавлять активацию тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 (ТИМП-1) при фиброзе печени [40]. Помимо антифиброзных свойств, ММП-2 обладает свойством стимулировать фиброз печени [29, 37, 62]. Есть данные, полученные *in vitro* и свидетельствующие о том, что активная ММП-2 является ауто-кринным регулятором пролиферации ЗКП [62].

Накоплены сведения, подтверждающие противовоспалительную роль ММП-2. Дефицит ММП-2 у мышей и человека вызывает сложный метаболический и воспалительный синдром, включающий сердечную дисфункцию, артрит, потерю костной массы, липодистрофию и задержку роста [52]. Показано, что ММП-2 расщепляет моноцитарный хемоаттрактантный белок-3 (МСР-3). Расщепленный МСР-3 связывается с СС-хемокиновыми рецепторами (CCR1, CCR2 и CCR3), действуя как общий антагонист хемокинов, что приводит к уменьшению миграции иммунных клеток в места повреждения и снижению уровня воспаления [53]. Известно, что провоспалительный цитокин ИЛ-1 $\beta$  индуцирует продукцию ММП-2 клетками соеди-

нительной ткани, активированная ММП-2, в свою очередь, отрицательно регулирует активность ИЛ-1 $\beta$  посредством его деградации [54]. Помимо реализации противовоспалительных эффектов, ММП-2 может также выступать в роли медиатора воспаления, проявляя провоспалительные свойства. Показано, что ММП-2 опосредованно участвует в инфильтрации лейкоцитов в ткани при воспалении, расщепляя большой эндотелин-1 (ЕТ-1) с образованием нового пептида из 32 аминокислот – ЕТ-1(1–32). ЕТ-1(1–32) связывается с рецептором эндотелина А, приводя к снижению экспрессии L-селектина и активации интегрина CD11b/CD18 на поверхности нейтрофилов, что способствует адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и транспорту нейтрофилов в воспаленные ткани [50].

ММП-9 (желатиназа В, ЕС 3.4.24.35, 92 кДа) секретируется многими типами клеток, в том числе моноцитами, лейкоцитами, макрофагами и фибробластами [29, 63]. Базальные уровни ММП-9 обычно низки, ее экспрессия может индуцироваться цитокинами/хемокинами, включая ФНО $\alpha$  [56]. Показано, что индукция НАСГ у мышей приводит к повышению уровня мРНК гена *Mmp9* в печени и содержания ММП-9 в крови [64]. Повышенная экспрессия ММП-9 выявлена при фиброзе печени [55], алкогольном циррозе печени [59] и ГЦК [65]. ММП-9 оказывает антифиброзное действие. Известно, что ММП-9 активирует апоптоз ЗКП в культуре [41]. Melgar-Lesmes et al. [42] показали, что внедрение плазмида, сверхэкспрессирующей ММП-9, в воспалительные макрофаги цирротической печени приводит к переключению макрофагов с воспалительного (M1) на прорегенеративный (M2) тип и способствует локальному разрешению фиброза. Feng et al. [43] с использованием модели фиброза, индуцированного тиоацетамидом у грызунов, получили доказательства того, что ММП-9, полученная из клеток Купфера, играет решающую роль в разрешении фиброза печени. Несмотря на свидетельства участия ММП-9 в развитии легочного фиброза [66], прямых доказательств профибротической роли ММП-9 в печени практически нет. Показано, что нокаут гена *Mmp9* у мышей приводит к ослаблению фиброгенеза [44], но также наблюдается замедленная реакция регенерации печени после частичной гепатэктомии [67] по сравнению с контрольными животными дикого типа. Известно, что ММП-9 может активировать латентный TGF- $\beta$  в процессе протеолитического расщепления [68]. Kaviratne et al. [69] изучали роль TGF- $\beta$  в ИЛ-13-зависимом фиброзе печени, вызванном инфекцией *Schistosoma mansoni*. Было продемонстрировано, что нокаут гена, кодирующего ММП-9 у мышей, не влияет на фиброз даже при хронической инфекции [69].

ММП-9 участвует в процессах воспаления, ремоделирования тканей и репарации, мобилизации матрикссвязанных факторов роста и процессинге цитокинов [29, 47]. Накоплены данные о провоспалительной роли ММП-9. Показано, что у *Mmp9*<sup>-/-</sup> мышей с экспериментально вызванным стеатозом наблюдается снижение инфильтрации лейкоцитов в печень, экспрессии провоспалительных цитокинов и некроза печени по сравнению с контрольными животными [48]. Снижение активности ММП-9 вследствие дефицита индуцибельной синтазы оксида азота нарушает миграцию лейкоцитов в печень и снижает уровень воспаления при повреждении печени, вызванном ишемией/реперфузией [49]. Так же, как и ММП-2, ММП-9 участвует в регуляции экспрессии молекул адгезии на поверхности нейтрофилов посредством расщепления эндотелина-1 (ЕТ-1), что способствует миграции лейкоцитов к очагу воспаления [50]. Показано, что ММП-9 активирует провоспалительные цитокины ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  [51, 70].

Таким образом, ММП-2 и ММП-9 участвуют в процессах воспаления и фиброза и играют важную роль в патогенезе хронических заболеваний печени. Прогрессирование печеночно-клеточной недостаточности при НАЖБП напрямую связано с утратой паренхимы вследствие инфильтрации лейкоцитов и запуском иммуновоспалительных процессов, поэтому есть основания рассматривать уровень ММП-2 и -9 в крови и профиль экспрессии кодирующих генов в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) в качестве маркеров прогрессирования и диагностики НАЖБП, однако имеющиеся данные единичны, противоречивы и касаются в основном НАСГ высокой активности [71]. Кроме того, поскольку фиброгенетическая активность и ремоделирование ВКМ при НАЖБП являются типичными изменениями на поздних стадиях, внимание исследователей в основном сосредоточено на изучении роли ММП и их тканевых ингибиторов на стадиях НАЖБП с продвинутым фиброзом [72, 73]. Учитывая провоспалительную роль ММП-9 [48, 49] и в большей степени противовоспалительную роль ММП-2 [47, 52, 53] при неинфекционных патологиях печени, можно ожидать, что уровень данных металлопротеиназ может быть связан с наличием и активностью воспаления в паренхиме печени, в том числе на ранних стадиях патогенеза НАЖБП.

При прогрессировании НАЖБП имеет место тесная взаимосвязь процессов фиброза, воспаления и апоптоза [6, 74–76], и роль ММП в интеграции этих процессов мало изучена. Ранее мы показали, что цитокиновый профиль и уровни некоторых показателей апоптоза в крови пациентов различаются в зависимости от формы НАЖБП, и получили косвенные подтверждения

связи воспаления при развитии НАСГ с процессом каспазозависимого апоптоза ЛПК [77, 78]. В свою очередь, экспрессия и активность ММП регулируются через сигнальные пути, опосредующие воспаление. Так, сигнальный путь ADAM17/TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B опосредует экспрессию MMP9 в эпителиальных клетках легких [79]. ADAM17 является металлопротеиназой, осуществляющей протеолитическое высвобождение мембранный формы ФНО $\alpha$ , одного из основных провоспалительных цитокинов [80]. Кроме того, известно, что при НАЖБП связь воспаления и фиброза реализуется через NLRP3-инфламмосому [81]. Делеция *Nlrp3*, кодирующего один из основных компонентов NLRP3-инфламмасомы, у мышей с индуцируемым НАСГ и фиброзом приводит к защите от фиброза печени, снижению содержания мРНК генов *Mmp2* и *Col1a1* (гена коллагена I типа) по сравнению с мышами дикого типа [81]. Накапливаются сведения об участии ММП-группы желатиназ в процессах регенерации и апоптоза. Например, показано, что у *Mmp9*<sup>-/-</sup>-мышей ослаблена регенерация печени после частичной гепатэктомии, снижен уровень апоптоза гепатоцитов и экспрессия активной формы каспазы 3 [67].

На основании вышеизложенного можно заключить, что сведения о роли ММП-2 и ММП-9 в патогенезе НАЖБП, особенно ранних ее форм, противоречивы и недостаточны. Пристального внимания требует вопрос изучения места ММП в реализации связи процессов воспаления, апоптоза и фиброза при прогрессировании НАЖБП. Остается открытым вопрос о диагностической ценности уровней ММП-2 и -9 и мРНК кодирующих генов в периферической крови в диагностике и разграни-

чении разных форм НАЖБП. В связи с этим цель данного исследования – сравнительный анализ уровней ММП-2 и -9 в плазме крови и мРНК кодирующих генов (*MMP2*, *MMP9*) в ЛПК пациентов с различными формами НАЖБП на доцирротической стадии (стеатозом печени и НАСГ разной активности без выраженного фиброза), а также оценка корреляционных связей между уровнем ММП-2, ММП-9 в плазме крови и уровнями мРНК генов *ADAM17*, *NLRP3* в ЛПК, провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и его растворимого рецептора) и маркеров апоптоза (специфического маркера апоптоза гепатоцитов – фрагментов цитокератина-18 (ФЦК-18) и активностью каспазы 3) в плазме крови пациентов с НАЖБП изучаемых групп.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Группы исследования.** В исследование были включены 95 больных НАЖБП с установленным впервые диагнозом: 26 пациентов со стеатозом печени (СП), 69 пациентов с НАСГ слабой (НАСГ-СА), умеренной (-УА) и высокой (-ВА) активности. Контрольную группу составили 35 здоровых доноров (без клинических проявлений НАЖБП). Клинико-лабораторная характеристика групп исследования представлена в табл. 1.

Обследование пациентов и здоровых доноров проводилось на базе терапевтического отделения ЧУЗ КБ «РЖД-медицина» (г. Петрозаводск). Диагноз НАЖБП с оценкой степени активности НАСГ устанавливался на основании традиционных клинических, лабораторных, инструментальных и гистологических данных, согласно клиническим

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика исследуемых групп

Показатель		Контроль (n = 35)	СП (n = 26)	НАСГ-СА (n = 23)	НАСГ-УА (n = 35)	НАСГ-ВА (n = 11)
Возраст, годы		44,42 ± 1,09	47,65 ± 1,48	44,05 ± 1,60	45,09 ± 1,55	48,70 ± 2,59
		(44,00)	(49,00)	(44,50)	(44,50)	(49,00)
Пол	мужской	17	14	13	20	6
	женский	18	12	10	15	5
ИГА, баллы			3,08 ± 1,17	5,00 ± 0,00	6,77 ± 0,14	9,46 ± 0,21
			(3,00)	(5,00) <sup>#</sup>	(7,00) <sup>*,◊</sup>	(9,00) <sup>*,◊,Δ</sup>
АЛТ, Ед./литр		17,79 ± 1,03	20,27 ± 1,31	49,81 ± 5,90	85,16 ± 9,31	214,20 ± 76,03
		(17,10)	(21,70)	(47,75) <sup>*,#</sup>	(68,70) <sup>*,#,◊</sup>	(135,00) <sup>*,#,◊,Δ</sup>
АСТ, Ед./литр		19,92 ± 0,73	20,95 ± 0,95	36,91 ± 3,86	53,17 ± 5,18	119,20 ± 25,34
		(19,05)	(19,85)	(34,95) <sup>*,#</sup>	(44,10) <sup>*,#</sup>	(91,10) <sup>*,◊,Δ</sup>

Таблица 1 (окончание)

Показатель	Контроль (n = 35)	СП (n = 26)	НАСГ-СА (n = 23)	НАСГ-УА (n = 35)	НАСГ-ВА (n = 11)
Билирубин общий, мкмоль/литр	14,95 ± 1,37 (13,30)	13,44 ± 1,36 (12,20)	15,98 ± 1,41 (16,70)	19,49 ± 2,23 (16,00) <sup>#</sup>	22,02 ± 1,86 (20,65)*, <sup>#</sup>
ЩФ, Ед./литр	113,30 ± 13,92 (110,00)	159,40 ± 15,06 (186,50)	205,80 ± 14,59 (206,10)*	207,00 ± 14,61 (200,00)	320,60 ± 52,77 (253,50)*, <sup>#</sup>
СРБ, мг/литр	0,27 ± 0,15 (0,00)	0,64 ± 0,23 (0,50)	3,17 ± 0,75 (3,50)*	2,57 ± 0,58 (2,50)*	5,45 ± 0,89 (5,00)*, <sup>#</sup>
СОЭ, мм/ч	6,69 ± 1,06 (5,00)	7,77 ± 0,85 (6,50)	5,95 ± 1,25 (4,00)	14,21 ± 1,91 (10,00)*, <sup>◊</sup>	14,91 ± 2,77 (15,00)*, <sup>◊</sup>
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /литр	6,14 ± 0,26 (5,80)	6,35 ± 0,41 (5,70)	6,03 ± 0,24 (5,70)	6,12 ± 0,32 (5,95)	6,40 ± 0,43 (6,39)
Альбумин, г/литр	42,48 ± 1,38 (42,20)	42,65 ± 1,10 (42,50)	40,13 ± 1,31 (38,60)	39,98 ± 1,21 (40,45)	40,71 ± 1,89 (38,85)
Глюкоза, ммоль/литр	5,16 ± 0,08 (5,06)	5,19 ± 0,11 (5,20)	5,27 ± 0,12 (5,25)	5,39 ± 0,11 (5,50)	5,44 ± 0,23 (5,50)
ОХС, ммоль/литр	5,04 ± 0,15 (5,09)	5,29 ± 0,19 (5,29)	6,05 ± 0,25 (6,10)*	6,08 ± 0,30 (6,00)*	6,41 ± 0,38 (6,20)*
ЛПВП, ммоль/литр	1,42 ± 0,09 (1,29)	1,22 ± 0,010 (1,09)	1,27 ± 0,08 (1,12)	1,22 ± 0,10 (1,15)	1,00 ± 0,07 (1,04)*
ЛПНП, ммоль/литр	3,10 ± 0,16 (3,32)	2,93 ± 0,22 (2,70)	3,66 ± 0,27 (3,77) <sup>#</sup>	3,94 ± 0,22 (4,00)*, <sup>#</sup>	4,53 ± 0,29 (4,40)*, <sup>#</sup>
ТГ, ммоль/литр	1,33 ± 0,12 (1,25)	1,82 ± 0,21 (1,64)	2,29 ± 0,27 (1,96)*	2,21 ± 0,24 (1,83)*	2,69 ± 0,71 (2,11)*
FIB-4	0,83 ± 0,06 (0,82)	1,32 ± 0,13 (1,18)*	1,11 ± 0,09 (0,99)	1,25 ± 0,08 (1,18)*	1,53 ± 0,21 (1,13)*
APRI	0,22 ± 0,02 (0,20)	0,28 ± 0,03 (0,26)	0,42 ± 0,05 (0,42)*	0,57 ± 0,06 (0,52)*, <sup>#</sup>	0,76 ± 0,13 (0,57)*, <sup>#</sup>
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	24,94 ± 1,21 (24,79)	33,49 ± 1,83 (33,20)*	31,75 ± 0,66 (32,00)*	33,69 ± 1,14 (34,90)*	33,92 ± 1,58 (34,31)*
ФЦК-18, Ед./литр	81,48 ± 9,31 (77,05)	141,90 ± 14,87 (141,00)*	216,80 ± 33,62 (162,20)*	304,70 ± 40,35 (295,50)*	614,40 ± 162,50 (520,00)*, <sup>#,<sup>◊</sup></sup>

Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm m$ . В скобках – медиана. Достоверное отличие ( $p < 0,005$ ) от контроля (\*), группы СП (#), группы НАСГ-СА (◊), группы НАСГ-УА (Δ) (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

рекомендациям Российского общества по изучению печени, Российской гастроэнтерологической ассоциации, Российской ассоциации эндокринологов, Российской ассоциации геронтологов и гериатров и Национального общества профилактической кардиологии по диагностике и лечению НАЖБП [19]. Все пациенты имели признаки метаболического синдрома: индекс массы тела (ИМТ) более 30 кг/м<sup>2</sup>; окружность талии у мужчин более 102 см, у женщин – более 88 см; дислипидемия в виде увеличения уровня липопротеинов низкой плотности более 3,0 ммоль/литр; систолическое артериальное давление ≥130 мм рт. ст.; диастолическое – ≥80 мм рт. ст. Из исследования исключали пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типов. У всех пациентов при абдоминальной сонографии на аппарате Vivid Pro-7 («General Electric», США) отмечалось усиление эхогенности печени, превышающее эхогенность правой почки. Исключали из исследования пациентов с серологическими признаками вирусной HBV-, HCV-гепатотропной инфекции, алкогольной, аутоиммунной и лекарственной этиологией поражения печени. Исключали пациентов с циррозом печени с признаками портальной гипертензии – асцитом, варикозным расширением вен пищевода и кардиального отдела желудка, расширением диаметра воротной вены и селезеночной вены и замедлением линейной скорости кровотока по данным венам при допплерографии. Для части больных выполнялась спиральная компьютерная томография печени с оценкой плотности печени. Всем пациентам выполняли слепую чрескожную биопсию печени, на основании которой верифицировалась форма НАЖБП: стеатоз без воспаления и баллонной дистрофии гепатоцитов или стеатогепатит разной активности в зависимости от выраженности гепатоцеллюлярной баллонной дегенерации, долькового и портального воспаления (в основном лимфоцитарного с некоторым количеством нейтрофилов) и степени макровезикулярного стеатоза гепатоцитов – по методу Brunt et al. [82]. Согласно данному методу, выделяют три степени гистологической активности НАСГ: слабую (легкую), умеренную и высокую (тяжелую); слабая гистологическая активность НАСГ соответствует минимальным критериям для диагностики стеатогепатита с некоторой степенью гепатоцеллюлярного стеатоза и характерным дольковым смешанным воспалением. Индекс гистологической активности (ИГА) представлен в табл. 1. По результатам гистологического анализа биоптатов среди включенных в исследование пациентов НАСГ определяли 1- и 2-стадии фиброза печени (F1–F2), отсутствовали пациенты с выраженным фиброзом. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Критерии исключения, общие для изучаемых

групп: перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, беременность и лактация, курение. На проведение исследований получено согласие комитета по медицинской этике Министерства здравоохранения Республики Карелия и Петрозаводского государственного университета (протокол № 48 от 10 марта 2023 г.).

**Материал исследования.** В качестве материала для исследования использовали образцы венозной крови доноров изучаемых групп. Взятие материала проводили до назначения гепатопротекторной и иной терапии.

**Определение клинико-лабораторных показателей крови.** На автоматических анализаторах Random Access A-15 и A-25 («BioSystems», Испания) был проведен общий клинический анализ крови и определение следующих биохимических показателей крови: активности аланинаминотрансферазы (АЛАТ) и аспартатаминотрансферазы (АСАТ) кинетическим УФ-методом «АЛТ-УФ и АСТ-УФ – новая жидккая форма»; билирубина колориметрическим методом «Билирубин-Ново»; щелочной фосфатазы (ЩФ) кинетическим методом «Щелочная фосфатаза-Ново (жидкая форма)»; альбумина фотометрическим методом «Альбумин-Ново»; С-реактивного белка (СРБ) иммуногемагглютинометрическим методом «СРБ-Ново»; общего холестерина (ОХС) ферментативным методом «Холестерин-Ново»; триглицеридов (ТГ) ферментативным колориметрическим методом «Триглицериды-Ново» (жидкая форма); глюкозы глюкозооксидазным методом «Глюкоза-Ново». Перечисленные реактивы были производства фирмы «Вектор-Бест», Россия. Липопротеины низкой плотности (ЛПНП) определяли расчетным методом по формуле Фридвальда [83]; липопротеины высокой плотности (ЛПВП) – ферментативным методом «Липопротеиды высокой плотности» («BioSystems», Испания). Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) оценивалась методом Вестергрена.

**Определение индексов фиброза FIB-4 и APRI.** FIB-4 рассчитывали по формуле (1) [84]:

$$\frac{\left[ \text{возраст (г.)} \times \text{АСТ} \left( \frac{\text{Ед.}}{\text{литр}} \right) \right]}{\left[ \text{тромбоциты} \left( \frac{10^9}{\text{литр}} \right) \times \sqrt{\text{АЛТ}} \left( \frac{\text{Ед.}}{\text{литр}} \right) \right]}. \quad (1)$$

При значении индекса FIB-4 ≥ 2,67 с достоверностью 80% можно утверждать о высоком риске прогрессирования фиброза; при уровне FIB-4 ≤ 1,30 с достоверностью 90% – о низком риске [85].

Индекс APRI рассчитывали по формуле (2) [86]:

$$\frac{\left[ \text{АСТ} \left( \frac{\text{Ед.}}{\text{литр}} \right) / \text{верхний предел нормы АСТ} \left( \frac{\text{Ед.}}{\text{литр}} \right) \right]}{\left[ \text{тромбоциты} \left( \frac{10^9}{\text{литр}} \right) \right]} \times 100. \quad (2)$$

**Таблица 2.** Нуклеотидные последовательности праймеров

Ген	Прямой праймер, 5'→3'	Обратный праймер, 5'→3'	ПЦР-продукт, п.н.
<i>18S rRNA</i>	agaaaacggctaccacatcca	caccagacttgccctcca	169
<i>MMP2</i>	gaagagcgtaaggtttggaaag	aaggcagtggagaggaagg	90
<i>MMP9</i>	cagagatgcgtggagagtc	aaggcgtcgtcaatcacc	250
<i>ADAM17</i>	gcattctcaagtctccacaag	ctcttagcaacatcttcacatcc	110
<i>NLRP3</i>	ggacaatgacagcatcggt	tggtcagttaatagaaagatagcgg	211

При значении индекса APRI ≤ 0,50 вероятность фиброза печени низка; при уровне APRI ≥ 1,50 – с высокой вероятностью можно говорить о выраженному фиброзе печени [87, 88].

**Определение уровня мРНК генов *MMP2*, *MMP9*, *ADAM17*, *NLRP3* в ЛПК.** Для определения уровня транскриптов генов из цельной крови выделяли ЛПК здоровых доноров и пациентов с НАЖБП (величина выборок указана в табл. 1) методом, основанным на способности изотонического раствора хлорида аммония гемолизировать эритроциты [89]. Тотальную РНК из ЛПК выделяли с помощью реагента ExtractRNA («ЕвроГен», Россия). Первую цепь комплементарной ДНК синтезировали из тотальной РНК с помощью набора MMLV RT kit («ЕвроГен»). Степень чистоты и концентрацию кДНК определяли на приборе SmartSpecPlus («Bio-Rad», США). Уровень мРНК генов в ЛПК оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе LightCycler 96 («Roche», Швейцария), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («ЕвроГен»). Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР-фрагментов. Повторность при ПЦР-анализе – 3-кратная. Уровень транскриптов изучаемых генов был рассчитан относительно уровня транскрипции гена *18S rRNA* по методу, описанному Livak и Schmittgen [90]. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР-РВ указаны в табл. 2, праймеры конструировали в программе Beacon Designer 5.

**ИФА.** Методом ИФА в плазме здоровых доноров ( $n = 21$ ) и пациентов с СП ( $n = 19$ ), НАСГ-СА ( $n = 19$ ), НАСГ-УА ( $n = 19$ ), НАСГ-ВА ( $n = 11$ ) определяли следующие показатели: матриксная металлопротеиназа 2 (тест-система «Human MMP2 ELISA Kit»; «ELK Biotechnology», Китай); матриксная металлопротеиназа 9 (тест-система «Human MMP9 ELISA Kit»; «ELK Biotechnology»); тканевой полипептид-специфический антиген (фрагменты цитокератина-18 (ФЦК-18) – показатель апоптоза гепатоцитов) (тест-система «TPS ELISA»; «Biotech», Швеция); фактор некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ )

(тест-система «Human TNF $\alpha$  Platinum ELISA»; «eBioscience», Австрия); интерлейкин-6 (ИЛ-6) (тест-система «Интерлейкин-6 – ИФА – Бест»; «Вектор-Бест»); растворимый ИЛ-6-рецептор (рИЛ-6Р) (тест-система «Human sIL-6R ELISA»; «eBioscience»); интерлейкин-8 (ИЛ-8) (тест-система «Интерлейкин-8 – ИФА – Бест»; «Вектор-Бест»).

**Определение активности каспазы 3 в ЛПК.** Активность каспазы 3 в ЛПК здоровых доноров ( $n = 26$ ) и пациентов с СП ( $n = 17$ ), НАСГ-СА ( $n = 19$ ), НАСГ-УА ( $n = 17$ ), НАСГ-ВА ( $n = 9$ ) определяли с использованием набора Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric («Sigma-Aldrich», США). Согласно инструкциям производителя, активность каспазы 3 определяли колориметрическим методом по скорости расщепления синтетического субстрата каспазы 3 (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilide) на планшетном ридере CLARIOstar («BMG Labtech GmbH», Германия) и выражали в нмоль р-нитроанилина (р-NA), образующегося за 1 мин, в расчете на 1 мл пробы (при условии, что 100 мкл лиазирующего буфера содержит  $10^7$  живых клеток).

**Статистический анализ** проведен с использованием программы GraphPad Prism v.7. Значения  $p < 0,05$  рассматривались как статистически значимые. Проводили тест на соответствие результатов нормальному распределению (с помощью критерия  $W$  Шапиро–Уилка). В связи с несоответствием распределений показателей в группахциальному использовали непараметрические критерии для анализа. При сравнении изучаемых показателей в группах использовали критерий  $H$  Краскела–Уоллиса с последующим парным сравнением групп с помощью критерия  $U$  Вилькоксона–Манна–Уитни с применением поправки Бонферрони при оценке значения  $p$ . Взаимосвязь показателей оценивали с помощью расчета рангового коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Для оценки силы связи между двумя величинами использовали шкалу Чедока, согласно которой значения  $r_s$  от 0,1 до 0,3 соответствуют слабой взаимосвязи, 0,3–0,5 – умеренной, 0,5–0,7 – заметной, 0,7–0,9 – высокой, более 0,9 – весьма высокой. Анализ ROC-кривых проводили по вычислению

значений площадей под кривыми (*AUC*), оптимальный порог отсечения определяли в соответствии с максимальным индексом Юдена [91, 92].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

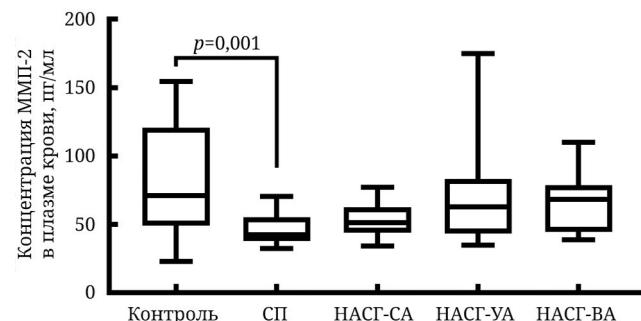
**Особенности клинико-лабораторной картины при СП и НАСГ.** Нами проведен сравнительный анализ клинико-лабораторных данных здоровых доноров и пациентов с СП и НАСГ разной активности (табл. 1). Согласно данным дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса, сравниваемые группы исследования статистически значимо различаются по ИГА ( $H = 87,99; p < 0,001$ ), уровню АЛТ ( $H = 83,28; p < 0,001$ ), АСТ ( $H = 75,46; p < 0,001$ ), общего билирубина ( $H = 18,66; p < 0,001$ ), ЩФ ( $H = 25,43; p < 0,001$ ), СРБ ( $H = 26,06; p < 0,001$ ), СОЭ ( $H = 24,98; p < 0,001$ ), ОХС ( $H = 18,68; p < 0,001$ ), ЛПНП ( $H = 10,93; p = 0,027$ ), ЛПНП ( $H = 21,42; p < 0,001$ ), ТГ ( $H = 15,89; p = 0,003$ ), FIB-4 ( $H = 19,98; p < 0,001$ ), APRI ( $H = 42,82; p < 0,001$ ), ИМТ ( $H = 21,02; p < 0,001$ ), ФЦК-18 ( $H = 37,79; p < 0,001$ ). При этом нет статистически значимых различий между группами по возрасту ( $H = 5,16; p = 0,271$ ), уровню лейкоцитов ( $H = 0,48; p = 0,976$ ), альбумина ( $H = 4,67; p = 0,323$ ) и глюкозы ( $H = 5,81; p = 0,214$ ) в крови.

Нужно отметить, что включенные в исследование пациенты с НАЖБП отличались от контроля повышенным уровнем ИМТ. Уровень FIB-4 также был выше у пациентов НАЖБП по сравнению со здоровыми людьми, за исключением группы НАСГ-СА, где уровень FIB-4 не отличался от контроля. Уровень APRI у пациентов с НАСГ был выше, чем у здоровых людей. Кроме того, группы пациентов достоверно не различались по FIB-4 и ИМТ, в то время как APRI у пациентов с НАСГ-УА и -ВА превосходил таковой у лиц с простым стеатозом печени. Согласно гистологическим данным, показателям ИМТ, FIB-4 и APRI, среди пациентов не было лиц с выраженным фиброзом и морбидным ожирением (табл. 1).

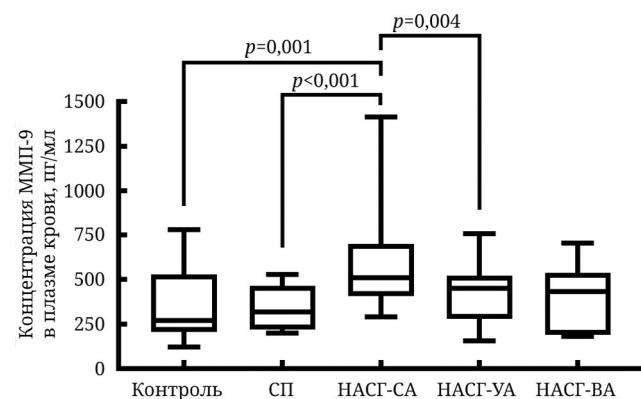
У пациентов СП рутинные клинико-лабораторные показатели крови не отличаются от контроля. При этом уровень специфического маркера апоптоза (ФЦК-18) у пациентов СП выше, чем у здоровых людей. При переходе от СП к НАСГ и по мере нарастания степени активности НАСГ повышаются маркеры цитолитического и холестатического синдромов (АЛАТ, АСАТ, ЩФ). Что касается маркеров воспаления, уровень СРБ повышен при НАСГ относительно контроля, а также относительно СП (в случае НАСГ-ВА). СОЭ при НАСГ-УА и -ВА выше, чем у здоровых людей и пациентов с НАСГ-СА, и не различается у других групп исследования. Концентрация ФЦК-18 при НАСГ повышена относительно контроля, при этом уровень ФЦК-18

в крови НАСГ высокой активности превышает таковой у пациентов с простым стеатозом (СП) и НАСГ-СА. Уровни ТГ и ОХС остаются нормальными при СП и повышены при НАСГ относительно контроля. Данные свидетельствуют о том, что повышение уровня ОХС происходит главным образом за счет нарастания концентрации ЛПНП (табл. 1).

**Уровень ММП-2 и ММП-9 в плазме крови при СП и НАСГ.** Согласно данным дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса, группы исследования (контрольная, СП, НАСГ-СА, -УА, -ВА) статистически значимо различаются по уровню ММП-2 ( $H = 15,62; p = 0,004$ ) и ММП-9 ( $H = 13,38; p = 0,010$ ) в плазме крови. Результаты сравнительного анализа уровней ММП-2 и ММП-9 в плазме крови здоровых людей, пациентов с СП, пациентов с НАСГ разной активности представлены на рис. 1 и рис. 2. Показано, что плазменный уровень ММП-2 при СП ниже, чем у здоровых людей, при этом не обнаружено различий в уровне данного показателя у пациентов с НАЖБП разных групп (СП и НАСГ разной степени гистологической активности) (рис. 1).



**Рис. 1.** Концентрация ММП-2 в плазме крови пациентов с НАЖБП и в контрольной группе. Данные представлены в виде: Q1–Q3, медиана, минимум, максимум. Указаны значения  $p$ , согласно *U*-критерию Манна–Уитни с поправкой Бонферрони



**Рис. 2.** Концентрация ММП-9 в плазме крови пациентов с НАЖБП и в контрольной группе. Данные представлены в виде: Q1–Q3, медиана, минимум, максимум. Указаны значения  $p$ , согласно *U*-критерию Манна–Уитни с поправкой Бонферрони

Согласно полученным результатам, уровень ММП-9 в плазме крови пациентов общей группы НАСГ, объединяющей все степени активности, составил (в виде  $M \pm m$ , в скобках – медиана)  $474,5 \pm 32,12$  (470,3) пг/мл, что достоверно выше, чем у здоровых людей ( $354,0 \pm 44,85$  (270,0) пг/мл;  $p = 0,026$ ) и пациентов СП ( $337,9 \pm 26,69$  (318,5) пг/мл;  $p = 0,018$ ). Показано, что концентрация ММП-9 в плазме крови пациентов с НАСГ-СА значимо выше, чем у здоровых людей, пациентов групп СП и НАСГ-УА (рис. 2). Эти результаты имеют потенциальную клиническую ценность для диагностики ранних форм НАЖБП при отсутствии значимого фиброза.

Для того чтобы оценить значимость плазменных уровней ММП-9 и ММП-2 в качестве диагностического теста для разграничения ранних форм НАЖБП, нами были построены и проанализированы ROC-кривые для данных показателей у пациентов НАСГ-СА относительно пациентов СП. Статистическая достоверность ROC-кривой по концентрации ММП-2 не обнаружена ( $AUC = 0,681$  (95%-ный доверительный интервал 0,509–0,854);  $p = 0,056$ ). Согласно анализу ROC-кривой для концентрации ММП-9 в плазме пациентов НАСГ-СА относительно пациентов СП, уровень ММП-9 в плазме крови имеет диагностическую значимость

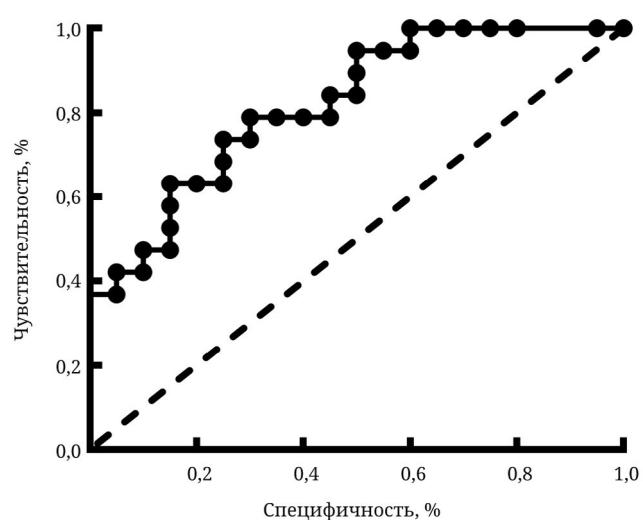


Рис. 3. ROC-кривая для концентрации ММП-9 в плазме пациентов НАСГ-СА относительно пациентов СП.  $AUC = 0,818$  (95%-ный доверительный интервал 0,689–0,948);  $p < 0,001$

для выявления НАСГ-СА среди пациентов с простым стеатозом (рис. 3). В соответствии с расчетом максимального индекса Юдена, оптимальный порог отсечения составляет  $>389,50$  пг/мл ММП-9 в плазме крови (табл. 3).

Таблица 3. Чувствительность, специфичность, отношение правдоподобия положительного результата, индекс Юдена при разных порогах отсечения ROC-кривой для концентрации ММП-9 в плазме пациентов НАСГ-СА относительно пациентов СП

Порог отсечения, пг/мл	Чувствительность (95% ДИ); Se	Специфичность (95% ДИ); Sp	Отношение правдоподобия; LR	Индекс Юдена; J
> 201,3	1,000 (0,832–1,000)	0,050 (0,003–0,236)	1,053	0,050
> 210,1	1,000 (0,832–1,000)	0,200 (0,081–0,416)	1,250	0,200
> 225,3	1,000 (0,832–1,000)	0,250 (0,112–0,469)	1,333	0,250
> 249,2	1,000 (0,832–1,000)	0,300 (0,146–0,519)	1,429	0,300
> 269,4	1,000 (0,832–1,000)	0,350 (0,181–0,567)	1,538	0,350
> 282,4	1,000 (0,832–1,000)	0,400 (0,219–0,613)	1,667	0,400
> 292,4	0,947 (0,754–0,997)	0,400 (0,219–0,613)	1,579	0,347
> 303,3	0,947 (0,754–0,997)	0,450 (0,258–0,658)	1,722	0,397
> 316,1	0,947 (0,754–0,997)	0,500 (0,299–0,701)	1,895	0,447
> 320,6	0,895 (0,686–0,981)	0,500 (0,299–0,701)	1,789	0,395
> 323,0	0,842 (0,624–0,945)	0,500 (0,299–0,701)	1,684	0,342
> 326,5	0,842 (0,624–0,945)	0,550 (0,342–0,742)	1,871	0,392
> 334,6	0,790 (0,567–0,915)	0,550 (0,342–0,742)	1,754	0,340
> 341,4	0,790 (0,567–0,915)	0,600 (0,387–0,781)	1,974	0,390

Таблица 3 (окончание)

Порог отсечения, пг/мл	Чувствительность (95% ДИ); <i>Se</i>	Специфичность (95% ДИ); <i>Sp</i>	Отношение правдоподобия; <i>LR</i>	Индекс Юдена; <i>J</i>
> 356,4	0,790 (0,567–0,915)	0,650 (0,433–0,819)	2,256	0,440
<b>&gt; 389,5</b>	<b>0,790 (0,567–0,915)</b>	<b>0,700 (0,481–0,855)</b>	<b>2,632</b>	<b>0,490</b>
> 414,5	0,737 (0,512–0,882)	0,700 (0,481–0,855)	2,456	0,437
> 422,1	0,737 (0,512–0,882)	0,750 (0,531–0,888)	2,947	0,487
> 428,1	0,684 (0,460–0,846)	0,750 (0,531–0,888)	2,737	0,434
> 455,3	0,632 (0,410–0,809)	0,750 (0,531–0,888)	2,526	0,382
> 489,0	0,632 (0,410–0,809)	0,800 (0,584–0,919)	3,158	0,432
> 502,0	0,632 (0,410–0,809)	0,850 (0,640–0,948)	4,211	0,482
> 504,1	0,579 (0,363–0,769)	0,850 (0,640–0,948)	3,860	0,429
> 507,2	0,526 (0,317–0,727)	0,850 (0,640–0,948)	3,509	0,376
> 516,4	0,474 (0,273–0,683)	0,850 (0,640–0,948)	3,158	0,324
> 523,0	0,474 (0,273–0,683)	0,900 (0,699–0,982)	4,737	0,374
> 524,2	0,421 (0,231–0,637)	0,900 (0,699–0,982)	4,211	0,321
> 526,4	0,421 (0,231–0,637)	0,950 (0,764–0,997)	8,421	0,371
> 528,4	0,368 (0,192–0,590)	0,950 (0,764–0,997)	7,368	0,318
> 546,2	0,368 (0,192–0,590)	1,000 (0,839–1,000)		0,368
> 583,9	0,316 (0,154–0,540)	1,000 (0,839–1,000)		0,316
> 652,4	0,263 (0,118–0,488)	1,000 (0,839–1,000)		0,263
> 732,8	0,211 (0,085–0,433)	1,000 (0,839–1,000)		0,211
> 882,7	0,158 (0,055–0,376)	1,000 (0,839–1,000)		0,158
> 1011,0	0,105 (0,019–0,314)	1,000 (0,839–1,000)		0,105
> 1218,0	0,053 (0,003–0,246)	1,000 (0,839–1,000)		0,053

Примечание. Жирным шрифтом выделен оптимальный порог отсечения, соответствующий максимальному индексу Юдена. Индекс Юдена (*J*) равен  $Se + Sp - 1$  [91, 92]; ДИ – доверительный интервал.

В связи со сложностью механизмов патогенеза НАЖБП и актуальностью изучения связи процессов воспаления, апоптоза и фиброза при данном заболевании была поставлена задача оценить расширенный комплекс биохимических и молекулярно-генетических показателей у пациентов СП и НАСГ разной активности и провести корреляционный анализ этих показателей с уровнями ММП-9 и ММП-2 в плазме крови. Поскольку при СП и НАСГ биопсия печени возможна в крайне редких случаях, особенно актуален поиск малоинвазивных маркеров НАЖБП, в связи с чем в качестве материала

для исследования используют периферическую кровь.

**Уровень мРНК генов MMP2, MMP9, ADAM17, NLRP3 в ЛПК.** Лейкоциты являются основными клетками, реализующими иммунновоспалительные процессы в печени при НАЖБП, лежащие в основе прогрессирования печеночно-клеточной недостаточности. В настоящем исследовании впервые проведен сравнительный анализ уровней мРНК генов MMP2, MMP9, ADAM17, NLRP3 в ЛПК доноров групп исследования. По результатам дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса группы исследования статистически значимо

различаются по уровню мРНК генов *MMP2* ( $H = 18,11$ ;  $p = 0,001$ ), *MMP9* ( $H = 11,91$ ;  $p = 0,018$ ), *ADAM17* ( $H = 13,81$ ;  $p = 0,008$ ) и *NLRP3* ( $H = 19,36$ ;  $p = 0,001$ ) в периферических лейкоцитах.

Показано, что уровень транскриптов гена *MMP2* в ЛПК пациентов с СП ниже, чем у здоровых

людей и пациентов НАСГ умеренной и высокой активности. При анализе уровня мРНК гена *MMP9* в ЛПК доноров исследуемых групп статистически значимых различий не обнаружено. Таким образом, результаты анализа групповых различий в уровнях экспрессии генов *MMP2*, *MMP9* в перифе-

**Таблица 4.** Уровень транскриптов генов *MMP2*, *MMP9*, *ADAM17*, *NLRP3* в ЛПК больных НАЖБП и здоровых людей

Показатель	Контроль	СП	НАСГ-СА	НАСГ-УА	НАСГ-ВА
Уровень транскриптов гена <i>MMP2</i> в ЛПК, отн. ед. $\times 1000$					
Медиана	0,125	0,037	0,015	0,137	0,182
Минимум	0,006	0,002	0,001	0,009	0,020
Максимум	0,822	0,078	1,900	3,400	4,910
Межквартильный размах	0,301	0,050	0,252	0,529	2,039
<i>p</i> (при $p < 0,005$ )		0,003*		0,001 <sup>#</sup>	0,001 <sup>#</sup>
Уровень транскриптов гена <i>MMP9</i> в ЛПК, отн. ед. $\times 1000$					
Медиана	0,010	0,014	0,007	0,026	0,031
Минимум	0,002	0,002	0,001	0,007	0,012
Максимум	0,030	0,085	0,051	0,101	0,115
Межквартильный размах	0,013	0,035	0,027	0,061	0,096
<i>p</i> (при $p < 0,005$ )					
Уровень транскриптов гена <i>ADAM17</i> в ЛПК, отн. ед. $\times 1000$					
Медиана	0,193	0,154	0,108	0,185	1,180
Минимум	0,008	0,015	0,001	0,013	0,204
Максимум	1,320	2,010	0,676	1,000	5,340
Межквартильный размах	0,452	0,666	0,483	0,481	3,167
<i>p</i> (при $p < 0,005$ )					0,002* 0,002 <sup>◊</sup> 0,002 <sup>Δ</sup>
Уровень транскриптов гена <i>NLRP3</i> в ЛПК, отн. ед. $\times 1000$					
Медиана	0,171	1,595	0,039	0,246	0,047
Минимум	0,034	0,323	0,003	0,008	0,018
Максимум	3,770	11,300	0,983	1,840	0,988
Межквартильный размах	0,329	2,973	0,195	0,759	0,609
<i>p</i> (при $p < 0,005$ )		0,001*	<0,001 <sup>#</sup>	0,002 <sup>#</sup>	0,002 <sup>#</sup>

Примечание. Достоверное отличие от контроля (\*), группы СП (#), группы НАСГ-СА (◊), группы НАСГ-УА (Δ) (*U*-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

**Таблица 5.** Уровень ФНОα, ИЛ-6, рИЛ-6Р, ИЛ-8 в плазме крови и активность каспазы 3 в ЛПК больных НАЖБП и здоровых людей

Показатель	Контроль	СП	НАСГ-СА	НАСГ-УА	НАСГ-ВА
ФНОα, пг/мл					
Медиана	3,52	5,92	5,75	7,13	6,00
Минимум	1,45	3,50	4,17	3,72	4,33
Максимум	8,23	9,00	7,83	9,50	8,67
Межквартильный размах	3,18	4,11	1,73	2,34	2,33
<i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005)		0,004*	0,002*	<0,001*	0,002*
ИЛ-6, пг/мл					
Медиана	2,00	4,38	5,22	5,07	7,25
Минимум	0,45	0,57	1,75	2,25	1,67
Максимум	9,06	13,96	19,48	14,50	37,00
Межквартильный размах	1,41	6,25	6,63	2,97	13,44
<i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005)		0,002*	<0,001*	<0,001*	0,002*
рИЛ-6Р, нг/мл					
Медиана	84,92	124,7	122,6	94,15	32,7
Минимум	18	40,61	39,2	24,79	14,36
Максимум	147,7	237,9	203,1	256,9	92,34
Межквартильный размах	73,79	55,30	95,36	120,63	31,83
<i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005)					0,004* 0,002# <0,001¤ 0,001¤
ИЛ-8, пг/мл					
Медиана	6,54	15,60	13,71	11,65	19,57
Минимум	1,97	9,57	3,00	5,14	4,71
Максимум	13,87	24,14	36,29	66,43	64,00
Межквартильный размах	6,38	8,21	21,36	12,54	24,41
<i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005)		<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,003*
Активность каспазы 3 в ЛПК, нмоль рNA/мин/мл					
Медиана	0,448	0,569	0,726	1,029	1,041
Минимум	0,116	0,182	0,460	0,218	0,411
Максимум	1,646	2,759	2,775	2,880	2,880
Межквартильный размах	0,487	0,472	0,428	0,725	1,183
<i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005)				0,001*	0,003*

Примечание. Достоверное отличие от контроля (\*), группы СП (#), группы НАСГ-СА (¤), группы НАСГ-УА (Δ) (*U*-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

**Таблица 6.** Коэффициенты корреляции по Спирмену ( $r_s$ ) плазменных уровней ММП-2, ММП-9 с уровнем изучаемых показателей крови пациентов НАЖБП и здоровых людей (при  $p < 0,05$ )

Показатель	Контроль		СП		НАСГ-СА		НАСГ-УА		НАСГ-ВА	
	ММП-2	ММП-9	ММП-2	ММП-9	ММП-2	ММП-9	ММП-2	ММП-9	ММП-2	ММП-9
ИГА										
АЛТ						-0,538				
АСТ										
Билирубин общий										
ЩФ										
СРБ										
СОЭ					0,761				0,833	
Лейкоциты	0,710									
Альбумин										
Глюкоза										
ОХС										
ЛПВП		-0,689								
ЛПНП										
ТГ						-0,572			-0,568	
APRI										
FIB-4										
мРНК MMP2			0,611							
мРНК MMP9						-0,618				
мРНК ADAM17										
мРНК NLRP3										
ФНО $\alpha$										
ИЛ-6										
рИЛ-6Р						0,715				0,753
ИЛ-8										
ФЦК-18										
Активность каспазы 3		0,669								-0,754

рических лейкоцитах (табл. 4) корреспондируют с различиями в концентрациях кодируемых ими ферментов в крови (рис. 1; рис. 3) только в случае уровня ММП2. В плазме крови содержание этого фермента и количество мРНК гена MMP2 в ЛПК у пациентов СП оказались ниже по сравнению с

контрольной группой. Уровень транскриптов гена ADAM17 в ЛПК при НАСГ-ВА выше, чем у доноров контрольной группы, НАСГ-СА и НАСГ-УА. Экспрессия гена NLRP3 в периферических лейкоцитах людей с простым стеатозом превышает таковую у доноров всех других групп исследования (табл. 4).

**Уровень ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, рИЛ-6Р, ИЛ-8 в плазме крови и активность каспазы 3 в ЛПК.** Согласно результатам дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса, группы исследования статистически значимо различаются по уровню ФНО $\alpha$  ( $H = 24,56$ ;  $p < 0,001$ ), ИЛ-6 ( $H = 33,68$ ;  $p < 0,001$ ), рИЛ-6Р ( $H = 20,71$ ;  $p < 0,001$ ) и ИЛ-8 ( $H = 22,46$ ,  $p < 0,001$ ) в плазме крови. Кроме того, обнаружены статистически значимые различия между группами по активности каспазы 3 в ЛПК ( $H = 18,22$ ;  $p = 0,001$ ).

Показано, что в плазме крови пациентов СП и НАСГ всех степеней активности повышен уровень провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8 относительно контроля, при этом различия в содержании этих цитокинов у разных групп пациентов НАЖБП не зарегистрированы. Уровень рИЛ-6Р в плазме крови при НАСГ-ВА ниже, чем у доноров других групп. Активность каспазы 3 в ЛПК при НАСГ умеренной и высокой активности выше, чем у здоровых людей (табл. 5).

**Корреляционные связи между уровнем ММП-2, ММП-9 и уровнем изучаемых показателей крови.** Согласно полученным результатам, уровни ММП-2 и ММП-9 в плазме крови пациентов с НАЖБП и здоровых людей не коррелируют между собой ( $p > 0,05$ ). Проведен корреляционный анализ уровней ММП-2 и ММП-9 в плазме крови с комплексом изучаемых биохимических и молекулярно-генетических показателей (табл. 6).

В контрольной группе выявлена сильная связь между уровнем ММП-2 и уровнем лейкоцитов. У пациентов СП концентрация ММП-2 в крови положительно коррелирует с уровнем мРНК гена MMP2 в ЛПК. При НАСГ-СА и -ВА выявлены положительные корреляции заметной и высокой силы уровня ММП-2 с клиническим маркером воспаления (СОЭ) (табл. 6).

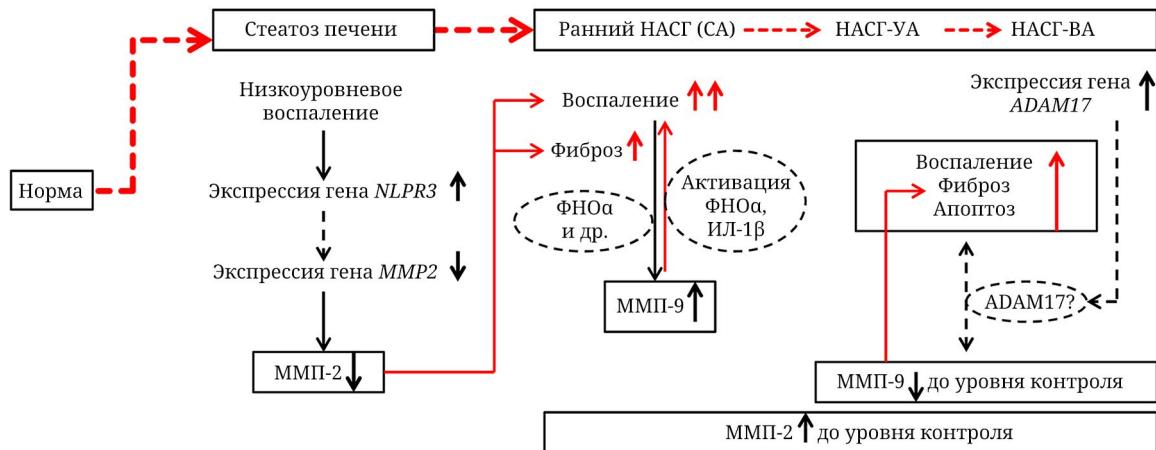
У здоровых людей выявлена заметная отрицательная корреляция уровня ММП-9 в плазме крови с содержанием ЛПВП и положительная – с активностью каспазы 3 в ЛПК. У пациентов с НАСГ-СА уровень ММП-9 заметно отрицательно коррелирует с АЛТ, АПРИ, уровнем мРНК гена ADAM17 в ЛПК и положительно – с содержанием рИЛ-6Р в крови. При НАСГ-УА обнаружена заметная отрицательная связь содержания ММП-9 с ИГА, уровнем ТГ и активностью каспазы 3 в ЛПК. У пациентов НАСГ-ВА выявлена сильная положительная связь плазменных уровней ММП-9 и рИЛ-6Р. Кроме того, при НАСГ-ВА концентрация ММП-9 отрицательно коррелирует с активностью каспазы 3 (табл. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

СП является ранней формой НАЖБП и характеризуется доброкачественным клиническим те-

чением, тогда как НАСГ отличается прогрессирующим течением с возможным развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [19, 20]. Одной из важных проблем гастроэнтерологии является различие раннего НАСГ от СП, что достаточно сложно сделать на основании изменения рутинных лабораторных показателей, которое может быть неспецифичным для диагностики, что подтверждается результатами проведенного нами сравнительного анализа клинико-лабораторных данных здоровых доноров и пациентов с НАЖБП (СП и НАСГ разной степени гистологической активности) (табл. 1). При стеатозе печени рутинные клинико-лабораторные показатели крови не отличаются от контроля, уровень показателя апоптоза гепатоцитов (ФЦК-18) выше, чем у здоровых людей. НАСГ слабой активности отличается от СП повышенным уровнем аминотрансфераз и ЛПНП. По мере нарастания активности НАСГ закономерно повышается уровень маркеров воспаления, нарастают проявления цитолитического и холестатического синдромов и изменяется липидный профиль. В настоящем исследовании среди пациентов не было людей с выраженным фиброзом печени, при этом были выявлены различия уровней ММП-2 и ММП-9 в плазме крови и мРНК гена MMP2 в ЛПК пациентов разных групп исследования.

Согласно нашим данным, уровень мРНК гена MMP2 в ЛПК (табл. 4) и содержание ММП-2 в плазме крови (рис. 1) снижены у пациентов СП относительно контроля, в остальных случаях групповые различия на уровне экспрессии генов MMP2, MMP9 в периферических лейкоцитах не корреспондируют с различиями в концентрациях кодируемых ферментов в крови. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии однонаправленных изменений в профилях экспрессии генов MMP2 и MMP9 в ЛПК и уровне кодируемых ферментов в плазме в зависимости от формы НАЖБП и степени активности НАСГ, что может быть связано со сложной регуляцией ММП. Известно, что уровень активной формы ММП может регулироваться на уровне транскрипции (экспрессии кодирующих генов) и на уровне механизмов, влияющих на активность фермента (среди них активация зигогена, компартментализация активных протеиназных процессов, связывание с тканевыми ингибиторами металло-протеина) [34]. Trojanek et al. [71] провели анализ уровня мРНК генов ММП и их тканевых ингибиторов в ЛПК детей с ультразвуковыми признаками жировой болезни печени и показали, что у детей с НАЖБП уровни мРНК генов MMP9, TIMP2 в ЛПК и концентрация ММП-9 и тканевого ингибитора металлопротеина 1 (ТИМП-1) в плазме повышены по сравнению с контрольной группой.



**Рис. 4.** Схема, отражающая предполагаемую связь изменения уровней ММП-2 и -9 и разных стадий НАЖБП. Объяснения в тексте; ↑ – увеличение; ↓ – уменьшение

Авторы пришли к выводу, что изменения в профилях экспрессии *MMP/TIMP* в лейкоцитах в основном не связаны с их уровнями в плазме [71]. Cursio et al. [60] на крысиной модели повреждения печени, вызванного ишемией/реперфузией, также показали, что уровень мРНК генов ММП может не соответствовать содержанию активной формы ММП в зависимости от стадии фиброза: экспрессия мРНК гена *MMP2* повышалась на всех стадиях повреждения печени, однако активная ММП-2 была обнаружена на более поздних стадиях, во время разрешения фиброза. Авторы показали, что экспрессия гена *MMP2*, а также генов, кодирующих ММП-14 и ТИМП-2 (необходимых для активации ММП-2), индуцируются с задержкой и длительно при повреждении печени [60]. Авторы отметили, что ранняя индукция ММП после реперфузии способствует повреждению печени и может способствовать гибели клеток. Можем предположить, что при СП действуют механизмы, которые тонко регулируют уровень ММП-2 и -9, не допуская их повышения на первых этапах повреждения печени. Важно, что в нормальной печени уровень ММП сбалансировано регулируется множеством молекул, и нарушение этого баланса вносит вклад в развитие патологии. Например, несбалансированная экспрессия ТИМП и ММП может ускорить или обострить развитие фиброза [93].

Мы выявили снижение ММП-2 при СП, хотя в последующих стадиях НАЖБП отличия от контрольной группы не обнаружено (рис. 1). Уровень транскриптов гена *MMP2* в ЛПК пациентов СП ниже, чем у пациентов НАСГ-УА и -ВА (табл. 4). Наши данные позволяют предполагать, что уровень ММП-2 при СП снижается за счет снижения уровня транскрипции гена *MMP2*, что косвенно подтверждается также данными корреляционного анализа, согласно которым выявлена замет-

ная корреляция между уровнем мРНК гена *MMP2* и содержанием ММП-2 в крови при СП (табл. 6). На рис. 4 представлена схема, отражающая предполагаемую связь изменения уровня ММП-2 и -9 и разных стадий НАЖБП. По нашему мнению, снижение уровня ММП-2 в крови именно на стадии простого стеатоза при НАЖБП (в условиях отсутствия выраженного фиброза) объясняется запуском «низкоуровневого воспаления». Низкоуровневое хроническое воспаление (low-grade chronic inflammation) при гепатостеатозе имеет основополагающее значение в прогрессировании НАЖБП. К основным факторам, осуществляющим регуляцию экспрессии различных растворимых провоспалительных медиаторов (цитокинов и хемокинов) и молекул адгезии лейкоцитов при запуске воспаления, относится индуцируемый фактор транскрипции NF-кВ [94]. К генам-мишениям NF-кВ относятся гены, кодирующие ФНО $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6, MCP-1 и другие [95]. Белая жировая ткань является основным жировым депо и крупнейшим эндокринным органом, который системно секretирует адипокины и цитокины. При увеличении пула свободных жирных кислот адипоциты подвергаются аномальному расширению, что приводит к гипоксии и старению, вызванному ремоделированием. В этих условиях адипоциты испытывают стресс эндоплазматического ретикулума, повышается продукция активных форм кислорода. Слабо выраженное хроническое воспаление инициируется и поддерживается с течением времени дисфункциональными адипоцитами, которые секретируют воспалительные адипоцитокины (лептин, резистин, ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и другие), и инфильтрацией иммунных клеток, продуцирующих цитокины и хемокины [96]. Большую роль в процессах низкоуровневого воспаления отводят активированным макрофагам жировой ткани, которые участвуют в воспалительных сигнальных

путях, включающих JNK, IKK/NF-кВ и JAK/STAT, посредством секреции воспалительных факторов, таких как ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$  и ЛТВ4, тем самым вызывая хроническое воспаление жировой ткани, печени и мышц, что в дальнейшем приводит к резистентности к инсулину [97].

Низкоуровневое воспаление, которое имеет место при простом стеатозе печени, не проявляется гистологически, не отражается в изменениях рутинных клинико-лабораторных показателей крови (табл. 1), однако регистрируется повышение провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8) в крови по сравнению с контролем (табл. 5). Запуск воспалительных процессов на самой ранней стадии патогенеза НАЖБП (СП) подтверждается также повышением экспрессии в периферических лейкоцитах гена *NLRP3*, кодирующего ключевой компонент NLRP3-инфламмосомы (табл. 4). NLRP3-инфламмосома играет решающую роль в воспалении при НАЖБП, способствуя повреждению печени и фиброзу при развитии НАСГ [81, 98]. Белок NLRP3 (pyrin domain containing protein 3) взаимодействует с апоптоз-ассоциированным белком PYCARD/ASC, содержащим домен рекрутования каспазы 1, расщепляющей предшественники ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-18 с образованием их биологически активных форм [81]. Как известно, ИЛ-1 $\beta$  индуцирует продукцию ММП-2 клетками соединительной ткани, а активированная ММП-2, свою очередь, отрицательно регулирует активность ИЛ-1 $\beta$  посредством его деградации [54]. Есть данные о том, что экспрессия гена *NLRP3* в печени повышается у мышей с индуцированным стеатозом уже на ранней стадии (при СП), при этом увеличение компонентов NLRP3-инфламмосомы на уровне белка происходит только на стадии НАСГ [99]. Согласно нашим данным, на стадии СП имеет место понижение уровня ММП-2 в крови и повышение уровня транскриптов гена *NLRP3* в ЛПК, тогда как при трансформации СП в НАСГ (на стадии НАСГ) концентрация ММП-2 и уровень экспрессии гена *NLRP3* не отличаются от группы здоровых людей (рис. 1; табл. 4). Предполагаем, что снижение уровня ММП-2 при СП может приводить к активации/усилению воспаления. В пользу этого выступают данные о противовоспалительных свойствах ММП-2. При дефиците ММП-2 у человека развивается тяжелый воспалительный и метаболический синдром, включающий сердечную дисфункцию, вероятно, за счет избытка сердечной фосфолипазы А2 (сердечная sPLA2). sPLA2 высвобождается из кардиомиоцитов в ответ на моноцитарный хемоатрактантный белок-3 (MCP-3) [52]. MCP-3 является провоспалительным цитокином, ММП-2 инактивирует MCP-3 расщеплением. Расщепленный MCP-3 связывается с CC-хемокиновыми рецепторами (CCR1, CCR2

и CCR3), действуя как общий антагонист хемокинов [53]. ММП-2 реализует противовоспалительное действие также посредством деградации провоспалительного ИЛ-1 $\beta$  [54]. Согласно нашим данным, при НАСГ наблюдается повышение уровня ММП-2 до уровня контроля и обнаруживается положительная корреляция концентрации ММП-2 в крови с СОЭ у пациентов НАСГ-СА, НАСГ-ВА (сила связи оценивается как высокая) (табл. 6), что может быть связано с трансформацией низкоуровневого воспаления в активное и повышением активности NLRP3-инфламмосомы. Большую роль в реализации этой связи играет ИЛ-1 $\beta$ , который, по данным, полученным нами ранее, повышен при СП и НАСГ относительно контроля и на цирротической стадии НАЖБП достигает максимума [77].

Снижение уровня ММП-2 при стеатозе печени может быть связано не только с запуском провоспалительных механизмов (формированием и поддержанием низкоуровневого воспаления), но и с активацией профибротических механизмов и подавлением продукции ММП-2, выполняющей протективную роль. Показано, что дефицит ММП-2 вызывает активацию ЗКП и ускоряет фиброз в мышиных моделях фиброза, индуцированного СС14 и холестазом [39, 40], предположительно, за счет активации продукции ТИМП-1 [40]. Кроме того, показано, что ММП-2 подавляет экспрессию коллагена α1(I) активированными ЗКП, обеспечивая тем самым защитную роль при фиброгенезе [39]. Согласно данным Were et al. [81], уровень мРНК гена *NLRP3* в печени повышен при НАСГ и коррелирует с отложением коллагена, при этом делеция *Nlrp3* у мышей с индуцируемым НАСГ и фиброзом приводит к защите от фиброза печени и снижению мРНК гена коллагена I типа *COL1A1* по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом, можно предположить, что активация воспаления при СП приводит к активации экспрессии гена *NLRP3*, что влечет за собой повышение экспрессии гена, кодирующего про-альфа 1-цепь коллагена I. Уровень ММП-2, способной подавлять экспрессию коллагена α1(I) активированными ЗКП, при этом снижен, что приводит к избыточному синтезу коллагена I, важного компонента ВКМ печени.

Нами впервые показано, что повышение концентрации ММП-9 в плазме крови пациентов с НАСГ-СА имеет диагностическую значимость для выявления НАСГ-СА среди пациентов с простым стеатозом с оптимальным порогом отсечения >389,50 пг/мл ММП-9 в плазме крови (табл. 3). Эти результаты имеют потенциальную клиническую ценность для диагностики ранних форм НАЖБП при отсутствии значимого фиброза. Другими исследователями предпринимались попытки оце-

нить уровень ММП в крови пациентов НАЖБП и рассмотреть возможность использования данных показателей в качестве маркеров разграничения форм заболевания (НАСГ и СП) и стадий фиброза. Trojanek et al. [71] показали, что у детей с НАЖБП уровни мРНК *MMP9* и *TIMP2* в ЛПК и концентрация ММП-9 и ТИМП-1 в плазме повышены по сравнению с контрольной группой. Однако группа пациентов в данном исследовании была сформирована только из детей с высоким уровнем АЛТ и АСТ [71]. В другой работе сывороточные уровни ММП-9, ТИМП-1 и ТИМП-2 были оценены в качестве клинико-лабораторных маркеров фиброза печени при НАЖБП [73]. Согласно расчетам по формуле Кульбака, авторы отнесли уровень ММП-9 в сыворотке крови к наиболее информативным показателям в оценке прогрессирования начальных стадий фиброза (I → II), а уровень ТИМП-1 и ТИМП-2 – к более информативным в отношении прогрессирования фиброза II в III стадию. При этом статистически значимые различия между группами пациентов в зависимости от степени фиброза выявлены только по уровню ТИМП-2 и не обнаружены для концентрации ММП-9 и ТИМП-1 в сыворотке крови [73]. Другими авторами был выявлен повышенный уровень ММП-2 и ММП-9 в крови у больных НАЖБП по сравнению с контролем, однако данные показатели не имели диагностической значимости для различия НАСГ от СП. При этом около половины пациентов с НАЖБП имели сахарный диабет [100]. В одном исследовании было показано, что уровень ММП-9 имеет прогностическую значимость для выявления НАСГ у пациентов с морбидным ожирением, которым показана бariatрическая операция [101]. В проведенное нами исследование не были включены пациенты НАЖБП с диабетом, морбидным ожирением, выраженным фиброзом. Кроме того, мы рассматривали НАСГ разной степени гистологической активности, в том числе НАСГ-СА.

Мы считаем, что выявленное нами повышение уровня ММП-9 в крови при раннем НАСГ (НАСГ-СА) связано с ролью ММП-9 в активной миграции иммунокомпетентных клеток крови в печень на раннем этапе трансформации стеатоза печени в стеатогепатит, когда запускаются гепатоцеллюлярная баллонная дегенерация, дольковое и портальное воспаление. Считается, что уровень экспрессии ММП-2 относительно постоянен и не зависит от содержания цитокинов или факторов роста, а базальные уровни ММП-9 обычно низки, и ее экспрессия может индуцироваться повышенным уровнем цитокинов/хемокинов, включая ФНО $\alpha$  [56]. Нами показано, что концентрации основных провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8) в крови при СП и НАСГ выше

по сравнению с контролем и не различаются в зависимости от формы НАЖБП и активности НАСГ (табл. 5). Цитокины и другие провоспалительные факторы могут индуцировать выработку ММП-9 моноцитами, лейкоцитами, макрофагами и фибробластами [29, 56]. ММП-9, в свою очередь, участвует в процессах воспаления, активируя провоспалительные цитокины, такие как ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  [51, 70], а также способствуя инфильтрации лейкоцитов в печень [48–50]. Накоплены данные, свидетельствующие о снижении инфильтрации лейкоцитов в печень при дефиците ММП-9. В модели экспериментально вызванного стеатоза у мышей нокаут гена *Mmp9* приводил к снижению инфильтрации лейкоцитов, экспрессии провоспалительных цитокинов и некроза печени по сравнению с мышами дикого типа [48]. Также показано, что ММП-9 является критическим медиатором миграции лейкоцитов при повреждении печени, вызванном ишемией/реперфузией [49]. ММП-9 способствует адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и транспорту нейтрофилов в воспаленные ткани посредством расщепления большого эндотелина-1 (ЕТ-1) с образованием ЕТ-1(1–32), который связывается с рецептором эндотелина А, приводя к снижению экспрессии L-селектина и активации интегрина CD11b/CD18 на поверхности нейтрофилов [50]. Таким образом, высокий уровень ММП-9 в плазме крови при раннем НАСГ (НАСГ-СА) может быть связан с активацией воспалительного процесса при прогрессировании НАЖБП от СП к НАСГ, в том числе с активной миграцией иммунокомпетентных клеток крови в печень.

Что касается уровня ММП-9 при более высокой активности НАСГ (НАСГ-УА, -ВА), он оказался понижен до уровня контроля, что может быть связано с преобладанием антифибротических эффектов данной металлопротеазы. Участие ММП-9 в антифибротических механизмах при НАСГ косвенно подтверждается результатами корреляционного анализа, согласно которым ММП-9 заметно отрицательно коррелирует с АЛТ и APRI при НАСГ-СА и также отрицательно – с ИГА при НАСГ-УА (табл. 6). Отрицательная корреляция уровня ММП-9 в крови с показателями фиброза была также выявлена в работе Goyale et al. [102]. Есть подтверждения того, что ММП-9 играет важную роль в разрешении фиброза печени [42, 43]. ММП-9 может активировать апоптоз ЗКП [41], а также способствовать переключению макрофагов с M1 (воспалительного) на M2 (прорегенеративный) тип [42].

Ранее нами были показаны различия цитокинового профиля и уровней некоторых показателей апоптоза в крови пациентов с разными формами НАЖБП, что подтверждает тесную связь

процессов воспаления и апоптоза при прогрессировании НАЖБП [77, 78]. Развитие НАСГ сопровождается активацией процессов воспаления, фиброза и апоптоза [19, 20]. Согласно результатам анализа связи между изменениями концентрации ММП-9 и уровнем изучаемых показателей крови пациентов НАЖБП и здоровых людей, при НАСГ-СА уровень ММП-9 в плазме отрицательно коррелирует с уровнем мРНК гена *ADAM17* в ЛПК и положительно – с содержанием рИЛ-6Р в крови (табл. 6). Уровень транскриптов гена *ADAM17* в ЛПК при НАСГ высокой активности выше, чем у здоровых людей и пациентов групп НАСГ-СА и -УА. *ADAM17* является важным регулятором процессов воспаления и регенерации, расщепляя эктодомены различных трансмембранных белков, таких как факторы роста, рецепторы и их лиганды, цитокины и молекулы клеточной адгезии [103], а также принимает участие в процессах апоптоза и фиброза [80]. Фермент *ADAM17* опосредует индуцированный апоптозом каспазозависимый шеддинг растворимого рецептора ИЛ-6 (рИЛ-6Р) из клеточной мембраны, осуществляя протеолитическое высвобождение ФНО $\alpha$  [80]. Ранее нами выявлена тесная связь изменения уровня рИЛ-6Р с процессами апоптоза ЛПК и гепатоцитов [78]. Li et al. [79] показали, что *ADAM17* опосредует экспрессию ММП-9 через ось *ADAM17/TNF $\alpha$ /NF-кВ*. Также авторы показали, что нацеливание на *ADAM17* интерферирующей РНК с помощью лентивирусного вектора подавляет индуцированную липополисахаридом экспрессию ММП-9 в эпителиальных клетках легких посредством ингибирования передачи сигналов TNF $\alpha$ /NF-кВ [79]. Вероятно, одной из ключевых молекул в реализации выявленной нами сильной положительной связи плазменных уровней ММП-9 и рИЛ-6Р при НАСГ-ВА (табл. 6) выступает *ADAM17*. Логично было бы ожидать, что высокая концентрации рИЛ-6Р в крови будет соответствовать высокому уровню мРНК гена *ADAM17*, но, по нашим данным, при НАСГ-ВА уровень мРНК гена *ADAM17* в ЛПК оказался выше, чем у здоровых людей, НАСГ-СА и -УА (табл. 4), а уровень рИЛ-6Р – ниже, чем у других групп (табл. 5). Здесь необходимо отметить, что мы оценивали экспрессию *ADAM17* только на уровне транскриптов гена, поэтому не исключено, что на уровне белка могут быть получены иные данные.

В последнее время появляется все больше сведений об участии ММП в реализации апоптоза гепатоцитов. Показано, что у *Mtrp9<sup>-/-</sup>*-мышей ослаблена регенерация печени после частичной гепатэктомии, снижен уровень апоптоза гепатоцитов (согласно результатам TUNEL) и экспрессия активной формы каспазы 3 [67]. В работе An et al. [104] был описан эффект розмариновой

кислоты на клетки HepG2. Обработка розмариновой кислотой дозозависимо усиливала апоптоз клеток HepG2, при этом экспрессия ММП-9 снижалась, а уровень расщепленной каспазы 3 был увеличен [104]. В нашем исследовании уровень ФЦК-18, который является специфическим показателем апоптоза гепатоцитов, повышен при СП и НАСГ относительно контроля и нарастает при прогрессировании НАСГ (табл. 1). При этом активность каспазы 3 в периферических лейкоцитах при НАСГ-УА и -ВА выше, чем у здоровых людей (табл. 5). Нами выявлена заметная положительная корреляция между уровнем ММП-9 в плазме и активностью каспазы 3 в ЛПК доноров контрольной группы, в то время как при НАСГ-УА и -ВА данные показатели коррелируют отрицательно (табл. 6). Таким образом, при НАЖБП уровень ММП-9 может быть связан не только с воспалением, но и с процессом апоптоза. Вероятно, на фоне активации воспаления при переходе СП к раннему НАСГ повышается уровень ММП-9 в крови. При повышении активности НАСГ происходит усиление апоптоза гепатоцитов (согласно уровню ФЦК-18), повышается уровень активности каспазы 3 в ЛПК, при этом уровень ММП-9 в крови снижается до уровня контроля и СП. Полученные нами данные о снижении уровня ММП-9 при усилии апоптоза согласуются с результатами культурального эксперимента An et al. [104].

Таким образом, уровень ММП-2 и ММП-9 может быть связан с наличием и активностью воспаления в паренхиме печени, в том числе на ранних стадиях патогенеза НАЖБП, когда имеет место низкоуровневое воспаление и запуск процессов фиброгенеза. Снижение уровня ММП-2 в крови при СП может означать подавление противовоспалительных и антифибротических реакций, в которых участвует ММП-2. С другой стороны, при СП активируются провоспалительные процессы, в том числе экспрессия гена *NLRP3* в периферических лейкоцитах больных НАЖБП, что было показано нами впервые. Развитие НАСГ сопровождается активацией процессов воспаления, фиброза и апоптоза. Высокий уровень ММП-9 в плазме крови при раннем НАСГ (НАСГ-СА) может быть связан с активацией воспалительного процесса при прогрессировании НАЖБП от СП к НАСГ. Провоспалительные факторы индуцируют продукцию ММП-9, которая усиливает воспаление, процессируя провоспалительные цитокины и способствуя инфильтрации лейкоцитов в печень. Дальнейшее снижение уровня ММП-9 при прогрессировании НАСГ может быть связано с преобладанием антифибротических эффектов данной металлопротеазы, а также с активацией процессов апоптоза.

Возможно, определенную роль в реализации этой связи играет ADAM17.

**Ограничения исследования.** Роль тканевых ингибиторов металлопротеиназ в регуляции экспрессии ММП-2 и -9 при прогрессировании НАЖБП еще предстоит оценить. Кроме того, ограничением данного исследования может служить отсутствие данных об уровне протеолитической активности ММП-2 и ММП-9 в крови исследуемых, что затрудняет сравнение результатов с уже имеющимися в литературе сведениями [105, 106].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые показано одновременное снижение ММП-2 при СП на фоне активации NLRP3-зависимых провоспалительных каскадов, что может иметь значение при дифференциальной диагностике простого стеатоза, если в будущих исследованиях будет подтверждено, что уровень ММП-2 стабильно снижен на протяжении всей стадии стеатоза. Мы также обнаружили повышение ММП-9 при НАСГ-СА, отражающее дебют морфологической трансформации заболевания, миграцию лейкоцитов и гибель гепатоцитов. В связи с этим считаем, что ММП-9-связанные молекулярно-биологические каскады могут открыть новые терапевтические мишени, которые помогут купировать трансформацию стеатоза в стеатогепатит. Мы впервые показали, что уровень ММП-9 в плазме крови >389,50 пг/мл имеет диагностическую значимость для выявления раннего НАСГ (слабой активности) среди пациентов с простым стеатозом, что представляется особенно перспективным для диагностики НАСГ из-за невозможности выполнения биопсии печени по этическим причинам и вследствие диагностических ограничений.

Полученные результаты расширяют имеющееся на данный момент понимание роли ММП-2 и ММП-9 в реализации процессов воспаления, фиброза и апоптоза при прогрессировании НАЖБП. Представляется перспективным более глубокое изучение роли желатиназ на ранних стадиях заболевания, в том числе при трансформации стеатоза печени в НАСГ, с целью разработки терапевтических стратегий для снижения риска прогрессирования заболевания.

**Вклад авторов.** И.В. Курбатова – концепция, планирование и проведение экспериментов, статистическая обработка и обсуждение результатов, написание и редактирование текста; Л.В. Топчиева – планирование и проведение экспериментов, обсуждение результатов, редактирование текста; О.П. Дуданова – формирование групп исследования, обсуждение результатов, редактирование текста; А.А. Шиповская – формирование и клинико-лабораторная характеристика групп исследования.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № FMEN-2022-0009 (государственная регистрация № 122031100064-4).

**Благодарности.** Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ «Карельский научный центр РАН».

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

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маевская М. В., Котовская Ю. В., Ивашкин В. Т., Ткачева О. Н., Трошина Е. А., Шестакова М. В., Бредер В. В., Гейвандова Н. И., Дощицин В. Л., Дудинская Е. Н., Ершова Е. В., Кодзоева Х. Б., Комшилова К. А., Корочанская Н. В., Майоров А. Ю., Мишина Е. Е., Надинская М. Ю., Никитин И. Г., Погосова Н. В., Тарзиманова А. И., Шамхалова М. Ш. (2022) Национальный Консенсус для врачей по ведению взрослых пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и ее основными коморбидными состояниями, *Ter. Arxiv*, **94**, 216-253, <https://doi.org/10.26442/00403660.2022.02.201363>.
2. Le, M. H., Yeo, Y. H., Li, X., Li, J., Zou, B., Wu, Y., Ye, Q., Huang, D. Q., Zhao, C., Zhang, J., Liu, C., Chang, N., Xing, F., Yan, S., Wan, Z. H., Tang, N. S. Y., Mayumi, M., Liu, X., Liu, C., Rui, F., Yang, H., Yang, Y., Jin, R., Le, R. H. X., Xu, Y., Le, D. M., Barnett, S., Stave, C. D., et al. (2022) 2019 global NAFLD prevalence: a systematic review and meta-analysis, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **20**, 2809-2817.e28, <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.12.002>.
3. Younossi, Z. M., Golabi, P., Paik, J. M., Henry, A., Van Dongen, C., and Henry, L. (2023) The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review, *Hepatology*, **77**, 1335-1347, <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000004>.

4. Riazi, K., Azhari, H., Charette, J. H., Underwood, F. E., King, J. A., Afshar, E. E., Swain, M. G., Congly, S. E., Kaplan, G. G., and Shaheen, A. A. (2022) The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, **7**, 851-861, [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00165-0).
5. Маев И. В., Андреев Д. Н., Кучерявый Ю. А. (2023) Распространенность неалкогольной жировой болезни печени в России: мета-анализ, *Consilium Medicum*, **25**, 313-319, <https://doi.org/10.26442/20751753.2023.5.202155>.
6. Arab, J. P., Arrese, M., and Trauner, M. (2018) Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *Annu. Rev. Pathol.*, **13**, 321-350, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>.
7. Parthasarathy, G., Revelo, X., and Malhi, H. (2020) Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: an overview, *Hepatol. Commun.*, **4**, 478-492, <https://doi.org/10.1002/hep4.1479>.
8. Loomba, R., Friedman, S. L., and Shulman, G. I. (2021) Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease, *Cell*, **184**, 2537-2564, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.015>.
9. Lee, K. C., Wu, P. S., and Lin, H. C. (2023) Pathogenesis and treatment of non-alcoholic steatohepatitis and its fibrosis, *Clin. Mol. Hepatol.*, **29**, 77-98, <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0237>.
10. Tilg, H., and Moschen, A. R. (2010) Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis, *Hepatology*, **52**, 1836-1846, <https://doi.org/10.1002/hep.24001>.
11. Buzzetti, E., Pinzani, M., and Tsochatzis, E. A. (2016) The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Metabolism*, **65**, 1038-1048, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.
12. Ziolkowska, S., Binienda, A., Jabłkowski, M., Szemraj, J., and Czarny, P. (2021) The interplay between insulin resistance, inflammation, oxidative stress, base excision repair and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11128, <https://doi.org/10.3390/ijms222011128>.
13. Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., and Parks, E. J. (2014) Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, **146**, 726-735, 209, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.049>.
14. Nassir, F. (2022) NAFLD: Mechanisms, treatments, and biomarkers, *Biomolecules*, **12**, 824, <https://doi.org/10.3390/biom12060824>.
15. Fujii, H., Kawada, N., and Japan Study Group of Nafld Jsg-Nafld (2020) The role of insulin resistance and diabetes in nonalcoholic fatty liver disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3863, <https://doi.org/10.3390/ijms21113863>.
16. Jung, U. J., and Choi, M. S. (2014) Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 6184-6223, <https://doi.org/10.3390/ijms15046184>.
17. Ji, Y., Yin, Y., Li, Z., and Zhang, W. (2019) Gut microbiota-derived components and metabolites in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Nutrients*, **11**, 1712, <https://doi.org/10.3390/nu11081712>.
18. Anwar, S. D., Foster, C., and Ashraf, A. (2023) Lipid disorders and metabolic-associated fatty liver disease, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **52**, 445-457, <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2023.01.003>.
19. Ивашкин В. Т., Маевская М. В., Жаркова М. С., Котовская Ю. В., Ткачева О. Н., Трошина Е. А., Шестакова М. В., Маев И. В., Бредер В. В., Гейвандова Н. И., Дощицин В. Л., Дудинская Е. Н., Ершова Е. В., Кодзоева Х. Б., Комшилова К. А., Корочанская Н. В., Майоров А. Ю., Мишина Е. Е., Надинская М. Ю., Никитин И. Г., Погосова Н. В., Тарзиманова А. И., Шамхалова М. Ш. (2022) Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени, Российской гастроэнтерологической ассоциации, Российской ассоциации эндокринологов, Российской ассоциации геронтологов и гериатров и Национального общества профилактической кардиологии по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени, *Росс. Журн. Гастроэнтерол. Гепатол. Колопроктол.*, **32**, 104-140, <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2022-32-4-104-140>.
20. Powell, E. E., Wong, V. W., and Rinella, M. (2021) Non-alcoholic fatty liver disease, *Lancet*, **397**, 2212-2224, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3).
21. Angulo, P., Kleiner, D. E., Dam-Larsen, S., Adams, L. A., Bjornsson, E. S., Charatcharoenwitthaya, P., Mills, P. R., Keach, J. C., Lafferty, H. D., Stahler, A., Haflidadottir, S., and Bendtsen, F. (2015) Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, **149**, 389-397.e10, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.043>.
22. Ratiu, V., Charlotte, F., Heurtier, A., Gombert, S., Giral, P., Bruckert, E., Grimaldi, A., Capron, F., and Poynard, T., and LIDO Study Group. (2005) Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, **128**, 1898-1906, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.084>.
23. Portincasa, P. (2023) NAFLD, MAFLD, and beyond: one or several acronyms for better comprehension and patient care, *Intern. Emerg. Med.*, **18**, 993-1006, <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03203-0>.
24. Iqbal, U., Perumpail, B. J., Akhtar, D., Kim, D., and Ahmed, A. (2019) The epidemiology, risk profiling and diagnostic challenges of nonalcoholic fatty liver disease, *Medicines (Basel)*, **6**, 41, <https://doi.org/10.3390/medicines6010041>.

25. García-Compeán, D., and Jiménez-Rodríguez, A. R. (2022) NAFLD VS MAFLD. The evidence-based debate has come. Time to change? *Ann. Hepatol.*, **27**, 100765, <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2022.100765>.
26. Kaya, E., and Yilmaz, Y. (2022) Metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD): a multi-systemic disease beyond the liver, *J. Clin. Transl. Hepatol.*, **10**, 329-338, <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00178>.
27. Parola, M., and Pinzani, M. (2019) Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues, *Mol. Aspects Med.*, **65**, 37-55, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>.
28. Böttcher, K., and Pinzani, M. (2017) Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **121**, 3-8, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.016>.
29. Geervliet, E., and Bansal, R. (2020) Matrix metalloproteinases as potential biomarkers and therapeutic targets in liver diseases, *Cells*, **9**, 1212, <https://doi.org/10.3390/cells9051212>.
30. Kisseeleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., Evans, S. M., Dillmann, W., Glass, C. K., and Brenner, D. A. (2012) Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9448-9453, <https://doi.org/10.1073/pnas.1201840109>.
31. Roehlen, N., Crouchet, E., and Baumert, T. F. (2020) Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives, *Cells*, **9**, 875, <https://doi.org/10.3390/cells9040875>.
32. Zhao, Y. Q., Deng, X. W., Xu, G. Q., Lin, J., Lu, H. Z., and Chen, J. (2023) Mechanical homeostasis imbalance in hepatic stellate cells activation and hepatic fibrosis, *Front. Mol. Biosci.*, **10**, 1183808, <https://doi.org/10.3389/fmemb.2023.1183808>.
33. Ortiz, C., Schierwagen, R., Schaefer, L., Klein, S., Trepat, X., and Trebicka, J. (2021) Extracellular matrix remodeling in chronic liver disease, *Curr. Tissue Microenviron. Rep.*, **2**, 41-52, <https://doi.org/10.1007/s43152-021-00030-3>.
34. Giannandrea, M., and Parks, W. C. (2014) Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis, *Dis. Model Mech.*, **7**, 193-203, <https://doi.org/10.1242/dmm.012062>.
35. Iredale, J. P., Thompson, A., and Henderson, N. C. (2013) Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: biochemistry and regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 876-883, <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2012.11.002>.
36. Roeb, E. (2018) Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects), *Matrix Biol.*, **68-69**, 463-473, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.012>.
37. Alshanwani, A. R., Hagar, H., Shaheen, S., Alhusaini, A. M., Arafah, M. M., Faddah, L. M., Alharbi, F. M., Sharma A. K., Fayed, A., and Badr, A. M. (2022) A promising antifibrotic drug, pyridoxamine attenuates thioacetamide-induced liver fibrosis by combating oxidative stress, advanced glycation end products, and balancing matrix metalloproteinases, *Eur. J. Pharmacol.*, **923**, 174910, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174910>.
38. Shan, L., Wang, F., Zhai, D., Meng, X., Liu, J., and Lv, X. (2023) Matrix metalloproteinases induce extracellular matrix degradation through various pathways to alleviate hepatic fibrosis, *Biomed. Pharmacother.*, **161**, 114472, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114472>.
39. Radbill, B. D., Gupta, R., Ramirez, M. C. M., DiFeo, A., Martignetti, J. A., Alvarez, C. E., Friedman, S. L., Narla, G., Vrabie, R., Bowles, R., Saiman, Y., and Bansal, M. B. (2011) Loss of matrix metalloproteinase-2 amplifies murine toxin-induced liver fibrosis by upregulating collagen I expression, *Dig. Dis. Sci.*, **56**, 406-416, <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1296-0>.
40. Onozuka, I., Kakinuma, S., Kamiya, A., Miyoshi, M., Sakamoto, N., Kiyohashi, K., Watanabe, T., Funaoka, Y., Ueyama, M., Nakagawa, M., Koshikawa, N., Seiki, M., Nakauchi, H., and Watanabe, M. (2011) Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **406**, 134-140, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.012>.
41. Zhou, X., Murphy, F. R., Gehdu, N., Zhang, J., Iredale, J. P., and Benyon, R. C. (2004) Engagement of  $\alpha_v\beta_3$  integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells, *J. Biol. Chem.*, **279**, 23996-24006, <https://doi.org/10.1074/jbc.M311668200>.
42. Melgar-Lesmes, P., Luquero, A., Parra-Robert, M., Mora, A., Ribera, J., Edelman, E. R., and Jiménez, W. (2018) Graphene-dendrimer nanostars for targeted macrophage overexpression of metalloproteinase 9 and hepatic fibrosis precision therapy, *Nano Lett.*, **18**, 5839-5845, <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02498>.
43. Feng, M., Ding, J., Wang, M., Zhang, J., Zhu, X., and Guan, W. (2018) Kupffer-derived matrix metalloproteinase-9 contributes to liver fibrosis resolution, *Int. J. Biol. Sci.*, **14**, 1033-1040, <https://doi.org/10.7150/ijbs.25589>.
44. Wang, Q., Liu, X., Zhang, J., Lu, L., Feng, M., and Wang, J. (2019) Dynamic features of liver fibrogenesis and fibrosis resolution in the absence of matrix metalloproteinase 9, *Mol. Med. Rep.*, **20**, 5239-5248, <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10740>.
45. Kurzepa, J., Małdro, A., Czechowska, G., Kurzepa, J., Celiński, K., Kazmierak, W., and Slomka, M. (2014) Role of MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors in liver fibrosis, chronic pancreatitis and non-specific inflammatory bowel diseases, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, **13**, 570-579, [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(14\)60261-7](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(14)60261-7).

46. Flannery, C. R. (2006) MMPs and ADAMTs: functional studies, *Front. Biosci.*, **11**, 544-569, <https://doi.org/10.2741/1818>.
47. Le, N. T., Xue, M., Castelnoble, L. A., and Jackson, C. J. (2007) The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation, *Front. Biosci.*, **12**, 1475-1487, <https://doi.org/10.2741/2161>.
48. Kato, H., Kuriyama, N., Duarte, S., Clavien, P. A., Busuttil, R. W., and Coito, A. J. (2014) MMP-9 deficiency shelters endothelial PECAM-1 expression and enhances regeneration of steatotic livers after ischemia and reperfusion injury, *J. Hepatol.*, **60**, 1032-1039, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.022>.
49. Hamada, T., Duarte, S., Tsuehihashi, S., Busuttil, R. W., and Coito, A. J. (2009) Inducible nitric oxide synthase deficiency impairs matrix metalloproteinase-9 activity and disrupts leukocyte migration in hepatic ischemia/reperfusion injury, *Am. J. Pathol.*, **174**, 2265-2277, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080872>.
50. Fernandez-Patron, C., Zouki, C., Whittal, R., Chan, J. S., Davidge, S. T., and Filep, J. G. (2001) Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32], *FASEB J.*, **15**, 2230-2240, <https://doi.org/10.1096/fj.01-0178com>.
51. Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., et al. (1994) Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases, *Nature*, **370**, 555-557, <https://doi.org/10.1038/370555a0>.
52. Fernandez-Patron, C., Kassiri, Z., and Leung, D. (2016) Modulation of systemic metabolism by MMP-2: from MMP-2 deficiency in mice to MMP-2 deficiency in patients, *Compr. Physiol.*, **6**, 1935-1949, <https://doi.org/10.1002/cphy.c160010>.
53. McQuibban, G. A., Gong, J. H., Tam, E. M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I., and Overall, C. M. (2000) Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3, *Science*, **289**, 1202-1206, <https://doi.org/10.1126/science.289.5482.1202>.
54. Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I. B., Enghild, J. J., Sasaguri, Y., and Mori, Y. (1996) Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.*, **271**, 14657-14660, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.14657>.
55. Calabro, S. R., Maczurek, A. E., Morgan, A. J., Tu, T., Wen, V. W., Yee, C., Mridha, A., Lee, M., d'Avigdor, W., Locarnini, S. A., McCaughey, G. W., Warner, F. J., McLennan, S. V., and Shackel, N. A. (2014) Hepatocyte produced matrix metalloproteinases are regulated by CD147 in liver fibrogenesis, *PLoS One*, **9**, e90571, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090571>.
56. Xue, M., March, L., Sambrook, P. N., and Jackson, C. J. (2007) Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: relevance to inflammation in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.*, **56**, 2864-2874, <https://doi.org/10.1002/art.22844>.
57. Lichtenhagen, R., Bahr, M. J., Wehmeier, M., Michels, D., Haberkorn, C. I., Arndt, B., Flemming, P., Manns, M. P., and Boeker, K. H. (2003) Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis, *Clin. Sci. (Lond)*, **105**, 373-382, <https://doi.org/10.1042/CS20030098>.
58. Takahara, T., Furui, K., Yata, Y., Jin, B., Zhang, L. P., Nambu, S., Sato, H., Seiki, M., and Watanabe, A. (1997) Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers, *Hepatology*, **26**, 1521-1529, <https://doi.org/10.1002/hep.510260620>.
59. Prystupa, A., Boguszewska-Czubara, A., Bojarska-Junak, A., Toruń-Jurkowska, A., Rolinski, J., and Załuska, W. (2015) Activity of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 in serum as a marker of progression of alcoholic liver disease in people from Lublin Region, eastern Poland, *Ann. Agric. Environ. Med.*, **22**, 325-328, <https://doi.org/10.5604/12321966.1152088>.
60. Cursio, R., Mari, B., Louis, K., Rostagno, P., Saint-Paul, M. C., Giudicelli, J., Bottero, V., Anglard, P., Yiotakis, A., Dive, V., Gugenheim, J., and Auburger, P. (2002) Rat liver injury after normothermic ischemia is prevented by a phosphinic matrix metalloproteinase inhibitor, *FASEB J.*, **16**, 93-95, <https://doi.org/10.1096/fj.01-0279fje>.
61. Giannelli, G., Bergamini, C., Marinosci, F., Fransvea, E., Quaranta, M., Lupo, L., Schiraldi, O., and Antonaci, S. (2002) Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma, *Int. J. Cancer.*, **97**, 425-431, <https://doi.org/10.1002/ijc.1635>.
62. Benyon, R. C., Hovell, C. J., Da Gaça, M., Jones, E. H., Iredale, J. P., and Arthur, M. J. (1999) Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation, *Hepatology*, **30**, 977-986, <https://doi.org/10.1002/hep.510300431>.
63. Kim, W. U., Min, S. Y., Cho, M. L., Hong, K. H., Shin, Y. J., Park, S. H., and Cho, C. S. (2005) Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic sclerosis, *Arthritis Res. Ther.*, **7**, R71-R79, <https://doi.org/10.1186/ar1454>.
64. Zhao, Y., Yakufu, M., Ma, C., Wang, B., Yang, J., and Hu, J. (2024) Transcriptomics reveal a molecular signature in the progression of nonalcoholic steatohepatitis and identifies PAI 1 and MMP 9 as biomarkers in *in vivo* and *in vitro* studies, *Mol. Med. Rep.*, **29**, 15, <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13138>.

65. Sun, M. H., Han, X. C., Jia, M. K., Jiang, W. D., Wang, M., Zhang, H., Han, G., and Jiang, Y. (2005) Expressions of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma, *World J. Gastroenterol.*, **11**, 5931-5937, <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i38.5931>.
66. Murthy, S., Ryan, A., He, C., Mallampalli, R. K., and Carter, A. B. (2010) Rac1-mediated mitochondrial H2O2 generation regulates MMP-9 gene expression in macrophages via inhibition of SP-1 and AP-1, *J. Biol. Chem.*, **285**, 25062-25073, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.099655>.
67. Olle, E. W., Ren, X., McClintock, S. D., Warner, R. L., Deogracias, M. P., Johnson, K. J., and Colletti, L. M. (2006) Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice, *Hepatology*, **44**, 540-549, <https://doi.org/10.1002/hep.21314>.
68. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis, *Genes Dev.*, **14**, 163-176.
69. Kaviratne, M., Hesse, M., Leusink, M., Cheever, A. W., Davies, S. J., McKerrow, J. H., Wakefield, L. M., Letterio, J. J., and Wynn, T. A. (2004) IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent, *J. Immunol.*, **173**, 4020-4029, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.4020>.
70. Schönbeck, U., Mach, F., and Libby, P. (1998) Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing, *J. Immunol.*, **161**, 3340-3346.
71. Trojanek, J. B., Michałkiewicz, J., Grzywa-Czuba, R., Jańczyk, W., Gackowska, L., Kubiszewska, I., Helmin-Basa, A., Wierzbicka-Rucińska, A., Szalecki, M., and Socha, P. (2020) Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in peripheral blood leukocytes and plasma of children with nonalcoholic fatty liver disease, *Mediators Inflamm.*, **2020**, 8327945, <https://doi.org/10.1155/2020/8327945>.
72. Kupčová, V., Fedelešová, M., Bulas, J., Kozmonová, P., and Turecký, L. (2019) Overview of the pathogenesis, genetic, and non-invasive clinical, biochemical, and scoring methods in the assessment of NAFLD, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **16**, 3570, <https://doi.org/10.3390/ijerph16193570>.
73. Ливзан М. А., Ахмедов В. А., Кролевец Т. С., Гаус О. В., Черкащенко Н. А. (2016) Информативность неинвазивных маркеров фиброза печени у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени, *Тер. Архив*, **88**, 62-68, <https://doi.org/10.17116/terarkh2016881262-68>.
74. Kumar, S., Duan, Q., Wu, R., Harris, E. N., and Su, Q. (2021) Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **176**, 113869, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113869>.
75. Afonso, M. B., Castro, R. E., and Rodrigues, C. M. P. (2019) Processes exacerbating apoptosis in non-alcoholic steatohepatitis, *Clin. Sci. (Lond)*, **133**, 2245-2264, <https://doi.org/10.1042/CS20190068>.
76. Peiseler, M., Schwabe, R., Hampe, J., Kubes, P., Heikenwälder, M., and Tacke, F. (2022) Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease – novel insights into cellular communication circuits, *J. Hepatol.*, **77**, 1136-1160, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.06.012>.
77. Курбатова И. В., Дуданова О. П. (2017) Особенности некротически-воспалительного процесса при разных формах неалкогольной жировой болезни печени, *Тер. Архив*, **89**, 52-58, <https://doi.org/10.17116/terarkh201789252-58>.
78. Курбатова И. В., Топчиева Л. В., Дуданова О. П., Шиповская А. А. (2022) Роль растворимого рецептора интерлейкина-6 в прогрессировании НАЖБП, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **174**, 585-591, <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-174-11-585-591>.
79. Li, Y. Q., Yan, J. P., Xu, W. L., Wang, H., Xia, Y. J., Wang, H. J., Zhu, Y. Y., and Huang, X. J. (2013) ADAM17 mediates MMP9 expression in lung epithelial cells, *PLoS One*, **8**, e51701, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051701>.
80. Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2019) Regulation of fibrotic processes in the liver by ADAM proteases, *Cells*, **8**, 1226, <https://doi.org/10.3390/cells8101226>.
81. Wree, A., McGeough, M. D., Peña, C. A., Schlattjan, M., Li, H., Inzaugarat, M. E., Messer, K., Canbay, A., Hoffman, H. M., and Feldstein, A. E. (2014) NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD, *J. Mol. Med. (Berl)*, **92**, 1069-1082, <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1170-1>.
82. Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A., and Bacon, B. R. (1999) Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions, *Am. J. Gastroenterol.*, **94**, 2467-2474, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x>.
83. Friedewald, W. T., Levy, R. I., and Fredrickson, D. S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin. Chem.*, **18**, 499-502.
84. Sterling, R. K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R., Correa, M. C., Montaner, J., S. Sulkowski, M., Torriani, F. J., Dieterich, D. T., Thomas, D. L., Messinger, D., and Nelson, M., and APRICOT Clinical Investigators (2006) Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection, *Hepatology*, **43**, 1317-1325, <https://doi.org/10.1002/hep.21178>.

85. Shah, A. G., Lydecker, A., Murray, K., Tetri, B. N., Contos, M. J., and Sanyal, A. J., and Nash Clinical Research Network (2009) Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **7**, 1104-1112, <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.05.033>.
86. Wai, C. T., Greenson, J. K., Fontana, R. J., Kalbfleisch, J. D., Marrero, J. A., Conjeevaram, H. S., and Lok, A. S. (2003) A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C, *Hepatology*, **38**, 518-526, <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50346>.
87. Loaeza-del-Castillo, A., Paz-Pineda, F., Oviedo-Cárdenas, E., Sánchez-Avila, F., and Vargas-Vorácková, F. (2008) AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis, *Ann. Hepatol.*, **7**, 350-357.
88. Драпкина О. М., Шепель Р. Н., Яковенко Э. П., Зятенкова Е. В. (2019) Неинвазивные методы выявления прогрессирующего фиброза у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени, *Профилакт. Мед.*, **22**, 82-88, <https://doi.org/10.17116/profmed20192202182>.
89. ACK Lysis Buffer (2014) *Cold Spring Harb. Protoc.*, <https://doi.org/10.1101/pdb.rec083295>.
90. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, *Methods*, **25**, 402-408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
91. Youden, W. J. (1950) Index for rating diagnostic tests, *Cancer*, **3**, 32-35, [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32::aid-cncr2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cncr2820030106>3.0.co;2-3).
92. Zweig, M. H., and Campbell, G. (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine, *Clin. Chem.*, **39**, 561-577.
93. Ren, J. J., Huang, T. J., Zhang, Q. Q., Zhang, H. Y., Guo, X. H., Fan, H. Q., Li, R. K., and Liu, L. X. (2019) Insulin-like growth factor binding protein related protein 1 knockdown attenuates hepatic fibrosis via the regulation of MMPs/TIMPs in mice, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, **18**, 38-47, <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2018.08.008>.
94. Tarantino, G., Savastano, S., and Colao, A. (2010) Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance, *World J. Gastroenterol.*, **16**, 4773-4783, <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i38.4773>.
95. Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., and Hu, H. (2020) Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study, *Signal Transduct. Target Ther.*, **5**, <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>.
96. Kawai, T., Autieri, M. V., and Scalia, R. (2021) Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **320**, 375-391, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>.
97. Li, H., Meng, Y., He, S., Tan, X., Zhang, Y., Zhang, X., Wang, L., and Zheng, W. (2022) Macrophages, chronic inflammation, and insulin resistance, *Cells*, **11**, <https://doi.org/10.3390/cells11193001>.
98. De Carvalho Ribeiro, M., and Szabo, G. (2022) Role of the inflammasome in liver disease, *Annu. Rev. Pathol.*, **17**, 345-365, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-032521-102529>.
99. Csak, T., Ganz, M., Pespisa, J., Kodys, K., Dolganiuc, A., and Szabo, G. (2011) Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells, *Hepatology*, **54**, 133-144, <https://doi.org/10.1002/hep.24341>.
100. Yilmaz, Y., and Eren F. (2019) Serum biomarkers of fibrosis and extracellular matrix remodeling in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **31**, 43-46, <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001240>.
101. Wagner, J., Kumar, Y., Lautenbach, A., von Kroge, P., Wolter, S., Mann, O., Izbicki, J., Gagliani, N., and Dupré, A. (2023) Fatty acid-binding protein-4 (FABP4) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) as predictive values for nonalcoholic steatohepatitis (NASH), *Lipids Health Dis.*, **22**, 1, <https://doi.org/10.1186/s12944-022-01764-1>.
102. Goyale, A., Jain, A., Smith, C., Papatheodoridi, M., Misas, M. G., Roccarina, D., Prat, L. I., Mikhailidis, D. P., Nair, D., and Tsochatzis, E. (2021) Assessment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) severity with novel serum-based markers: A pilot study, *PLoS One*, **16**, e0260313, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260313>.
103. Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., and Rose-John, S. (2011) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration, *Trends Immunol.*, **32**, 380-387, <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.05.005>.
104. An, Y., Zhao, J., Zhang, Y., Wu, W., Hu, J., Hao, H., Qiao, Y., Tao, Y., and An, L. (2021) Rosmarinic acid induces proliferation suppression of hepatoma cells associated with NF-κB signaling pathway, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **22**, 1623-1632, <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.5.1623>.
105. Munsterman, I. D., Kendall, T. J., Khelil, N., Popa, M., Lomme, R., Drenth, J. P. H., and Tjwa, E. T. T. L. (2018) Extracellular matrix components indicate remodelling activity in different fibrosis stages of human non-alcoholic fatty liver disease, *Histopathology*, **73**, 612-621, <https://doi.org/10.1111/his.13665>.
106. Barchuk, M., Schreier, L., Berg, G., and Miksztowicz, V. (2018) Metalloproteinases in non-alcoholic fatty liver disease and their behavior in liver fibrosis, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.*, **41**, <https://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0037>.

**THE ROLE OF MMP-2 AND MMP-9 IN THE RELATIONSHIP  
OF INFLAMMATION, FIBROSIS AND APOPTOSIS  
DURING THE PROGRESSION OF NON-ALCOHOLIC  
FATTY LIVER DISEASE AND THE DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE  
OF THE PLASMA LEVEL OF THEIR ACTIVE FORMS**

I. V. Kurbatova<sup>1\*</sup>, L. V. Topchieva<sup>1</sup>, O. P. Dudanova<sup>2</sup>, and A. A. Shipovskaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia; e-mail: irina7m@yandex.ru

<sup>2</sup> Medical Institute named after Professor A.P. Zilber, Petrozavodsk State University,  
185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia

MMP-2 and MMP-9 play an important role in the pathogenesis of chronic liver diseases, participating in the processes of inflammation and fibrosis. Their role in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is poorly understood. The analysis of MMP-2, -9 levels in the blood plasma of patients with different forms of NAFLD (liver steatosis (LS) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) of weak (-WA), moderate (MA), high (-HA) activity without pronounced fibrosis) was performed. Correlations between the levels of MMP-2, -9 and mRNA of the genes *MMP2*, *MMP9*, *ADAM17*, *NLRP3*, caspase 3 activity in peripheral blood leukocytes (PBL), TNF $\alpha$ , IL-6, sIL-6R, cytokeratin-18 fragments in plasma were assessed. In steatosis, the levels of *MMP2* gene mRNA in PBL and MMP-2 in plasma are lower than in the control, and the expression of the *NLRP3* gene in PBL is increased relative to other groups. In NASH-WA, the level of MMP-9 is higher than in the control, LS, and NASH-MA, which can be associated with the activation of inflammation during the transformation of LS into NASH. The plasma level of MMP-9 over 389.50 pg/ml is diagnostically significant for the detection of NASH-WA among steatosis patients (*AUC ROC* = 0.818, 95% CI = 0.689–0.948,  $p < 0.001$ ). In NAFLD, the level of MMP-9 can be associated not only with inflammation, but also with apoptosis. *ADAM17* probably plays a certain role in this regard. In advanced NASH, hepatocyte apoptosis is increased, the level of caspase 3 activity in PBL is increased, the level of MMP-9 in the blood is reduced to the level of the control and LS. In NASH-HA, the level of mRNA of the *ADAM17* gene in PBL is increased compared to the control, NASH-WA and NASH-MA. Thus, MMP-2 and MMP-9 are involved in the pathogenesis of NAFLD already at early stages and their level in the blood can be associated with the presence and activity of inflammation in the liver parenchyma.

**Keywords:** matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, non-alcoholic fatty liver disease, liver steatosis, non-alcoholic steatohepatitis, inflammation, fibrosis, apoptosis, *NLRP3*, *ADAM17*

## (СТРЕПТ)АВИДИН ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ГЛИКОКОНЬЮГАТАМИ

© 2024 Н.В. Шилова<sup>1,2\*</sup>, С.М. Полякова<sup>1</sup>, А.Ю. Нокель<sup>1,2</sup>, А.Д. Липатников<sup>1</sup>,  
Е.А. Гордеева<sup>1</sup>, М.В. Лаврентьева<sup>3</sup>, Н.В. Бовин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия; e-mail: rimatnv@gmail.com

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, 117997 Москва, Россия

<sup>3</sup> МИРЭА – Российский технологический университет, кафедра биотехнологии, 119571 Москва, Россия

Поступила в редакцию 08.04.2024

После доработки 11.10.2024

Принята к публикации 15.10.2024

Флуоресцентно меченный и конъюгированный (стрепт)авидин широко используется для визуализации биотинилированных молекул в иммунологических анализах и гистохимии. В представленной работе показано, что кроме биотина, эти белки связывают ряд гликанов, в том числе фрагменты гликопротеиновых и гликолипидных цепей млекопитающих, в частности, антигены системы крови АВО, олиголактозамины, 6-О-сульфатированные олигосахариды. Это взаимодействие дозозависимо ингибируется гликанами в полимерной (но не в мономерной) конъюгированной форме на уровне микромолярной концентрации, т.е. требует поливалентности. С учётом кластерной организации гликанов клетки (гликопротеинов и гликолипидов), при исследовании объектов, содержащих углеводы, это свойство является потенциальным источником ошибки, которую можно предотвратить, избегая большого избытка (стрепт)авидина в аналитической системе.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** стрептавидин, авидин, гликоконъюгаты, гликаны, гликановый эррей, микрочип.

DOI: 10.31857/S0320972524110143 EDN: IKGDSV

### ВВЕДЕНИЕ

(Стрепт)авидин широко используется в огромном количестве тест-систем благодаря уникальному высокой ( $10^{-14}$  М) константе связывания с биотином [1]. Однако биотин является не единственным его лигандом; ранее было описано низкоаффинное взаимодействие с нуклеозидами [2] и пептидами [3], а моносахарид манноза ингибировал на миллимолярном уровне взаимодействие как стрептавидина, так и авидина с биотинилированным кальтерикулином при изучении гликан-связывающих свойств последнего с помощью планшетного твердофазного метода анализа и блот-анализа [4]; аналогичная активность была продемонстрирована для сахарозы [5], мальтозы [6] и глюкозы [7]. Несмотря на наличие

литературных данных, подавляющее большинство специалистов в области биоаналитической химии не учитывает риск побочного взаимодействия (стрепт)авидина с гликанами. Лишь обнаружив такое неожиданное взаимодействие, авторы настоящей работы провели литературный поиск и нашли цитированные выше статьи. Последующее целенаправленное исследование, проведённое с помощью таких вариантов твердофазного анализа, как представительный гликановый эррей (в формате микрочипа) и планшетный анализ, показало, что (стрепт)авидин взаимодействует со многими гликанами, в том числе характерными для тканей и клеток млекопитающих.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соли и другие неорганические реагенты были производства компании «Sigma-Aldrich» (Сент-Луис, Миссури, США).

Принятые сокращения: ПХ – пероксидаза хрена; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

\* Адресат для корреспонденции.

**Гликановый эррей.** Гликановый эррей, содержащий 174 аминоспецифированных гликана и соответствующие им полиакриламидные гликоконьюгаты, Glyc-PAA, где Glyc – остаток гликана, а PAA – полиакриламид молекулярной массы ~20 кДа («GlycoNZ», Окланд, Новая Зеландия), печатали в формате микрочипа (далее термины «гликановый эррей», «микрочип» и «чип» будут использованы как эквивалентные) методом роботизированного нанесения бесконтактным принтером sciFLEXARRAYER S5 («Scienion», Берлин, Германия) 0,9 нл растворов гликанов или PAA-коньюгатов в буфере для печати (300 мМ фосфатный буфер, pH 8,5, содержащий 0,001%-ный Tween-20) на стёкла размером 25 × 75 мм, активированные N-гидроксисукцинилмидом (Slide H, «Schott Nexterion», Йена, Германия). Концентрация гликанов в буфере для печати составляла 50 мКМ. Все лигандаe были напечатаны в шести повторах. Размер наносимых пятен ~80 мкм. После печати чипы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и 75%-ной влажности. Затем, согласно протоколу производителя активированных слайдов, оставшиеся N-гидроксисукцинилмидные группы блокировали погружением чипов в блокировочный буфер (25 мМ этаноламин в 100 мМ боратном буфере, содержащий 0,2%-ный Tween-20, pH 8,5) на 1,5 ч. Контроль иммобилизации лигандов осуществляли с помощью поликлональных антител сыворотки крови человека, а также с использованием наборов растительных лектинов и моноклональных антител (как описано, например, в работе Obukhova et al. [8]).

**Взаимодействие стрептавидина с гликанами чипа.** 1 мл раствора стрептавидина, меченого красителем Alexa 555 («Invitrogen», Карлсбад, Калифорния, США), в концентрации 1 мКг/мл (18 нМ) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, «Эко-Сервис», Санкт-Петербург, Россия), содержащем 0,1%-ный (v/v) Tween-20 («Sigma-Aldrich») (ФСБ-0,1%), наносили на чип (предварительно смоченный в ФСБ-0,1% в течение 10 мин при комнатной температуре) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и 75%-ной влажности. Затем чип дважды промывали ФСБ, содержащим 0,05%-ный Tween-20, и, на заключительном этапе, бидистиллированной водой, после чего высушивали центрифугированием и сканировали (разрешение 10 мкм) с помощью флуоресцентного сканера InnoScan 1100 AL («Innopsys», Карбон, Франция). Изображения преобразовывали в таблицу Excel с помощью программного обеспечения ScanArray Express 4.0 с использованием метода фиксированных колец («PerkinElmer», Шелтон, Коннектикут, США) и GAL-файла. Результаты представляли в виде медианы относительных единиц флуоресценции (ОЕФ). Сигналы величины, в 10 раз превышающей

ОЕФ фона (сигналы от пятен, не содержащих гликанов), считали значимыми.

**Взаимодействие рицинового агглютинина (RCA 120) с гликанами чипа.** 1 мл раствора биотинилированного RCA 120 («Vector Laboratories», Ньюарк, Калифорния, США) в концентрации 10 мКг/мл в ФСБ-0,1% наносили на микрочип и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и 75%-ной влажности с последующей промывкой ФСБ-0,05%. Затем наносили 1 мл раствора стрептавидина, меченого Alexa 555 («Invitrogen»), в концентрации 1 мКг/мл (18 нМ) или 0,1 мКг/мл (1,8 нМ) в ФСБ-0,1% и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и 75%-ной влажности. Затем были выполнены последующие этапы, как описано в разделе «Взаимодействие стрептавидина с гликанами чипа».

**96-Луночный твердофазный анализ. Взаимодействие стрептавидина и авидина с гликоконьюгатами. Прямое связывание.** В лунки планшетов (NUNC Maxisorp, «Thermo Fisher Scientific», Уолтем, Массачусетс, США) вносили по 100 мкл растворов коньюгатов Glyc-PAA («GlycoNZ») в двух повторах, в двукратном разведении, начиная с 20 мКг/мл, в 0,05 М Na-карбонатном буфере, pH 9,6, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, после чего вносили 120 мкл 1%-ного бычьего сывороточного альбумина, БСА («Sigma-Aldrich»), в ФСБ и выдерживали в течение 1 ч при 37 °C. Затем лунки трижды промывали ФСБ-0,05%, после чего прибавляли 100 мкл раствора стрептавидина, меченого пероксидазой хрена (ПХ), стрептавидина-ПХ («Southern Biotech», Бирмингем, Алабама, США), или авидина-ПХ («BioLegend», Сан-Диего, Калифорния, США) в концентрации 0,1 мКг/мл (1,8 нМ) в ФСБ, содержащем 0,3% БСА (ФСБ-0,3% БСА), и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. После промывки, как описано выше, проводили оценку ферментативной активности пероксидазы путём 30-минутной инкубации с буфером, состоящим из 0,1 М фосфата натрия/0,1 М лимонной кислоты, содержащим 0,04%-ный о-фенилендиамин и 0,03%-ную H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 мкл/лунка), что сопровождалось изменением цветности субстратного раствора. Реакцию останавливали добавлением в лунки планшета 50 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность (ОП) регистрировали при длине волн 492 нм с помощью многофункционального планшетного анализатора Wallac Victor2 1420 («PerkinElmer», Шелтон, Коннектикут, США). Все эксперименты проводили дважды, разброс между значениями не превышал 10%.

**Ингибирование взаимодействия стрептавидина с гликоконьюгатами.** В лунки планшетов вносили по 100 мкл раствора коньюгата GlcNAc-PAA в концентрации 10 мКг/мл в 0,05 М Na-карбонатном буфере, pH 9,6, после чего лунки блокировали и промывали, как указано в разделе

«Взаимодействие стрептавидина и авидина с гликоконъюгатами. Прямое связывание». Последовательные двукратные разведения ингибиторов – гликанов в спейсерированной или в PAA-форме (50 мкл/лунка, начальная концентрация 0,5 мМ по Glyc в ФСБ-0,3% БСА) – добавляли одновременно со стрептавидином-ПХ (0,2 мкг/мл, 50 мкл/лунка) в ФСБ-0,3% БСА, и планшет инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, трижды промывали промывочным буфером, затем проводили измерение ферментативной активности пероксидазы, как указано в разделе «Взаимодействие стрептавидина и авидина с гликоконъюгатами. Прямое связывание».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

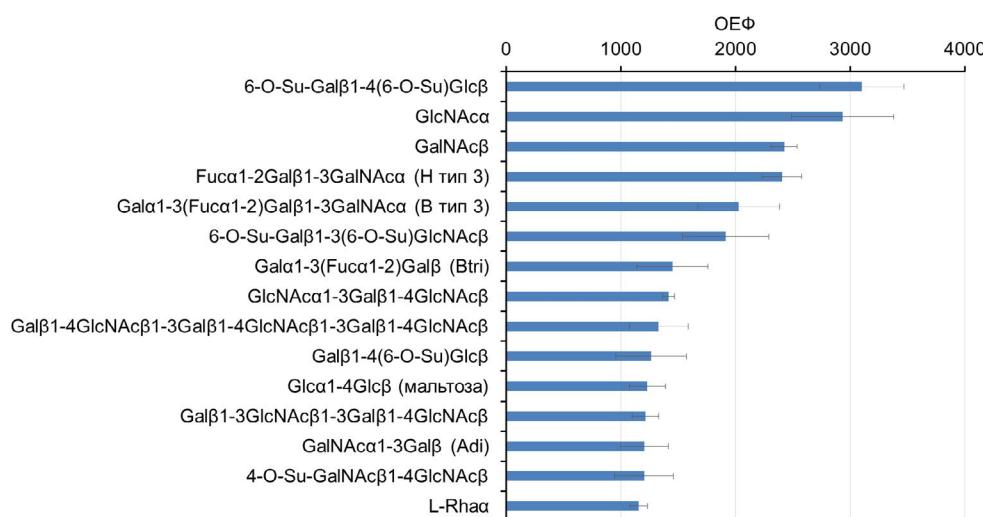
С помощью микрочипа обнаружено, что флуоресцентно меченный стрептавидин взаимодействует с несколькими десятками моно- и олигосахаридов, иммобилизованных на чипе (около 50 из 174). На рис. 1 показаны 15 наиболее активных (топовых) гликанов, включая мальтозу, связывание которой со стрептавидином наблюдалось ранее [6], более подробно эти данные приведены в Приложении 1. Интенсивность сигналов была сравнима с интенсивностью «канонических» углеводсвязывающих белков – лектинов (что показано, например, в работах Ahmad et al. и Shilova et al. [9, 10]).

Среди связывающих гликанов отметим антигены группы крови АВО – олигосахарида В и Н, олиголактозамины, а также 6-O-сульфатированные олигосахариды, то есть те, которые типичны для гликопротеинов и гликолипидов человека.

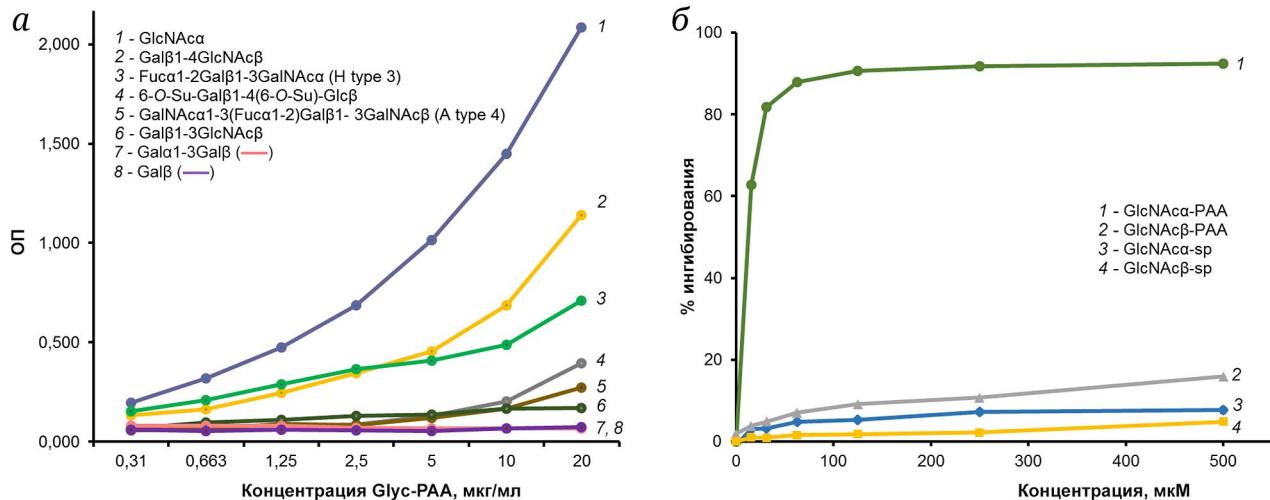
С помощью 96-луночного твердофазного анализа, который включал семь гликанов, проявивших активность в составе чипа, была показана концентрационная зависимость взаимодействия (рис. 2, а).

Взаимодействие с гликанами было воспроизведимым при использовании стрептавидина разных производителей («Invitrogen», «SouthernBiotech» и «Sigma-Aldrich») с разными метками (ПХ и Alexa 555). Подобно стрептавидину, авидин взаимодействовал с GlcNAca, трисахаридом Н типа 3 и сульфатированными гликанами (данные не показаны).

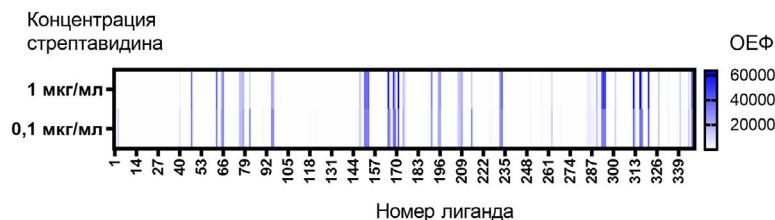
Согласно проведённому ингибиторному анализу, взаимодействие стрептавидина с углеводами дозозависимо ингибируется конъюгатами Glyc-PAA в диапазоне концентраций (по гликану) от 15 до 500 мКМ, как показано на примере GlcNAca-PAA – гликоконъюгата, проявившего максимальную активность как на микрочипе, так и в планшетном твердофазном анализе. Отметим, что GlcNAc $\beta$ -PAA такого действия не оказывал (рис. 2, б). Мономерные (неконъюгированные) гликаны не оказывали ингибирующего действия в этом диапазоне концентраций, т.е. взаимодействие требует поливалентности, которая, по-видимому, реализуется всеми свободными (т.е. не занятymi меткой или ПХ) субъединицами стрептавидина, с одной стороны, и множеством копий остатка Glyc, присоединённого к полимерной цепи, – с другой. Сайт связывания белка с гликаном не совпадает с сайтом связывания биотина, в противном случае биотин вытеснил бы значительно менее аффинный гликан в используемой тест-системе, чего не происходило.



**Рис. 1.** Гликаны, показавшие наилучшее взаимодействие со стрептавидином, меченным Alexa 555 (в концентрации 1 мкг/мл). Гликановый эррея состоял из 174 гликанов, иммобилизованных в виде поликарбамидных конъюгатов, Glyc-PAA [11]. Максимально возможное значение флуоресценции (OEФ) в этой аналитической системе составляет около 65 000; сигналы от пятен, не содержащих лигандов, то есть фон, не превышают 100 OEФ. Все моносахариды, за исключением рамнозы, являются D-пиранозами. Тривиальные названия олигосахаридов приведены в круглых скобках. См. подробнее в Приложении 1



**Рис. 2.** Взаимодействие стрептавидина, меченного ПХ (в концентрации 0,1 мкг/мл), с конъюгатами Glyc-PAA: а – концентрационная зависимость взаимодействия с гликоконъюгатами, иммобилизованными в лунках 96-луночного планшета; б – дозозависимое ингибирование взаимодействия меченого стрептавидина с иммобилизованным GlcNAcα-PAA и GlcNAcβ-PAA, а также неконъюгированными GlcNAcα-sp и GlcNAcβ-sp (sp – спейсер). ОП – оптическая плотность



**Рис. 3.** Снижение концентрации стрептавидина при визуализации связывания RCA120 с его лигандами не повлияло ни на общую интенсивность сигнала, ни на профиль взаимодействия. Коэффициент корреляции Пирсона равен 0,92. См. подробнее в Приложении 2

Следует отметить, что диапазон микромолярных концентраций типичен для углеводных ингибиторов антигликановых антител и лектинов и соответствует микромолярному диапазону констант аффинности [9, 10, 12], которые достаточно высоки, чтобы от нежелательного связывания стрептавидина с углеводом можно было бы освободиться с помощью интенсификации стадии промывки комплекса при проведении анализа.

Высокая аффинность биотина по отношению к стрептавидину создаёт предпосылку уменьшения концентрации стрептавидиновых реагентов в аналитических системах, чтобы тем самым без потери аналитического сигнала понизить нежелательное связывание с гликанами. Чтобы проверить такую возможность, биотинилированный лектин RCA120 был проявлен с помощью флуоресцентно меченного стрептавидина в двух концентрациях – 1 мкг/мл (используется обычно) и 0,1 мкг/мл. На рис. 3 показано, что десятикратное снижение концентрации в целом не влияло ни на интенсивность наблюдаемого сигнала, ни на профиль взаимодействия RCA120 с гликанами.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Система (стрепт)авидин-биотин имеет многолетнюю историю использования в качестве инструмента для детекции в различных аналитических системах. Наряду с многочисленными публикациями о её успешном использовании существуют работы, свидетельствующие о получении ложноположительных результатов при выявлении антигенов человека и животных [13–15]. Среди прочих причин в цитируемых работах обнаруженные факты объясняли присутствием биотиноподобных молекул в тканях и/или влиянием эндогенных гликанов [15]. Авторы [16] отмечали, что использование стрептавидина в сэндвич-формате твердофазного анализа следует проводить с осторожностью из-за возможного влияния углеводов, содержащихся в образцах. При изучении супрамолекулярных конструктов на основе авидина были выдвинуты аналогичные объяснения [6].

Наши исследования показали, что стрептавидин и авидин способны связываться с широким кругом гликанов, в том числе типичных для клеток млекопитающих. Несмотря на то, что

выявленные углеводные лиганды относятся к структурно разным классам, эти взаимодействия не являются неспецифическими, а скорее полиреактивными, что характерно для ряда лектинов. Очевидно, что в действительности круг (стрепт)-авидин-позитивных гликанов ещё шире, поэтому необходимо проявлять осторожность при оценке результатов экспериментов, проводимых с использованием этих белков в биоаналитических тест-системах. Отметим также, что взаимодействие (стрепт)авидина с гликанами в конкретной тест-системе будет зависеть от степени гликозилирования изучаемого объекта, присутствия детергентов и блокирующих агентов и множества других факторов.

Общим решением этой проблемы является уменьшение количества конъюгированного (стрепт)авидина, который обычно берут в неоправданном избытке (как показано в данном исследовании), или применением конъюгата с полипероксидазой, в котором содержание стрептавидина снижено. Следует также отметить, что использование пары (стрепт)авидин-биотин не ограничивается фундаментальными исследованиями и диагностикой *in vitro*, (стрепт)авидиновая система апробируется для доставки лекарств [17, 18],

где обнаруженная полиреактивность этих белков становится потенциальным источником побочных эффектов.

**Благодарности.** Эта работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-63-47110.

**Вклад авторов.** Надежда В. Шилова и Николай В. Бовин – концептуализация, планирование экспериментов, написание рукописи, рецензирование и редактирование; Алексей Ю. Нокель – печать эрреев, анализ данных; Светлана М. Полякова, Александр Д. Липатников, Елена А. Гордеева и Марина В. Лаврентьевна – проведение экспериментов с гликановыми эрреями и твердофазным анализом, анализ данных и подготовка рисунков.

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

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Green, M. N. (1990) Avidin and streptavidin, *Methods Enzymol.*, **184**, 51-67, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)84259-J](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)84259-J).
2. Bing, T., Chang, T., Qi, C., Zhang, N., Liu, X., and Shangguan, D. (2012) Specific interactions between adenosine and streptavidin/avidin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 7052-7055, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.088>.
3. Caparon, M. H., De Ciechi, P. A., Devine, C. S., Olins, P. O., and Lee, S. C. (1996) Analysis of novel streptavidin-binding peptides, identified using a phage display library, shows that amino acids external to a perfectly conserved consensus sequence and to the presented peptides contribute to binding, *Mol. Divers.*, **1**, 241-246, <https://doi.org/10.1007/BF01715528>.
4. Houen, G., and Hansen, K. (1997) Interference of sugars with the binding of biotin to streptavidin and avidin, *J. Immunol. Methods*, **210**, 115-123, [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00166-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00166-X).
5. Smith, J. A., Xu, G., Feng, R., Janetka, J. W., and Moeller, K. D. (2016) C-glycosides, array-based addressable libraries, and the versatility of constant current electrochemistry, *Electroanalysis*, **28**, 2808-2817, <https://doi.org/10.1002/elan.201600200>.
6. Ennen, F., Boye, S., Lederer, A., Cernescu, M., Komber, H., Brutschy, B., Voit, B., and Appelhans, D. (2014) Biohybrid structures consisting of biotinylated glycopolymers and proteins: influence of the biotin ligand's number and chemical nature on the biotin-avidin conjugation, *Polym. Chem.*, **5**, 1323-1339, <https://doi.org/10.1039/C3PY01152F>.
7. Beber, A., Alqabandi, M., Prévost, C., Viars, F., Lévy, D., Bassereau, P., Bertin, A., and Mangenot, S. (2019) Septin-based readout of PI(4,5)P<sub>2</sub> incorporation into membranes of giant unilamellar vesicles, *Cytoskeleton*, **76**, 92-103, <https://doi.org/10.1002/cm.21480>.
8. Obukhova, P., Tsygankova, S., Chinarev, A., Shilova, N., Nokel, A., Kosma, P., and Bovin, N. (2020) Are there specific antibodies against Neu5Gc epitopes in the blood of healthy individuals? *Glycobiology*, **30**, 395-406, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz107>.
9. Ahmad, N., Gabius, H.-J., Kaltner, H., André, S., Kuwabara, I., Liu, F.-T., Oscarson, S., Norberg, T., and Brewer, C. F. (2002) Thermodynamic binding studies of cell surface carbohydrate epitopes to galectins-1, -3, and -7: evidence for differential binding specificities, *Canad. J. Chem.*, **80**, 1096-1104, <https://doi.org/10.1139/v02-162>.
10. Shilova, N., Bovin, N., Maltseva, D., Polyakova, S., Sablina, M., Niwa, H., Zakharova, G., Raygorodetskaya, M., Bufeeva, L., Belyi, Y., Hushpulian, D., and Tonevitsky, A. (2022) Specificity of viscumin revised. As probed with a printed glycan array, *Biochimie*, **202**, 94-102, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.08.009>.

11. Tuzikov, A., Chinarev, A., Shilova, N., Gordeeva, E., Galanina, O., Ovchinnikova, T., Schaefer, M., and Bovin, N. (2021) 40 years of glyco-polyacrylamide in glycobiology, *Glycoconj. J.*, **38**, 89-100, <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09965-5>.
12. Obukhova, P., Rieben, R., and Bovin, N. (2007) Normal human serum contains high levels of anti-Gal $\alpha$ 1-4GlcNAc antibodies, *Xenotransplantation*, **14**, 627-635, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2007.00436.x>.
13. Duhamel, R. C., and Whitehead, J. S. (1990) Prevention of nonspecific binding of avidin, 201-207, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)84275-L](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)84275-L).
14. Nyhlin, N., El-Salhy, M., Sandström, O., and Suhr, O. (1997) Evaluation of immunohistochemical staining of human duodenal endocrine cells after microwave antigen retrieval, *Histochem. J.*, **29**, 177-181, <https://doi.org/10.1023/a:1026441623791>.
15. Kim, S. H., Jung, K. C., Shin, Y. K., Lee, K. M., Park, Y. S., Choi, Y. L., Oh, K. I., Kim, M. K., Chung, D. H., Son, H. G., and Park, S. H. (2002) The enhanced reactivity of endogenous biotin-like molecules by antigen retrieval procedures and signal amplification with tyramine, *Histochem. J.*, **34**, 97-103, <https://doi.org/10.1023/a:1020954611464>.
16. Shone, C., Ferreira, J., Boyer, A., Cirino, N., Egan, C., Evans, E., Kools, J., and Sharma, S. (2006) The 5th international conference on basic and therapeutic aspects of Botulinum and tetanus neurotoxins. Workshop review: assays and detection, *Neurotox. Res.*, **9**, 205-216, <https://doi.org/10.1007/BF03033940>.
17. Dundas, C. M., Demonte, D., and Park, S. (2013) Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 9343-9353, <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5232-z>.
18. Jain, A., and Cheng, K. (2017) The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis, *J. Control. Rel.*, **245**, 27-40, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.016>.

## (STREPT)AVIDIN BINDS GLYCOCOCONJUGATES

**N. V. Shilova<sup>1,2\*</sup>, S. M. Polyakova<sup>1</sup>, A. Yu. Nokel<sup>1,2</sup>, A. D. Lipatnikov<sup>1</sup>,  
E. A. Gordeeva<sup>1</sup>, M. V. Lavrenteva<sup>3</sup>, and N. V. Bovin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
117997 Moscow, Russia; e-mail: pumatnv@gmail.com

<sup>2</sup> National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
named after Academician V. I. Kulakov of the Ministry of Health of Russian Federation,  
117997 Moscow, Russia

<sup>3</sup> MIREA, Russian Technological University, Biotechnology department, 119571 Moscow, Russia

Fluorescently labeled and conjugated (strept)avidin is widely used for imaging of biotinylated molecules in immunological assays and histochemistry. The presented article shows that in addition to biotin, these proteins bind a number of glycans, including fragments of glycoprotein and glycolipid chains of mammals, in particular, antigens of the ABO blood system, oligolactosamines, 6-O-sulfated oligosaccharides. This interaction is inhibited in a dose-dependent manner by glycans in a form of polymeric (but not monomeric) conjugates at the micromolar concentration level, i.e. requires polyvalence. Taking into account the cluster organization of cell glycans (glycoproteins and glycolipids), when analyzing objects containing carbohydrates, this property is a potential source of error, that can be prevented by avoiding a large excess of (strept)avidin in the analytical system.

**Keywords:** streptavidin, avidin, glycoconjugates, glycans, printed glycan array, microarray

## ВИМЕНТИНОВЫЕ И ДЕСМИНОВЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ ПОДДЕРЖИВАЮТ МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ

© 2024 А.А. Далял<sup>1</sup>, О.И. Парфентьева<sup>1</sup>, Ван Хуэйин<sup>1</sup>, А.С. Шахов<sup>1,2</sup>,  
И.Б. Алиева<sup>1,2</sup>, А.А. Минин<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт белка РАН,  
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: alexminin@gmail.com

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

Поступила в редакцию 28.08.2024  
После доработки 04.10.2024  
Принята к публикации 09.10.2024

Промежуточные филаменты (ПФ) – один из трёх компонентов цитоскелета животных клеток, характерной особенностью которого является многообразие белков, представляющих эти филаменты в различных клетках. Они обеспечивают механическую прочность клеток, а также внутреклеточную локализацию ядер и различных органелл. Десмин представляет собой белок ПФ, характерный для мышечных клеток, а близкий ему по структуре виментин встречается во многих клетках мезенхимальной природы. В процессе миогенеза, а также при регенерации повреждённой мышечной ткани в клетках могут экспрессироваться оба этих белка, образуя смешанную сеть ПФ. Известно, что каждый из этих белков контролирует функции митохондрий в соответствующих клетках, отвечает за их локализацию и поддержание мембранных потенциалов. Вместе с тем неясно, как осуществляется контроль митохондриальных функций в клетках со смешанными ПФ. Чтобы выяснить, какое влияние на митохондриальный потенциал оказывают эти белки, находясь в клетке одновременно, были использованы клетки ВНК21, содержащие виментиновые и десминовые ПФ. Экспрессию одного из них или обоих этих белков одновременно подавляли при помощи нокаута их генов и/или РНК-интерференции. Оказалось, что при удалении любого из них мембранный потенциал митохондрий оставался на том же уровне, что и в присутствии двух белков. Удаление двух белков одновременно приводило к снижению потенциала на 20%. Таким образом, виментин и десмин играют одинаковую роль в поддержании мембранных потенциалов митохондрий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** митохондрии, виментин, десмин, мембранный потенциал митохондрий.

DOI: 10.31857/S0320972524110157 EDN: IJWAPW

### ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии выполняют важнейшие функции в эукариотических клетках как в нормальных условиях, так и при различных патологических состояниях. Они участвуют в синтезе АТР, образовании активных форм кислорода, регуляции апоптоза и концентрации кальция и во многих других функциях в клетках [1–4]. На уровне организма они связаны с иммунным ответом, реакцией на стресс, адаптацией к нагрузкам, а также играют ключевую роль в раз-

витии различных патологий, раковых опухолей и в процессе старения [5–10]. Большинство этих функций митохондрий напрямую зависит от их мембранных потенциалов, за образование которых отвечают комплексы дыхательной цепи, локализованные в их внутренней мембране [11]. Транспорт электронов и перенос протонов в процессе дыхания создаёт электрический потенциал около -180 мВ относительно цитозоля [11]. На то, что поддержание мембранных потенциалов на достаточно высоком уровне имеет критическое значение, указывает тот факт, что деполяризованные митохондрии (в которых потенциал снизился до недопустимого уровня) селективно разрушаются в результате митофагии [12]. В случае массовой деполяризации митохондрий в клетке

Принятые сокращения: ПФ – промежуточные филаменты.

\* Адресат для корреспонденции.

включается процесс апоптоза, и вся клетка разрушается [13].

К настоящему времени известны многие внутриклеточные факторы, участвующие в регуляции мембранного потенциала митохондрий [14], важное место среди которых занимают белки промежуточных филаментов (ПФ) [15]. Так, было показано, что мутации кератинов приводят к фрагментации митохондрий в гепатоцитах, их агрегации и нарушению дыхательной функции [16–18]. Виментин, белок III типа ПФ, регулирует митохондриальный потенциал в фибробластах, и его удаление приводит к снижению потенциала на 20% [19]. Роль другого белка ПФ, десмина, характерного для мышечных клеток, в дыхательной функции митохондрий также была продемонстрирована в ряде работ [20–24]. Ранее мы обнаружили, что виментин и десмин, экспрессированные в бактериях, способны напрямую связываться с митохондриями *in vitro* [25, 26] и, следовательно, могли бы непосредственно участвовать в регуляции свойств митохондрий.

Хотя виментин характерен для различных клеток мезенхимальной природы, а десминовые ПФ обнаруживаются в мышечных клетках, в определённых условиях эти белки могут образовывать смешанные сети ПФ. Например, на ранних стадиях дифференцировки и при регенерации мышечных волокон наблюдается одновременная экспрессия виментина и десмина [27]. Таким образом, виментин может сосуществовать с десмином в одной клетке, и оба белка, в принципе, могут взаимодействовать с митохондриями, влияя на их свойства.

Роль виментина в регуляции мембранного потенциала митохондрий в ситуации, когда кроме него присутствует десмин, не исследована. Более того, несмотря на убедительные данные из нескольких лабораторий, указывающие на то, что десмин участвует в распределении митохондрий, определении их морфологии и дыхательной функции [20–23], его роль в регуляции их мембранного потенциала изучена мало. Чтобы исследовать участие виментина и десмина в этом процессе при одновременной их экспрессии в клетках, в качестве модели были использованы клетки ВНК21, в которых эти белки избирательно удалялись при помощи РНК-интерференции и/или системы CRISPR-Cas9. Оказалось, что каждый из этих двух белков способен поддерживать потенциал митохондрий независимо от другого.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура клеток.** В работе использовали линию клеток ВНК21 и полученные из неё при помощи системы CRISPR-Cas9 две линии – ВНК21(Vim<sup>-/-</sup>)

и ВНК21(Des<sup>-/-</sup>). Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки («Биолот», Россия), пенициллина (100 мкг/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) («Sigma-Aldrich», США) при температуре 37 °C в атмосфере насыщенных водяных паров с содержанием 5% CO<sub>2</sub>. Для микроскопии клетки выращивали на стерильных покровных стёклах в течение 16–20 ч.

**РНК-интерференция.** Для удаления десмина в клетках ВНК21 при помощи РНК-интерференции мы использовали плазмиду pG-SHIN2-des, кодирующую shRNK (малую РНК, образующую шпильки) 5'-AAGCAGGAGAUGAUGGAGU-3' [28], и GFP в качестве маркера. Для удаления виментина использовалась плазмида pG-SHIN2-vim, кодирующая shRNK 5'-CAGACAGGAUGUUGACAAU-3' [29, 30], любезно предоставленная проф. Р. Голдманом (Северо-Западный университет, Чикаго). В контрольных экспериментах использовали плазмиду pG-SHIN2-scr, кодирующую shRNK 5'-AUGUACUGCGCGUGGAGA-3' того же размера со случайной последовательностью.

**Нокаут генов.** Чтобы разрушить ген виментина в клетках ВНК21, использовали транзитную трансфекцию при помощи плазмиды pSpCas9n(BB)-Puro-(1+2)Vim, кодирующей две гидовые РНК: 5'-CACCGAACUCGGUGUUGAUGGCGU-3' и 5'-CACCGAACACCCGCACCAACGAGA-3' [31]. Для нокаута гена десмина использовали плазмиду pSpCas9(BB)-Puro-Des, кодирующую гидовую РНК 5'-CACCGCGCGACCCGGGUCGGCUCG-3'. Линии клеток ВНК21(Vim<sup>-/-</sup>) и ВНК21(Des<sup>-/-</sup>) получали при помощи селекции в среде DMEM, содержащей 2 мкг/мл пуромицина и 10 мкг/мл верапамила.

**Трансфекция.** Трансфекцию клеток проводили плазмидами при помощи реагента Transfectin («Евроген», Россия). Для этого 1 мг ДНК смешивали с 1 мкл реагента в 100 мкл среды DMEM без сыворотки и добавляли к клеткам в 1 мл полной среды DMEM.

**Флуоресцентная микроскопия живых клеток.** Для окрашивания митохондрий клетки инкубировали с 5 нМ TMRM («Molecular Probes», США) в присутствии 2,2 мКМ верапамила в течение 30 мин при 37 °C. Стёкла с клетками помещали в герметичную камеру со средой DMEM и фотографировали при помощи микроскопа Keyence BZ-9000 («Keyence», США), снабжённого инкубатором для наблюдения живых клеток («PeCon», Германия), в котором поддерживали температуру 36 ± 2 °C. Съёмку проводили при помощи объектива PlanApo 63× и 12-битной цифровой CCD-камеры. Изображение передавали на компьютер с помощью программного обеспечения BZ II Viewer («Keyence») и записывали в виде 12-битных графических файлов.

### Иммунофлуоресценция и имmunоблоттинг.

Для окрашивания ПФ в клетках использовали фиксацию метанолом при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин и метод непрямой иммунофлуоресценции при помощи моноклональных мышиных антител V9 против виментина («Sigma-Aldrich») и моноклональных мышиных антител DE-U-10 против десмина («Sigma-Aldrich»). В качестве вторых антител использовали FITC- и TRITC-меченные антимышинные антитела («Jackson», США). Микрофотографии получали при помощи микроскопа Keyence BZ-9000 с объективом PlanApo 63 $\times$  и 12-битной цифровой CCD-камеры.

Для получения изображений методом микроскопии сверхвысокого разрешения (SIM-микроскопии) использовали микроскоп Nikon N-SIM («Nikon», Япония) с иммерсионным объективом  $\times 100/1.49\text{ NA}$  и диодным лазером 561 нм. Z-стопки кадров через каждые 0,12 нм получали при помощи камеры EMCCD (iXon 897, «Andor», Япония). Условия экспозиции были подобраны таким образом, чтобы средние показания яркости составляли около 5000 с минимальным выгоранием. Изображения получали при помощи программы NIS-Elements 5.1 («Nikon»).

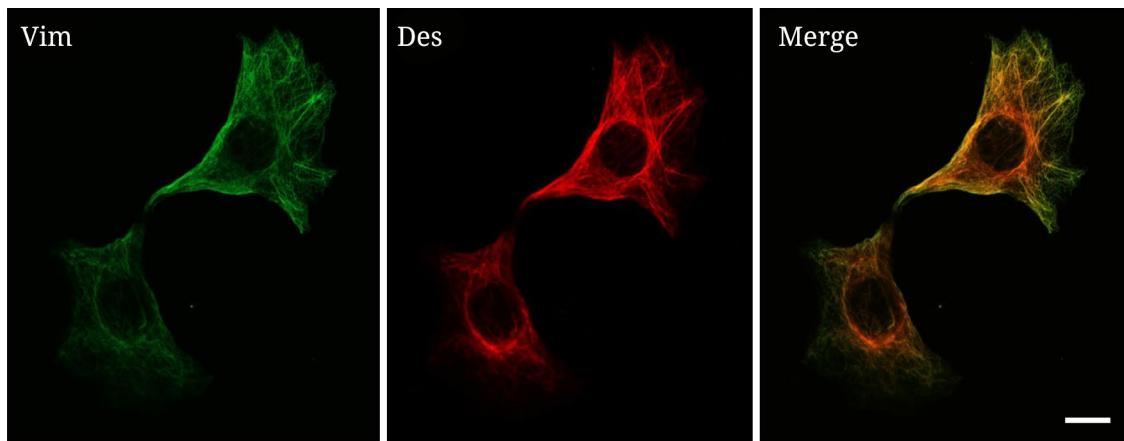
Электрофорез клеточных лизатов проводили по методу Лэммли [32], а дальнейшую процедуру иммуноблоттинга – как описано ранее [26]. Для выявления белков на нитроцеллюлозном фильтре использовали антитела V9 против виментина, DE-U-10 против десмина, моноклональные мышиные антитела DM1A против тубулина и вторые антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Jackson»). В качестве субстрата пероксидазы использовалась перекись водорода и диамиnobензидин, дающий при проявлении коричневую окраску.

**Анализ мембранных потенциала митохондрий.** Уровень трансмембранных потенциала

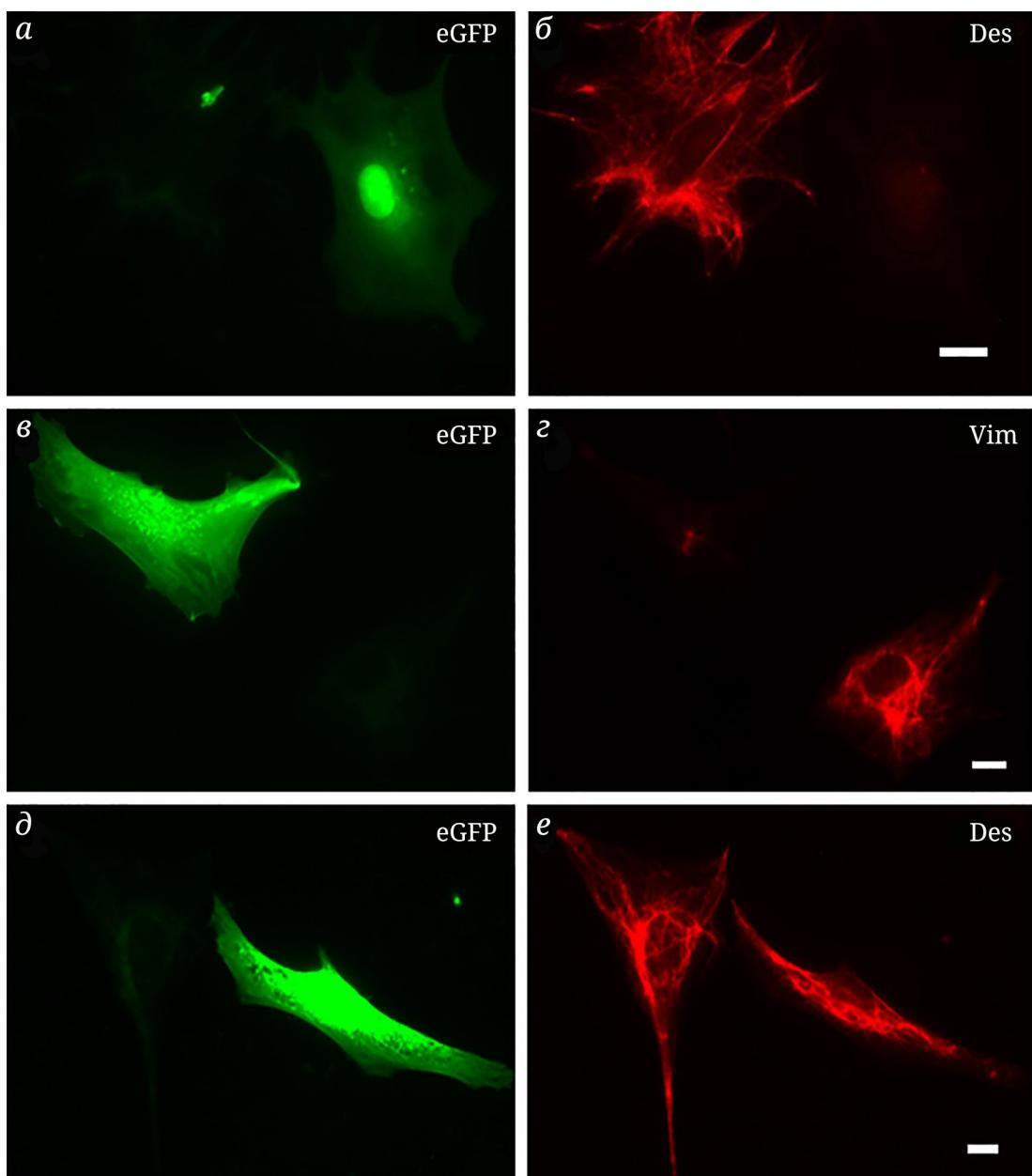
митохондрий в клетках определяли по интенсивности флуоресценции красителя TMRM, как было описано ранее [19]. Измерения проводили с помощью программы ImageJ. Последовательность действий при анализе изображений была следующей: 1) на выбранном участке клетки с митохондриями, расположенными в один слой, определяли контуры каждой митохондрии с помощью «анализатора частиц» из программы ImageJ, и 2) измеряли среднее значение интенсивности флуоресценции по всем пикселям, попавшим в контур. В каждом опыте обсчитывали 10–15 участков, содержащих по 15–40 митохондрий. Данные представляли как средние значения интенсивности флуоресценции всех митохондрий с указанием стандартной ошибки. Для проверки на нормальность использовали тест Шапиро–Уилка. Для проверки однородности дисперсии использовали F-тест. Значимость различий определяли с помощью парного t-теста Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фибробластоподобные клетки ВНК21 содержат ПФ, образованные двумя белками III типа виментином и десмином с небольшой примесью нестина, белка VI типа [33]. Иммунофлуоресцентный анализ сети ПФ в этих клетках при помощи микроскопии высокого разрешения показывает, что она состоит из филаментов, образованных в результате кополимеризации виментина и десмина. Как видно на рис. 1, распределение этих белков не полностью совпадает, что свидетельствует, по-видимому, об их разном соотношении в индивидуальных филаментах. Можно заметить, что в окколоядерной зоне больше ПФ, обогащенных десмином, а на периферии клеток выше уровень виментина в филаментах. Общая картина ПФ



**Рис. 1.** Виментиновые (зелёный) и десминовые (красный) ПФ в клетках ВНК21, выявленные при помощи соответствующих антител. Изображения получены при помощи микроскопии высокого разрешения. Шкала 10 мкм



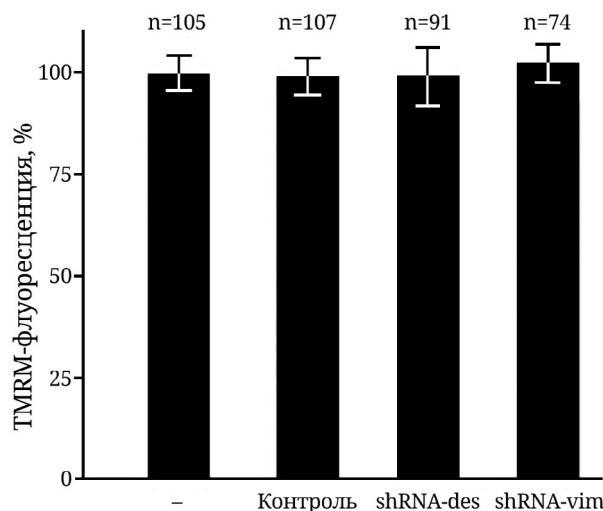
**Рис. 2.** Разрушение десминовых (*а, б*) и виментиновых (*в, г*) ПФ при помощи РНК-интерференции в клетках ВНК21, трансфицированных плазмидами pG-SHIN2-des и pG-SHIN2-vim соответственно. Контрольные клетки (*д, е*) трансфицировали плазмидой pG-SHIN2-scr. ПФ окрашены при помощи антител против десмина (Des) и виментина (Vim). Трансфицированные клетки выявляли по экспрессии GFP. Масштаб 10 мкм

представляет собой радиально расположенную сеть, что указывает на вероятное участие транспортной системы микротрубочек в её внутриклеточном распределении. Чтобы исследовать роль двух белков ПФ в регуляции функций митохондрий в этих клетках, мы решили избирательно удалить каждый из них.

В первую очередь необходимо было проверить, как повлияет удаление каждого из двух белков на сеть ПФ в клетках ВНК21. Используя РНК-интерференцию для удаления белков ПФ при помощи плазмид на основе pG-SHIN2, содержащей в качестве репортера ген GFP [29, 30], нам удалось

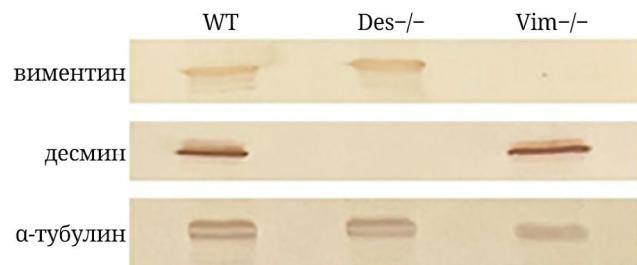
получить клетки ВНК21, в которых ПФ состояли из одного белка – виментина или десмина. На рис. 2 видно, что трансфицированные клетки, выявляемые при помощи коэкспрессии GFP, практически не содержали десмина (*а, б*) или виментина (*в, г*), если в них экспрессировали соответствующие интерферирующие РНК. В контрольных клетках, трансфицированных плазмидой pG-SHIN2-scr, не наблюдалось изменений в содержании ни десмина (рис. 2, *д, е*), ни виментина (не показано).

Ранее мы обнаружили, что нокдаун виментина в фибробластах приводил к снижению митохондриального потенциала [16], и решили



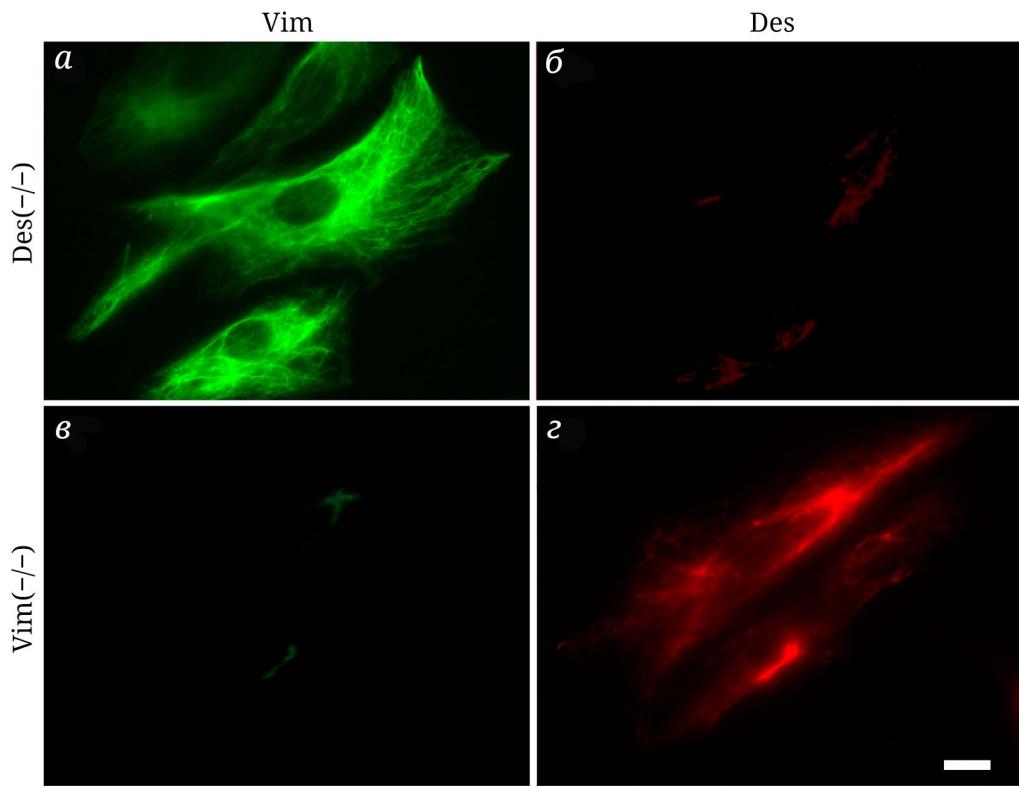
**Рис. 3.** Отсутствие изменений мембранных потенциала митохондрий в клетках BHK21 после нокаута десмина (shRNA-des) и виментина (shRNA-vim) при помощи РНК-интерференции. Контрольные клетки трансфицировали плазмидой pG-SHIN2-scr. Данные представлены в виде средних значений флуоресценции митохондрий в указанном числе клеток со стандартной ошибкой в процентах от среднего значения в нетрансфицированных клетках (-)

проверить, каков будет эффект удаления виментина в клетках BHK21, если в них останется только десмин. Анализ мембранных потенциала мито-

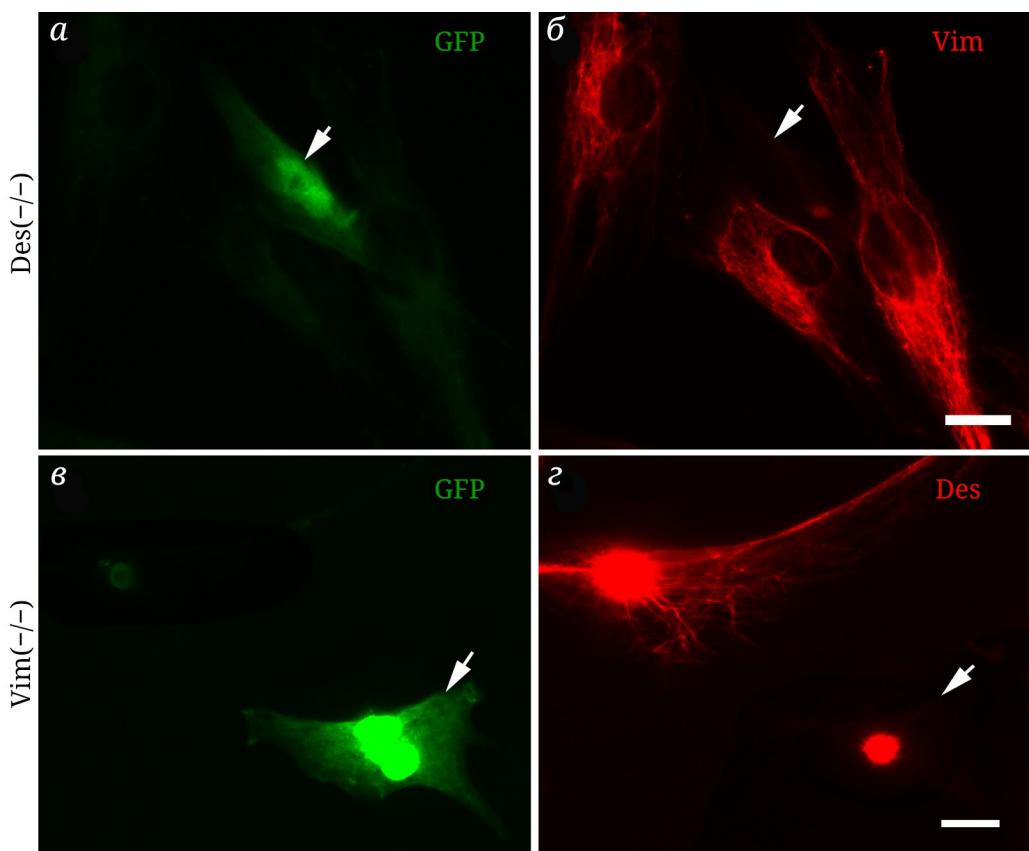


**Рис. 4.** Иммунофлюоресценция гомогенатов клеток исходной линии BHK21 (WT) и линий BHK21(Des<sup>-/-</sup>) и BHK21(Vim<sup>-/-</sup>), полученных в результате нокаута генов десмина и виментина соответственно. Альфа-тубулин использовали как контроль

хондрий в таких клетках показал (рис. 3), что нокаут виментина не вызывал каких-либо изменений уровня мембранных потенциала. Это означает, что оставшийся в клетках десмин может, подобно виментину, поддерживать потенциал митохондрий на высоком уровне. Нокаут десмина также не приводил к снижению митохондриального потенциала (рис. 3), предположительно благодаря виментину, который присутствовал в этих клетках. Эти данные позволили предположить, что и виментин и десмин независимо друг от друга контролируют потенциал митохондрий в клетках BHK21.



**Рис. 5.** ПФ в клетках линий BHK21(Des<sup>-/-</sup>) (α, β) и BHK21(Vim<sup>-/-</sup>) (γ, δ), полученных в результате нокаута генов десмина и виментина соответственно, выявленные при помощи иммунофлюоресценции с антителами против виментина (α, γ) или десмина (β, δ). Масштаб 10 мкм

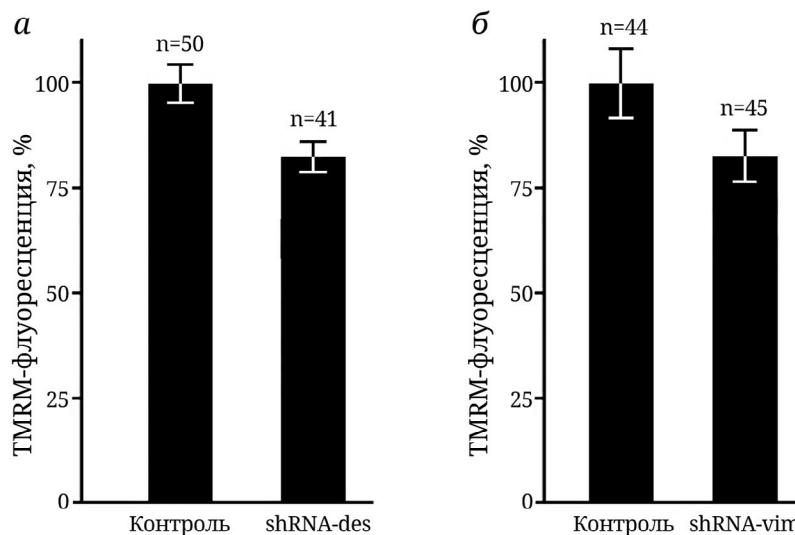


**Рис. 6.** Удаление виментина (*a*, *b*) в клетках BHK21(*Des*<sup>-/-</sup>) и десмина (*c*, *d*) в клетках BHK21(*Vim*<sup>-/-</sup>), трансфицированных плазмидами pG-SHIN2-vim и pG-SHIN2-des соответственно, при помощи РНК-интерференции. ПФ окрашены при помощи антител против виментина (*b*) и десмина (*d*). Трансфицированные клетки выявляли по экспрессии GFP (*a*, *c*, показаны стрелками). Масштаб 10 мкм

Следующим шагом для проверки нашего предположения было определение потенциала митохондрий в клетках, лишённых обоих белков. Чтобы получить клетки BHK21, лишённые ПФ, мы использовали последовательно два подхода: во-первых, при помощи системы CRISPR-Cas9 получили линии клеток, содержащие только виментин или десмин, и, во-вторых, используя РНК-интерференцию, удаляли в них другой исследуемый белок. Данные иммуноблоттинга, представленные на рис. 4, показывают, что в полученных линиях клеток BHK21(*Des*<sup>-/-</sup>) и BHK21(*Vim*<sup>-/-</sup>) не детектируются десмин и виментин соответственно. Анализ этих клеток при помощи иммунофлуоресцентной микроскопии демонстрирует, что ПФ в них образованы только одним белком, виментином (рис. 5, *a*, *b*) или десмином (рис. 5, *c*, *d*) соответственно. Виментиновые ПФ в клетках BHK21(*Des*<sup>-/-</sup>) представляют собой нормальную, равномерно расположенную радиальную сеть, в то время как десминовые ПФ в клетках BHK21(*Vim*<sup>-/-</sup>) частично агрегированы. Можно предположить, что нормальное распределение десминовых ПФ зависит от присутствия виментина.

Трансфекция клеток линии BHK21(*Des*<sup>-/-</sup>) при помощи плазмиды, кодирующей интерферирующую РНК против виментина, позволила значительно снизить содержание оставшегося виментина в трансфицированных клетках и, таким образом, получить клетки BHK21, лишённые ПФ. На микрофотографии (рис. 6, *a*, *b*) хорошо видно, что трансфицированная клетка практически не содержала виментиновых ПФ. Добраться до полного удаления десминовых ПФ в клетках BHK21(*Vim*<sup>-/-</sup>) оказалось сложнее. Как видно на рис. 6, *c*, *d*, в трансфицированных клетках оставались агрегаты десмина, хотя сеть филаментов на периферии клеток полностью отсутствовала. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, сеть ПФ сохранялась (не показано).

Уровень потенциала митохондрий в клетках BHK21(*Des*<sup>-/-</sup>) после удаления виментина оказался ниже, чем в контрольных клетках (рис. 7, *a*), что свидетельствует об участии виментиновых ПФ в его поддержании. Оказалось, что подобный эффект наблюдается и при подавлении экспрессии десмина в клетках BHK21(*Vim*<sup>-/-</sup>), несмотря на неполное его удаление. По-видимому, остающиеся агрегаты десмина не влияют на потенциал



**Рис. 7.** Снижение мембранных потенциалов митохондрий в клетках ВНК21( $Vim^{-/-}$ ) (а) и в клетках ВНК21( $Des^{-/-}$ ) (б) в результате РНК-интерференции десмина или виментина соответственно. В качестве контроля использовали клетки, трансфицированные плазмидой pG-SHIN2-scr. Данные представлены в виде средних значений флуоресценции митохондрий в указанном числе клеток со стандартной ошибкой в процентах от среднего значения в нетрансфицированных клетках

митохондрий. Интересно, что снижение уровня потенциала митохондрий в двух линиях клеток при нокауте виментина и десмина было одинаковым, порядка 20%. Таким образом, оба белка ПФ в клетках ВНК21 участвуют в поддержании мембранных потенциалов митохондрий независимо друг от друга.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Различные белки ПФ, обнаруженные в разных типах клеток, участвуют в определении подвижности, формы и во многих функциях митохондрий [34, 35]. Однако пока мало изучены молекулярные основы взаимодействия белков ПФ с митохондриями. Анализ аминокислотной последовательности белков ПФ позволил предсказать в некоторых из них участки, способные играть роль сигналов митохондриальной локализации [19, 25, 26]. Таким образом, по крайней мере некоторые ПФ могут напрямую, без посредников связываться с митохондриями, как и показали наши опыты *in vitro* с виментином и десмином [25, 26]. В настоящей работе, используя клетки ВНК21, содержащие одновременно виментин и десмин, мы демонстрируем, что десмин может поддерживать высокий уровень митохондриального потенциала, как и виментин, для которого такая способность была показана ранее [19]. На основе этих данных можно заключить, что митохондрии в мышечных клетках могут нормально функционировать как в присутствии десминовых ПФ, так и в условиях дополнительной экспрессии гена

виментина. По-видимому, экспрессия гена виментина в мышечных клетках не связана с изменением функций митохондрий, по крайней мере, не влияет на их потенциал.

Пока неясно, каким образом взаимодействие митохондрий с виментиновыми или десминовыми ПФ приводит к увеличению их мембранных потенциалов. Можно предположить, что, несмотря на относительно небольшое действие ПФ на уровень потенциала, их влияние на свойства митохондрий играет важную роль [35]. Данные, полученные в этой работе, свидетельствуют о том, что оба белка или каждый из них по отдельности оказывают на уровень потенциала одинаковое воздействие. Возможно, это указывает, что виментин и десмин действуют по одному механизму. В противном случае можно было бы ожидать их аддитивного эффекта. Как было сказано выше, оба белка имеют в своем составе участки, которые могут играть роль сигналов митохондриальной локализации [19, 25, 26], т.е. могут узнаваться митохондриальными комплексами, отвечающими за импорт белков. Могут ли эти комплексы участвовать в регуляции мембранных потенциалов митохондрий, покажут новые исследования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные позволяют предположить, что экспрессия виментина в мышечных клетках в процессе дифференцировки или при регенерации после повреждения способствует формированию нормальной сети десминовых ПФ. Частичная

агрегация десминовых ПФ при нокауте виментина может указывать на такую возможность. Но это предположение необходимо проверить в ходе дополнительных исследований.

**Вклад авторов.** И.Б. Алиева, А.А. Минин – концепция и руководство работой; А.А. Далял, О.И. Парфентьева, Ван Хуэйин – проведение экспериментов; А.А. Далял, О.И. Парфентьева, А.С. Шахов – обсуждение результатов исследования; А.А. Далял, А.А. Минин – написание текста; И.Б. Алиева, А.С. Шахов – редактирование текста статьи.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Дж. Агнетти (Болонья, Италия) за любезно

предоставленные антитела против десмина, Р. Голдману (Чикаго, США) за генетические конструкции, И.И. Кирееву за помощь в работе с микроскопом высокого разрешения, Н.В. Мининой за квалифицированную техническую помощь.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00036 ААМ).

**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

- Kennedy, E. P., and Lehninger, A. L. (1949) Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **179**, 957-972.
- Muller, F. (2000) The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: its relevance to aging, *J. Am. Aging Assoc.*, **23**, 227-253, <https://doi.org/10.1007/s11357-000-0022-9>.
- Thayer, S. A., and Miller, R. J. (1990) Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones *in vitro*, *J. Physiol.*, **425**, 85-115, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018094>.
- Wolvetang, E. J., Johnson, K. L., Krauer, K., Ralph, S. J., and Linnane, A. W. (1994) Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis, *FEBS Lett.*, **339**, 40-44, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80380-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80380-3).
- Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A., Lee, S. J., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H. P., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W., and Choi, A. M. (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome, *Nat. Immunol.*, **12**, 222-230, <https://doi.org/10.1038/ni.1980>.
- Cavalli, L. R., Varella-Garcia, M., and Liang, B. C. (1997) Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA, *Cell Growth Differ.*, **8**, 1189-1198.
- Morais, R., Zinkewich-Péotti, K., Parent, M., Wang, H., Babai, F., and Zollinger, M. (1994) Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA, *Cancer Res.*, **54**, 3889-3896.
- Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M. R., Su, Y. A., Rennert, O. M., and Chrousos, G. P. (2007) Mitochondria as key components of the stress response, *Trends Endocrinol. Metab.*, **18**, 190-198, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.04.004>.
- Davies, K. J. A., Packer, L., and Brooks, G. A. (1981) Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training, *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 539-554, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90312-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90312-x).
- Linnane, A. W., Marzuki, S., Ozawa, T., and Tanaka, M. (1989) Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases, *Lancet*, **333**, 642-645, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)92145-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92145-4).
- Mitchell, P. D. (1981) *Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes* (Skulachev, V. P., and Hinkle, P. C., eds), Addison-Wesley, Advanced Book Program/World Science Division, University of Michigan, pp. 633.
- Tanaka, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D. F., Karbowski, M., and Youle, R. J. (2010) Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin, *J. Cell Biol.*, **191**, 1367-1380, <https://doi.org/10.1083/jcb.201007013>.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis, *Science*, **281**, 1309-1312, <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>.
- Vasan, K., Clutter, M., Fernandez Dunne, S., George, M. D., Luan, C. H., Chandel, N. S., and Martínez-Reyes, I. (2022) Genes involved in maintaining mitochondrial membrane potential upon electron transport chain disruption, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 781558, <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.781558>.
- Begum, H. M., and Shen, K. (2023) Intracellular and microenvironmental regulation of mitochondrial membrane potential in cancer cells, *WIREs Mech. Dis.*, **15**, e1595, <https://doi.org/10.1002/wsbm.1595>.
- Uttam, J., Hutton, E., Coulombe, P. A., Anton-Lamprecht, I., Yu, Q. C., Gedde-Dahl, T., Fine, J. D., and Fuchs, E. (1996) The genetic basis of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9079-9084, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9079>.

17. Kumar, V., Bouameur, J.-E., Bär, J., Rice, R. H., Hornig-Do, H.-T., Roop, D. R., Schwarz, N., Brodesser, S., Thiering, S., Leube, R. E., et al. (2015) A keratin scaffold regulates epidermal barrier formation, mitochondrial lipid composition, and activity, *J. Cell Biol.*, **211**, 1057-1075, <https://doi.org/10.1083/jcb.201404147>.
18. Kumemura, H., Harada, M., Yanagimoto, C., Koga, H., Kawaguchi, T., Hanada, S., Taniguchi, E., Ueno, T., and Sata, M. (2008) Mutation in keratin 18 induces mitochondrial fragmentation in liver-derived epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 33-40, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.116>.
19. Chernoivanenko, I. S., Matveeva, E. A., Gelfand, V. I., Goldman, R. D., Minin, A. A. (2015) Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments, *FASEB J.*, **29**, 820, <https://doi.org/10.1096/fj.14-259903>.
20. Capetanaki, Y. (2002) Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function, *Trends Cardiovasc. Med.*, **12**, 339-348, [https://doi.org/10.1016/s1050-1738\(02\)00184-6](https://doi.org/10.1016/s1050-1738(02)00184-6).
21. Guichard, J. L., Rogowski, M., Agnetti, G., Fu, L., Powell, P., Wei, C. C., Collawn, J., and Dell'Italia, L. J. (2017) Desmin loss and mitochondrial damage precede left ventricular systolic failure in volume overload heart failure, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **313**, H32-H45, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00027.2017>.
22. Milner, D. J., Weitzer, G., Tran, D., Bradley, A., and Capetanaki, Y. (1996) Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin, *J. Cell Biol.*, **134**, 1255-1270, <https://doi.org/10.1083/jcb.134.5.1255>.
23. Milner, D. J., Mavroidis, M., Weisleder, N., and Capetanaki, Y. (2000) Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function, *J. Cell Biol.*, **150**, 1283-1298, <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1283>.
24. Vrabie, A., Goldfarb, L. G., Shatunov, A., Nägele, A., Fritz, P., Kaczmarek, I., and Goebel, H. H. (2005) The enlarging spectrum of desminopathies: new morphological findings, eastward geographic spread, novel exon 3 desmin mutation, *Acta Neuropathol.*, **109**, 411-417, <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0980-1>.
25. Dayal, A. A., Medvedeva, N. V., and Minin, A. A. (2022) N-Terminal fragment of vimentin is responsible for binding of mitochondria *in vitro*, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **16**, 151-157, <https://doi.org/10.1134/S1990747822030059>.
26. Dayal, A. A., Medvedeva, N. V., Nekrasova, T. M., Duhalin, S. D., Surin, A. K., and Minin, A. A. (2020) Desmin interacts directly with mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8122, <https://doi.org/10.3390/ijms21218122>.
27. Bornemann, A., and Schmalbruch, H. (1992) Desmin and vimentin in regenerating muscles, *Muscle Nerve*, **15**, 14-20, <https://doi.org/10.1002/mus.880150104>.
28. Mohamed, J. S., and Boriek, A. M. (2012) Loss of desmin triggers mechanosensitivity and up-regulation of Ankrd1 expression through Akt-NF-κB signaling pathway in smooth muscle cells, *FASEB J.*, **26**, 757-765, <https://doi.org/10.1096/fj.10-160291>.
29. Mendez, M. G., Kojima, S., and Goldman, R. D. (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition, *FASEB J.*, **24**, 1838-1851, <https://doi.org/10.1096/fj.09-151639>.
30. Kojima, S., Vignjevic, D., and Borisy, G. G. (2004) Improved silencing vector co-expressing GFP and small hairpin RNA, *Biotechniques*, **36**, 74-79, <https://doi.org/10.2144/04361ST02>.
31. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., and Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, **339**, 819-823, <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
32. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-695, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
33. Steinert, P. M., Chou, Y. H., Prahlad, V., Parry, D. A., Marekov, L. N., Wu, K. C., Jang, S. I., and Goldman, R. D. (1999) A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly *in vitro* to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin, *J. Biol. Chem.*, **274**, 9881-9890, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9881>.
34. Schwarz, N., and Leube, R. (2016) Intermediate filaments as organizers of cellular space: how they affect mitochondrial structure and function, *Cells*, **5**, 30, <https://doi.org/10.3390/cells5030030>.
35. Alieva, I. B., Shakhov, A. S., Dayal, A. A., Parfenteva, O. I., Minin, A. A. (2024) Unique role of vimentin in the intermediate filament proteins family, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 726-736, <https://doi.org/10.1134/S0006297924040114>.

## VIMENTIN AND DESMIN INTERMEDIATE FILAMENTS MAINTAIN MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL

A. A. Dayal<sup>1</sup>, O. I. Parfenteva<sup>1</sup>, W. Huiying<sup>1</sup>, A. S. Shakhov<sup>1,2</sup>,  
I. B. Alieva<sup>1,2</sup>, and A. A. Minin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,  
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: alexminin@gmail.com

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

Intermediate filaments (IF) are one of the three main components of the cytoskeleton in animal cells, characterized by the diverse range of proteins that represent them in different cell types. They provide mechanical strength to cells and help position the nucleus and various organelles within the cell. Desmin is an IF protein characteristic of muscle cells, while vimentin, which has a similar structure, is found in many mesenchymal cells. During myogenesis and the regeneration of damaged muscle tissue, both of these proteins can be expressed, forming a mixed IF network. Each protein is known to regulate mitochondrial function in the cells where it is present, including mitochondrial localization and the maintenance of mitochondrial membrane potential. However, the regulation of mitochondrial function in cells with mixed IFs remains unclear. To investigate how the simultaneous presence of these proteins affects mitochondrial membrane potential, we utilized BHK21 cells as a model system, expressing both vimentin and desmin IFs. The expression of either protein individually or both proteins simultaneously was suppressed using gene knockout and/or RNA interference. It was found that removal of either protein did not affect the mitochondrial membrane potential, which remained unchanged compared to when both proteins were present. Simultaneous removal of both proteins resulted in a 20% reduction in mitochondrial membrane potential, indicating that vimentin and desmin both play a critical role in its maintenance.

*Keywords:* mitochondria, vimentin, desmin, mitochondrial membrane potential

## ПОЛНОРАЗМЕРНЫЙ РЕПЛИКОН SARS-CoV-2 С ДВУМЯ РЕПОРТЕРАМИ ДЛЯ СКРИНИНГА ИНГИБИТОРОВ РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА

© 2024 С.П. Королев<sup>1,2,3\*</sup>, А.А. Шулепова<sup>1,3</sup>, А.Н. Анисенко<sup>1,2,3</sup>, С.О. Галкин<sup>3</sup>,  
Л.А. Александрова<sup>4</sup>, М.В. Ясько<sup>4</sup>, Е.С. Матюгина<sup>4</sup>, М.С. Новиков<sup>5</sup>,  
А.Л. Хандажинская<sup>4</sup>, С.Н. Кочетков<sup>2,4</sup>, М.Б. Готтих<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
химический факультет, 119991 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

<sup>5</sup> Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра фармацевтической и токсикологической химии, 400131 Волгоград, Россия

Поступила в редакцию 10.09.2024

После доработки 14.10.2024

Принята к публикации 15.10.2024

В качестве безопасной клеточной системы для тестирования ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) SARS-CoV-2 получена генетическая конструкция, клонированная в вектор искусственной бактериальной хромосомы и представляющая собой кДНК вируса, не содержащую генов структурных белков S, E и M, с двумя блоками репортерных генов. Первый блок, представленный люциферазой *Renilla reniformis* и зелёным флуоресцентным белком (Rluc-GFP), находится под контролем CMV-промотора, расположенного перед 5'-нетранслируемым регионом (5'-UTR) SARS-CoV-2. Второй блок репортерных генов представлен люциферазой светлячка *Photinus pyralis* и красным флуоресцентным белком (Fluc-RFP) и находится после последовательности, регулирующей транскрипцию (TRS-N). Такое расположение генов и регуляторных последовательностей позволяет оценить уровень ингибирования вирусной RdRp, поскольку первый блок репортерных генов может транскрибироваться не только вирусной RdRp, но и клеточными полимеразами, в то время как второй блок может транскрибироваться только вирусной полимеразой по механизму прерывистой транскрипции, характерной для семейства *Coronaviridae*. Для облегчения поиска нуклеозидных ингибиторов RdRp без создания фосфорилированных депо-форм создана клеточная линия Vero E6\_TK, экспрессирующая тимидинкиназу вируса простого герпеса, осуществляющую первую стадию фосфорилирования нуклеозидов в клетке. Проверка способности ряда соединений ингибировать каталитическую активность RdRp SARS-CoV-2 позволила впервые обнаружить антивирусную активность у 2'-амино-2'-дезоксиаденозина и аденоzin-N1-оксида, превышающую активность используемого для лечения COVID-19 молнунипиравира.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** полноразмерный репликон с двумя репортерами, ингибиторы, РНК-зависимая РНК-полимераза, SARS-CoV-2, вирусы.

DOI: 10.31857/S0320972524110166 EDN: IJVTPC

Принятые сокращения: 5'-UTR – 5'-нетранслируемый регион; BAC – Bacterial Artificial Chromosome, бактериальная искусственная хромосома; CMV – цитомегаловирус; Fluc – люцифераза светлячка *Photinus pyralis*; GFP – зелёный флуоресцентный белок; RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза; RFP – красный флуоресцентный белок; Rluc – люцифераза *Renilla reniformis*; TK – тимидинкиназа вируса простого герпеса человека первого типа.

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 (COronaVIrus Disease 2019), вызванная новым штаммом бетакоронавируса SARS-CoV-2, к концу 2023 г. унесла жизни порядка 7 млн человек. Для терапии COVID-19 к настоящему времени создан только один специфический препарат «Паксловид», в состав которого входят ингибитор основной протеазы вируса нирматрелвир и ритонавир [1]. Применяющиеся для лечения коронавирусной инфекции препараты ремдесивир, фавипиравир и некоторые другие, направленные на блокирование РНК-полимеразы SARS-CoV-2, не являются специфическими ингибиторами этого фермента и оказывают существенное побочное действие. В связи с этим дизайн и синтез специфических ингибиторов РНК-полимеразы SARS-CoV-2 представляется совершенно необходимым.

SARS-CoV-2 относится к семейству (+)РНК-вирусов *Coronaviridae*, для которых характерно сложное устройство генома и необычный способ синтеза субгеномных РНК, названный прерывистой транскрипцией [2, 3]. Процесс репликации генома и прерывистой транскрипции осуществляется многокомпонентным комплексом вирусных неструктурных белков (NSP7–NSP16), называемым РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp). Оба процесса начинаются, когда RdRp связывает 3'-конец геномной РНК и начинает синтез комплементарной ей некодирующему цепи (-)РНК. В процессе репликации полимеразный комплекс синтезирует полноразмерную цепь (-)РНК, при повторном прочтении которой синтезируются копии геномной (+)РНК. Прерывистая транскрипция происходит, когда полимеразный комплекс RdRp и растущей цепи РНК диссоциирует от матрицы в специальных межгенных участках (transcription regulation sequence, TRS), после чего повторно связывается с комплементарной последовательностью в 5'-нетранслируемой области геномной РНК и продолжает синтез. При повторном прочтении таких укороченных РНК синтезируются субгеномные РНК, отличающиеся от полноразмерных геномных РНК потерей части кодирующему последовательности.

Столь сложный процесс вирусной репликации и прерывистой транскрипции требует создания адекватных клеточных моделей этих процессов для их изучения и поиска новых ингибиторов [4, 5].

Существующие сегодня модели можно условно разделить на два класса. К первым относятся полноразмерные вирусные системы, использование которых возможно только в специализированных исследовательских учреждениях, т.к. они предполагают работу с инфекционными вирусны-

ми частицами. К примерам таких систем можно отнести природные изоляты вируса или векторы на основе искусственной бактериальной хромосомы, содержащие полноразмерную кДНК вируса [6]. При трансфекции клеток этим вектором РНК-полимераза II синтезирует РНК SARS-CoV-2, после чего становится возможной сборка вирусных частиц и инфекция соседних клеток. Такие экспрессионно-компетентные вирусные системы могут дополнительно содержать гены репортерных белков, что значительно облегчает их использование для скрининга ингибиторов [7–9].

Ко второй группе моделей относятся псевдовирусные системы и репликоны – безопасные клеточные системы, позволяющие проводить тестирование соединений без использования вирусных частиц [10–12]. В основе псевдовирусных систем лежат векторы на основе кДНК патогена, аналогичные описанным выше, из которых, однако, удалён один или несколько вирусных генов, что делает невозможной сборку новых вирионов в отсутствии дополнительного вектора, содержащего необходимые гены. При ко-трансфекции клеток вектором с модифицированной кДНК и вектором, кодирующим структурные вирусные белки, происходит образование псевдовирусных частиц, которые способны заражать клетки и поддерживать репликацию вирусной РНК, однако неспособны к генерации новых вирионов. Если же из вирусной кДНК удалить все структурные гены и использовать только этот вектор для трансфекции, в клетках не будет происходить сборки псевдовирусных частиц, но в них будут идти процессы репликации и прерывистой транскрипции миниатюризированного генома патогена. Такие системы называются репликонами. На данный момент создано несколько полноразмерных репликонов SARS-CoV-2 [12–15].

К сожалению, разработанные к настоящему моменту репликоны SARS-CoV-2 содержат в своём составе лишь один блок репортерных генов, что существенно ограничивает их применение для поиска ингибиторов SARS-CoV-2. Наличие одного блока репортеров не позволяет однозначно подтвердить RdRp в качестве мишени действия исследуемых ингибиторов, поскольку репортерные гены в указанных конструкциях находятся, как правило, под контролем сильного промотора цитомегаловируса (CMV). Уровень продукции репортера в таких репликонах зависит от эффективности работы как клеточной РНК-полимеразы II (этап синтеза (+)РНК вируса/псевдовируса/репликона с ДНК-вектора), так и от эффективности работы RdRp-комплекса (этап амплификации (+)РНК), поэтому невозможно однозначно определить, на какой из ферментов подействовало исследуемое соединение.

В настоящей работе описано конструирование полноразмерного репликона с двумя блоками репортерных генов. Первый блок находится под контролем CMV-промотора, расположенного перед 5'-нетранслируемым регионом (5'-UTR) SARS-CoV-2. Второй блок репортерных генов находится после последовательности, регулирующей транскрипцию (TRS-N). Такое расположение генов и регуляторных последовательностей позволяет оценить уровень ингибирования вирусной RdRp, поскольку второй блок репортерных генов может транскрибироваться только вирусной полимеразой по механизму прерывистой транскрипции, характерной для семейства *Coronaviridae*. Наличие двух блоков репортеров позволяет, помимо скрининга ингибиторов RdRp, также всесторонне изучать действие различных клеточных факторов на стадии прерывистой транскрипции и репликации вируса.

С использованием разработанной системы был проведён анализ серии соединений в качестве потенциальных ингибиторов полимеразной активности RdRp SARS-CoV-2 и впервые показано, что модифицированные производные аденоцина, 2'-амино-2'-дезоксиаденоzin, аденоzin-N1-оксид и 3'-O-метиладеноzin, способны подавлять активность RdRp SARS-CoV-2.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Олигонуклеотиды** (последовательность 5'-3') были синтезированы амидофосфитным методом компанией «Евроген» (Москва, Россия):

- CMV\_seq (ATTCAAATATGTATCCG);
- nsp1\_rev (TTCTCGTTGAAACCAGGG);
- nsp2\_fw (GGGTTGAAAAGAAAAAGCTTGATG);
- nsp2\_rev (GAAGTTCACCAATGATCAC);
- nsp3\_rev (AACACATCAAATTGTTGATGTACTG);
- nsp3\_rev (GTGTGGCCAACCTCTTC);
- nsp6\_fw (CCGCTACTTTAGACTGACTCTT);
- nsp7\_rev (AGACTACTGATGTGCACCTTAC);
- nsp13\_seq3 (CCAACCTAAACTGTTGATTCATC);
- nsp13\_rev (CAAGACTTGTAAATTGCAACTTGT);
- nsp16\_seq1 (GTGATAGTGCAACATTACCTAAAG);
- Nprot\_rev (CGCTGATTTGGGGTCC);
- mScarlett\_fw (GGCATGGACGAGCTG);
- m13\_fw (GTAAAACGACGGCCAGT);
- pJet1.2\_fw (CGACTCACTATAAGGGAGAGCGGC);
- pJet1.2\_rev (AAGAACATCGATTTCATGGCAG);
- F1\_fwd (GGCTACGGTCTCAATCTCGTTACATAACTTACGTAAATG);
- F1\_rev (GGCTACGGTCTCGGATAGACAGATCGAATTCTACCCATAAAGCC);
- F2\_fwd (GGCTACGGTCTCGTATCCAGTTGCGTCACCAATG);
- F2\_rev (GGCTACGGTCTCGAATGTCTCCTACAACCTT-

- CGGTAGTTTC);
- F3\_fwd (GGCTACGGTCTCGCATTATACTTAAACCA-GCAAATAATAG);
- F3\_rev (GGCTACGGTCTCGCTGACATTAGACTGT-ACAGTGGCTACTTTGATAC);
- F4\_fwd (GGCTACGGTCTCGTCAGATGTAAAGTGCA-CATC);
- F4\_rev (GGCTACGGTCTCCTCTATCAGACATTATG-CAAAG);
- F5\_fwd (GGCTACGGTCTCCGAGATCTTATGACAA-GTTGCAATTAC);
- F5\_rev (GGCTACGGTCTCCTAGTTGTTGTTAGTTGTAACAAGAACATCAC);
- F6\_fwd (GGCTACGGTCTCCACTAAAATGTCTGATA-ATGGAC);
- F6\_rev (GGCTACGGTCTCGTAATTAAGATAACATTGATGAGTTGGACAAAC);
- nsp12\_D760A\_D761A\_fw (ATACTCTCTGCCGCTGC-TGTTGTG);
- nsp12\_D760A\_D761A\_rev (CATCATTGAGAAATGTTACG).

**Плазмида.** pJET1.2/blunt («Thermo Fisher Scientific», США) – промежуточный вектор, в который были клонированы 6 фрагментов генома SARS-CoV-2, используемые при сборке полноразмерного репликона вируса. pBAC-lacZ (#13422, «Addgene», США) – искусственная бактериальная хромосома, вектор, используемый для получения и наработки в клетках *E. coli* полноразмерного репликона SARS-CoV-2.

**Полимеразная цепная реакция.** Аналитическую амплификацию проводили при концентрации праймеров 0,4 мКМ с использованием готовой смеси для ПЦР 5x ScreenMix («Евроген»). Препаративную амплификацию всех фрагментов ДНК проводили при концентрации праймеров 0,5 мКМ в буфере 1× Phusion HF или 1× Phusion GC с помощью ДНК-полимеразы Phusion Hot Start II High-Fidelity («Thermo Fisher Scientific», США) или в буфере 1× Q5 High-Fidelity Master Mix («New England Biolabs», США). Концентрация dNTP составляла 0,25 мМ. В зависимости от свойств матрицы концентрацию диметилсульфоксида (DMSO) варьировали от 0% до 10%. Полученные фрагменты ДНК были клонированы в промежуточный вектор pJET1.2 с использованием набора CloneJET PCR Cloning Kit, согласно протоколу производителя («Thermo Fisher Scientific»).

**Клонирование Golden Gate.** 6 фрагментов генома SARS-CoV-2, находящихся в промежуточных векторах (pJET1.2), клонировали в искусственную бактериальную хромосому. Реакцию клонирования методом Golden Gate проводили с помощью набора NEBridge Golden Gate Assembly Kit. В реакционную смесь добавляли 6 фрагментов генома и вектор BAC (Bacterial Artificial Chromosome, бактериальная искусственная хромосома), смесь эн-

донуклеазы *BsaI*-HFv2 и T4 ДНК-лигазы, после чего смесь помещали в термоциклер. В термоциклере устанавливалась следующая программа: {37 °C, 5 мин → 16 °C, 5 мин} × 30 → 55 °C, 5 мин. После термоциклирования смесь использовали для трансформации компетентных штаммов *E. coli* TransforMax EPI300 («LGC Biosearch Technologies», Великобритания).

**Наработка конструкций репликона** производилась в специальном штамме *E. coli* TransforMax EPI300, в котором возможно индуцированное увеличение копийности вектора. После трансформации клетки рассеивали на твёрдую среду (2,5%-ная LB, 1,5%-ный агар) с хлорамфениколом (12,5 мкг/мл) и оставляли на 36–48 ч при 30 °C. Далее, материал колоний переносили в жидкую среду (2,5%-ная LB, 12,5 мкг/мл хлорамфеникола) и растяли 12 ч при 30 °C, затем разбавляли до оптической плотности 0,3–0,4 и индуцировали репликацию целевой конструкции 2 мМ L-арabinозой в течение 6 ч при 30 °C. Конструкции выделяли в соответствии с протоколами наборов для выделения ДНК.

**Мутагенез** активного центра NSP12 производился на конструкции pJet1.2\_F4 с использованием полимеразы Q5 High-Fidelity DNA Polymerase («NEB», США). Для дизайна мутагенезных праймеров nsp12\_D760A\_D761A\_fw и nsp12\_D760A\_D761A\_rev было использовано онлайн-ПО NEBaseChanger (<https://nebasechanger.neb.com>).

**Секвенирование** фрагментов для проверки последовательностей проводилось компанией ЦКП «Геном», подготовка образцов производилась в соответствии с протоколами компании. Анализ хроматограмм секвенирования проводился в ПО SnapGene Viewer.

**Культивирование эукариотических клеток.** Клетки Vero E6 культивировали в среде DMEM («Gibco», США), содержащей 10%-ную эмбриональную бычью сыворотку (FBS), пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл) («Invitrogen», США) при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Получение клеточной линии, стабильно экспрессирующей тимидинкиназу вируса простого герпеса человека первого типа.** Клетки линии Vero E6 были трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими в своём геноме тимидинкиназу вируса простого герпеса человека первого типа (HSV-TK), а также гены селективных маркеров – зелёного флуоресцентного белка (GFP) и устойчивости к пуромицину. Для отбора положительных клонов прибегали к помощи сортировки GFP+ клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSAria III. Полученную клеточную линию Vero E6\_TK поддерживали на среде, содержащей пуромицин в концентрации 6 мкг/мл, и использовали для дальнейших экспериментов.

**Проверка способности аналогов нуклеозидов фосфорилироваться в клетках Vero E6\_TK.** За сутки до тестирования клетки Vero E6 или Vero E6\_TK рассеивали в 48-луночный планшет. Клетки трансдуцировали VSV-G-псевдотипированным репликативно-некомпетентным лентивирусом на основе генома ВИЧ-1 в присутствии зидовудина (3'-азидо-3'-дезокситимидин) или ацикловира (2-амино-9-((2-гидроксиэтокси)метил)-1,9-дигидро-6Н-пурин-6-он) в концентрациях 0–50 мкМ при 1%-ной концентрации DMSO. Через 24 ч после трансдукции в клетках измеряли уровень экспрессии люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) с помощью набора Luciferase Assay System («Promega», США). Люминесцентный сигнал детектировали с помощью прибора BioTek Synergy H1 Multimode Reader («Agilent», США).

**Тестирование низкомолекулярных соединений с использованием клеточной системы для изучения репликации SARS-CoV-2.** Для тестирования использовали: аденоzin-N1-оксид [16], 3'-О-метиладеноzin [17], 2'-амино-2'-дезоксиаденоzin [18], LN-140 [19], Z876 [20], молнуниправир, ацикловир и ставудин (2',3'-дидегидро-2',3'-дидеокситимидин) – коммерческие препараты.

За сутки до тестирования клетки линии Vero E6 или Vero E6\_TK рассеивали в лунки 48-луночного планшета. На следующий день проводили трансфекцию клеток конструкцией полноразмерного репликона SARS-CoV-2 с использованием реагента Lipofectamine 3000 («Thermo Fisher Scientific»), согласно протоколу производителя. Через 6 ч после трансфекции исходную среду заменяли на среду, содержащую тестируемое соединение в концентрациях 0–50 мкМ при концентрации DMSO 1%. Эффективность ингибирования оценивали по изменению сигнала люминесценции от люцифераз рениллы и светлячка. Измерение люминесцентного сигнала проводили через 48 ч после трансфекции.

**Определение активности люцифераз рениллы и светлячка.** Активность люциферазы рениллы (*Renilla reniformis*) и люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) измеряли с помощью набора Dual-Luciferase Reporter Assay System («Promega»). Люминесцентный сигнал детектировали с помощью прибора BioTek Synergy H1 Multimode Reader («Agilent»).

**MTT-тест.** За сутки до тестирования клетки линии Vero E6 или Vero E6\_TK рассеивали в лунки 96-луночного планшета. На следующий день культуральную среду заменяли на среду, содержащую тестируемое соединение в концентрациях 0–50 мкМ при концентрации DMSO 1%. Через 48 ч к клеткам добавляли 10 мкЛ MTT-реагента в концентрации 5 мг/мл. Далее, планшет помещали на 2 ч в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Через два часа от клеток

отбирали среду и добавляли 100 мкл 100%-ного DMSO. Затем, после полного растворения выпавших кристаллов, измеряли поглощение полученного раствора с помощью прибора BioTek Synergy H1 Multimode Reader («Agilent») при длине волн 590 нм.

**Графическое представление результатов.** Результаты обсчитывали в ПО Excel. Для визуализации результатов съёмки люцифераз и MTT-теста использовалось ПО GraphPad Prism 9.5.1.

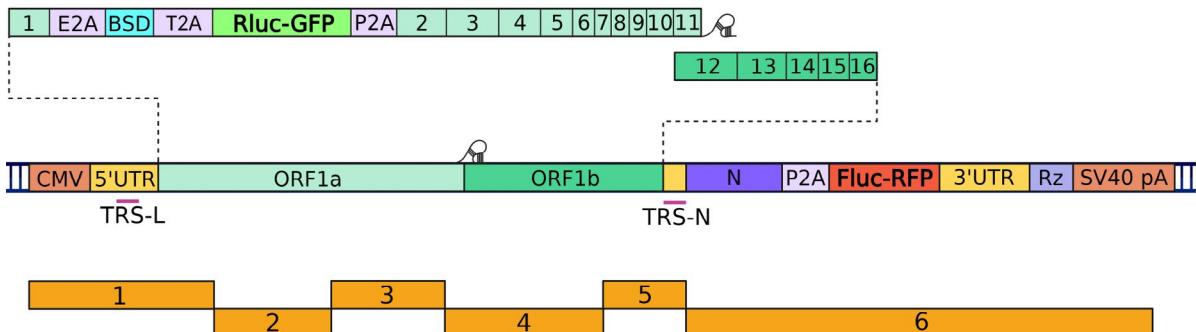
**Статистический анализ данных.** Все эксперименты проводили минимум в трёх биологических повторах. Для сравнения двух групп использовали парный Т-тест, предполагая нормальное распределение данных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

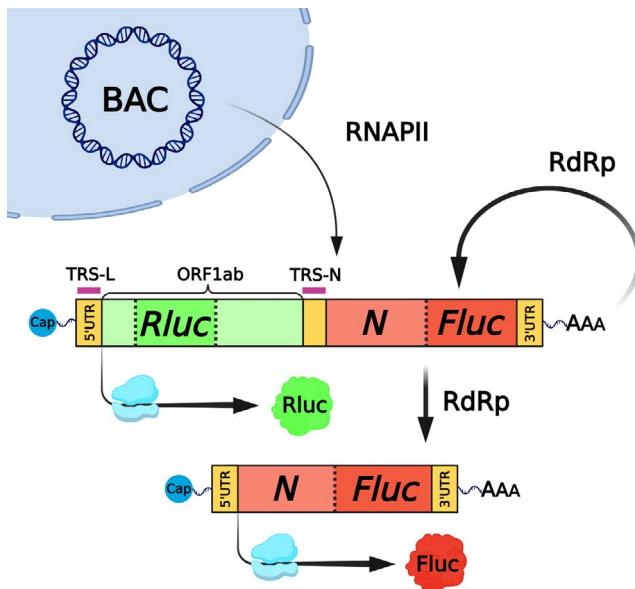
**Создание полноразмерного репликона SARS-CoV-2 с двумя блоками репортерных генов.** Для создания полноразмерного репликона, кодирующего два блока репортерных генов, предложена следующая схема (рис. 1). Последовательность модифицированного генома SARS-CoV-2, не содержащего генов структурных белков S, E и M, начинающаяся с 5'-UTR, находится под контролем промотора CMV. Остальные гены коронавируса и последовательности репортеров flankированы классическими регуляторными областями SARS-CoV-2: 5'-UTR и 3'-UTR. За 5'-UTR следует последовательность полипротеина ORF1ab, включающая первый блок репортерных генов, размещённый между неструктурными белками (NSP) NSP1 и NSP2. Данный блок включает в себя ген устойчивости к бластицидину и ген, кодирующий два слитых белка, Rluc (люцифераза *Renilla reniformis*) и GFP, которые отделены от последовательностей неструктурных белков SARS-CoV-2 пептидами P2A, T2A и E2A, вызывающими пропуск образования

пептидной связи в процессе трансляции [21]. Последние необходимы для правильного синтеза как NSP1 и NSP2, так и белков первого репортерного блока. Сразу после последовательности полипротеина ORF1ab следует последовательность TRS-N и ген белка N. Несмотря на то что в геноме вируса после ORF1ab находится последовательность TRS-S и ген белка S, в литературе показано, что размещение на этом месте гена белка N не нарушает процесс эффективного образования субгеномных РНК [22]. За геном белка N размещается последовательность второго репортерного блока, представленная геном слитых белков Fluc (люцифераза светлячка *Photinus pyralis*) и RFP (красный флуоресцентный белок). Второй блок также отделён от гена белка N последовательностью пептида P2A. После гена белков Fluc-RFP находится последовательности 3'-UTR, рибозим вируса гепатита D (Rz) и сигнал полиаденилирования SV40 poly(A). Наличие рибозима, который катализирует разрыв цепи РНК между последним нуклеотидом генома коронавируса и первым нуклеотидом рибозима, позволяет получить РНК, содержащую 3'-концевую последовательность, полностью идентичную вирусной, что важно для успешной репликации и транскрипции вирусной РНК [23]. Наличие двух блоков репортерных генов позволяет не только оценивать уровень ингибиции RdRp и эффективность протекания прерывистой транскрипции, но и осуществлять поиск клеточных факторов, участвующих в процессе репликации и транскрипции SARS-CoV-2 (рис. 2).

Для получения описанного выше репликона был использован метод клонирования Golden Gate. Предварительно была проведена ПЦР с коронавирусной кДНК, а также с генов необходимых репортерных белков, и были получены 6 фрагментов для сборки полноразмерного репликона (рис. 1). Эти фрагменты, каждый по отдельности, были клонированы в промежуточный вектор pJET1.2.



**Рис. 1.** Модель полноразмерного репликона SARS-CoV-2 с двумя блоками репортерных генов. Первый блок репортерных генов Rluc-GFP расположен внутри ORF1a под контролем промотора CMV, второй блок Fluc-RFP расположен между геном белка N и 3'-UTR и может транскрибироваться только вирусной RdRp с помощью механизма прерывистой транскрипции. Ниже приведена схема 6 фрагментов кДНК вируса, из которых производилась сборка полноразмерного репликона в плазмиду pBAC\_lacZ с использованием Golden Gate-подхода



**Рис. 2.** Схема функционирования репликона. Экспрессия первого репортера (Rluc) может происходить как за счёт транскрипции с векторной ДНК (BAC) клеточной РНК-полимеразой II (RNAPII), так и за счёт репликации вирусной РНК под действием RdRp. Второй репортер (Fluc) может транскрибироваться только вирусной RdRp через механизм прерывистой транскрипции

Сборка производилась с использованием 7 фрагментов, т.к., помимо описанных 6 фрагментов кДНК вируса, в качестве вектора использовалась плазмида pBAC\_lacZ.

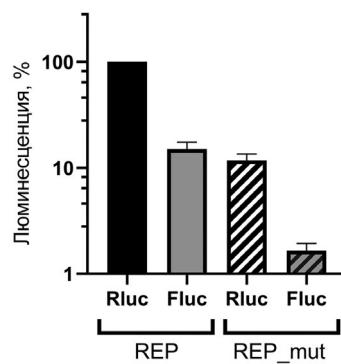
В качестве вектора была выбрана ВАС, поскольку такой тип вектора позволяет нарабатывать большие генетические конструкции, содержащие токсичные для *E. coli* последовательности. В процессе получения полноразмерного репликона в бактериальных клетках мы столкнулись с проблемой плохой наработки конструкции в штамме *E. coli* XL1 Blue, что, вероятно, было связано как с недостаточно эффективной трансформацией клеток ввиду большого размера конструкции, так и с крайне низкой копийностью ВАС. Для решения этой проблемы был использован специальный штамм *E. coli* TransforMax EPI300, позволяющий не только нарабатывать большие генетические конструкции, но и контролировать число копий вектора на клетку с помощью низкомолекулярных индукторов репликации ВАС. В геноме данного штамма содержится индуцибелльный мутантный ген *trfA*, необходимый для инициации увеличения числа копий вектора ДНК с ориджина репликации oriV в присутствии индуктора L-арabinозы [24]. Полученную конструкцию тестировали с помощью аналитической ПЦР с использованием праймеров к концам соединяемых фрагментов, затем последовательность подтверждалась секвенированием. В результате была

получена конструкция, соответствующая полноразмерному репликону REP, представленному на рис. 1.

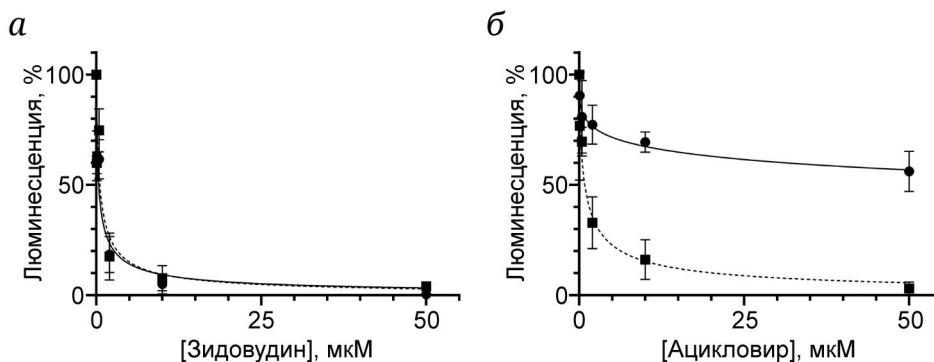
Помимо этого, для подтверждения функциональной активности полученного нами репликона REP мы решили создать аналогичную конструкцию с каталитически неактивной RdRp (далее REP\_mut). Для этого в последовательности полимеразной субъединицы (NSP12) RdRp в составе фрагмента 4 (рис. 1) два аминокислотных остатка аспарагиновой кислоты каталитической триады активного центра NSP12 были заменены на остатки аланина: D760A и D761A. Потеря каталитической активности RdRp в результате этих замен была показана ранее [25]. Наличие мутаций было подтверждено секвенированием ПЦР-продукта соответствующего участка гена субъединицы NSP12.

Для корректного сопоставления результатов тестирования потенциальных ингибиторов в предлагаемой системе с данными, полученными в других исследованиях на клетках, инфицированных SARS-CoV-2, была выбрана клеточная линия Vero E6. Эта линия является наиболее широко используемой в работах по изучению различных вирусов из-за отсутствия интерферонового ответа в клетках при заражении вирусом [26, 27].

Репортерные конструкции REP и REP\_mut доставлялись в клетки с помощью липофекции, а спустя 48 ч измерялся уровень экспрессии первой (Rluc) и второй (Fluc) люцифераз (рис. 3). Данная временная точка была выбрана, поскольку в предварительных экспериментах через 24 ч сигнал люминесценции был существенно ниже, чем через 48 ч. При этом уровень сигнала через 72 ч не изменялся по сравнению с 48 ч (данные не представлены). Как и ожидалось, уровень первой люциферазы значительно превосходил уровень второй люциферазы, которая не могла синтезироваться клеточными РНК-полимеразами,



**Рис. 3.** Сравнение уровней экспрессии люцифераз рениллы (Rluc) и светлячка (Fluc) в клетках Vero E6, трансфицированных репликонами REP и REP\_mut. Представлены средние значения по результатам не менее 3 экспериментов ± стандартное отклонение



**Рис. 4.** Проверка ингибирующей активности зидовудина (*а*) и ацикловира (*б*) в клеточных линиях Vero E6 (сплошная линия) и Vero E6\_TK (пунктирная линия), трансдуцированных репликативно-некомпетентным вектором на основе ВИЧ-1, кодирующим репортерный белок – люциферазу светлячка. Представлены средние значения по результатам не менее 3 экспериментов ± стандартное отклонение

а только RdRp SARS-CoV-2. Важно также, что уровень экспрессии обеих люцифераз при трансфекции репортером REP\_mut с каталитически неактивной RdRp был значительно ниже, чем в случае репортера REP с полностью функциональной RdRp. Уровень экспрессии второй люциферазы в случае мутантного репортера был ненамного выше фона, что однозначно указывало на отсутствие транскрипции Fluc клеточными РНК-полимеразами.

Сравнение уровней экспрессии люцифераз из обоих репортерных блоков однозначно показало, что закодированная в репликоне REP полимераза функционально активна и способна осуществлять как репликацию, так и прерывистую транскрипцию вирусной РНК, продуктами которых являются люциферазы Rluc и Fluc соответственно.

**Оптимизация безопасной клеточной системы для тестирования потенциальных нуклеозидных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2.** Нуклеозидные ингибиторы – соединения, имеющие структурное сходство с природными нуклеозидами, которые воспринимаются вирусным репликативным аппаратом как субстрат для синтеза нуклеиновой кислоты. Для встраивания в растущую цепь нуклеиновой кислоты эти соединения должны быть трижды фосфорилированы клеточными киназами с образованием соответствующих нуклеозид-5'-трифосфатов. Если второй и третий акт фосфорилирования происходит под действием клеточных ферментов независимо от структуры нуклеозида, то первый этап фосфорилирования является определяющим для активации соединения и строго зависит от способности клеточных нуклеозидкиназ распознавать структуры ингибиторов. Спектр соединений, которые являются субстратами для клеточных нуклеозидкиназ, ограничен, поэтому многие нуклеозидные ингибиторы, применяемые в медицинской практике, используют в виде депо-форм – модифицированных

нуклеозидов, содержащих модифицированный определённым образом первый фосфат. Однако из-за увеличения стоимости синтеза создание депо-форм для всех соединений, используемых для скрининга в качестве потенциальных ингибиторов, является нецелесообразным. Вместе с тем при непосредственном тестировании модифицированных нуклеозидов в качестве ингибиторов есть риск ложноотрицательных результатов, что сужает спектр потенциальных ингибиторов.

Для решения проблемы «первого фосфорилирования» нами была создана клеточная линия, в геноме которой содержится ген тимидинкиназы вируса простого герпеса человека первого типа (ТК). Этот фермент обладает относительно низкой субстратной специфичностью и может фосфорилировать достаточно широкий набор модифицированных нуклеозидов [28].

Для встраивания гена ТК в геном клеток Vero E6 была проведена трансдукция клеток лентивирусным вектором, в котором закодирован ген ТК, а также селективные маркеры – ген устойчивости к пуромицину и GFP. После трансдукции для очистки ТК-позитивных клонов клетки подвергали сортировку по наличию флуоресценции GFP, слитого с ТК. В результате были получены клетки Vero E6\_TK, стабильно экспрессирующие ТК.

Способность аналогов нуклеозидов фосфорилироваться в полученных клетках проверяли с помощью функционального теста. Для этого клетки линии Vero E6 и Vero E6\_TK трансдуцировали VSV-G-псевдотипированным репликативно-некомпетентным лентивирусным вектором на основе ВИЧ-1 (модель ранних этапов репликации ВИЧ-1), кодирующим люциферазу светлячка под контролем CMV-промотора, в присутствии различных концентраций известного нуклеозидного ингибитора ВИЧ-1 – зидовудина (3'-азидо-3'-дезокситимидин) или ацикловира (2-амино-9-(2-гидроксиэтокси)метил)-1,9-дигидро-6Н-пурин-6-он), который

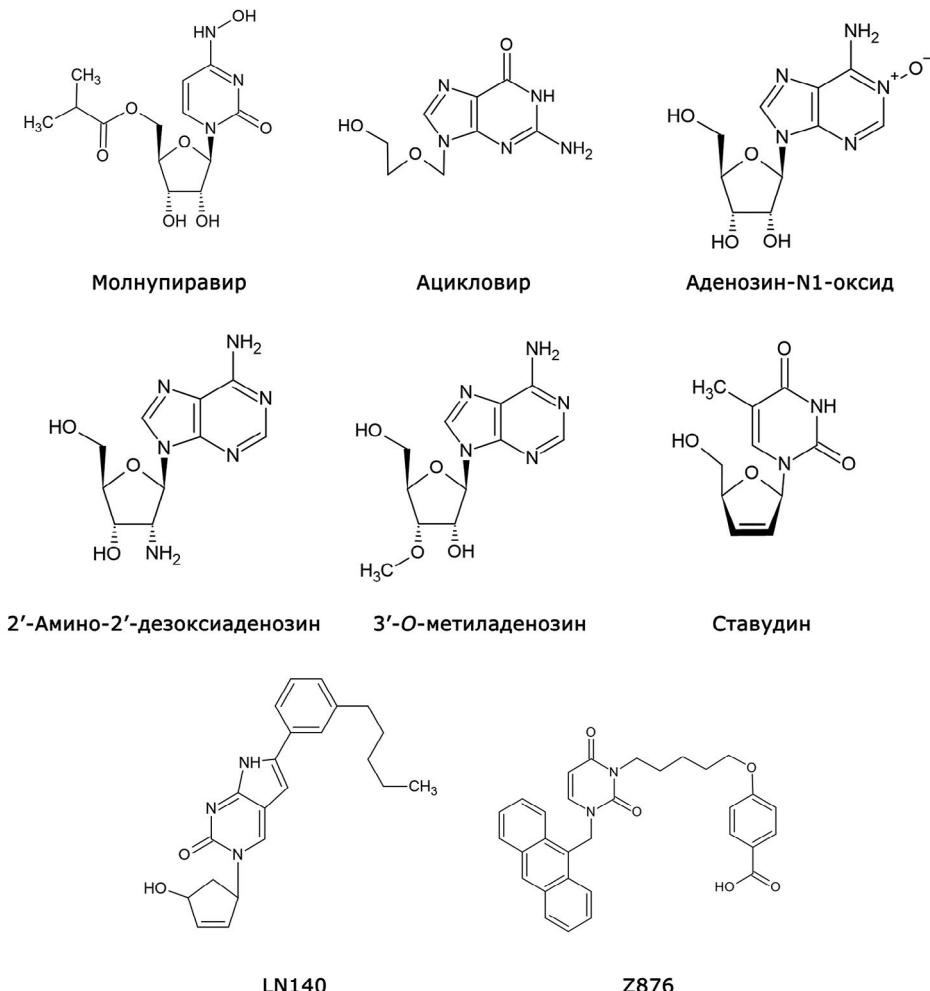
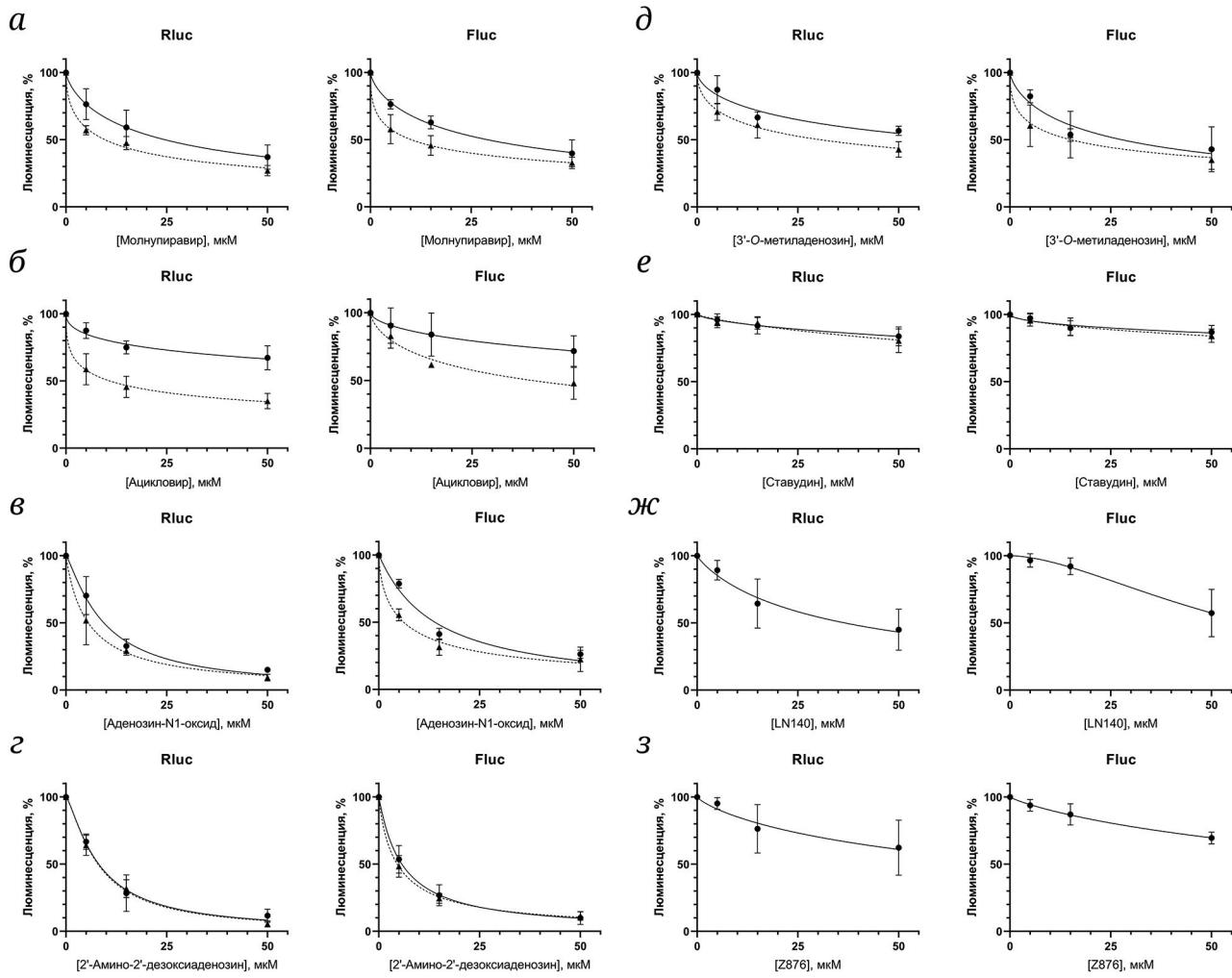


Рис. 5. Структуры исследованных соединений

fosфорилируется только ТК вируса герпеса, но не клеточными киназами, что не позволяет ему проявлять антиретровирусную активность в отношении ВИЧ-1 в обычных клетках. Через 24 ч анализировали уровень люминесценции, который коррелирует с эффективностью протекания ранних этапов репликации ВИЧ-1 (рис. 4). Зидовудин был практически одинаково активен в обеих клеточных линиях ( $IC_{50}$  составили порядка 0,4 мкМ в обоих случаях), в то время как ацикловир, практически неактивный в клетках Vero E6, эффективно ингибиравал экспрессию лентивирусного вектора в клетках Vero E6\_TK ( $IC_{50}$  составили более 100 мкМ и 0,8 мкМ соответственно). Полученные данные подтвердили, что нам удалось получить линию, стабильно экспрессирующую ТК. Отсутствие различий в значениях  $IC_{50}$  для зидовудина можно объяснить тем, что данный нуклеозид в клетках Vero E6 достаточно эффективно фосфорилируется клеточными киназами, хотя в других линиях клеток его активность существенно возрасала в присутствии ТК вируса простого герпеса [28].

С учётом полученных результатов тестирование потенциальных нуклеозидных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2 проводилось нами не только на клеточной линии Vero E6, но и на полученной линии Vero E6\_TK.

**Тестирование потенциальных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2 в безопасной клеточной системе с использованием сконструированного полноразмерного репликона.** Для данного исследования была выбрана серия из 6 модифицированных нуклеозидов – молнуриравир (5'-дезокси-5'-изобутирил-N4-гидроксцитидин), ацикловир (2-амино-9-((2-гидроксиглюкози)метил)-1,9-дигидро-6Н-пурин-6-он), ставудин (2',3'-дидегидро-2',3'-дидеокситимидин), 2'-амино-2'-дезоксиаденозин, аденоzin-N1-оксид, 3'-O-метиладеноzin – и двух соединений ненуклеозидной природы: LN140, Z876 (рис. 5). В первую очередь была проверена цитотоксичность всех соединений с помощью MTT-теста, который показал, что исследуемые соединения не оказывают значительного цитотоксического действия на клетки Vero E6 и Vero E6\_TK в исследованных концентрациях до 50 мкМ.



**Рис. 6.** Результаты тестирования способности соединений – молнупиравира (а), ацикловира (б), 2'-аденозин-N1-оксида (в), амино-2'-дезоксиаденозина (г), 3'-O-метиладенозина (д), ставудина (е), LN140 (ж) и Z876 (з) – ингибировать активность RdRp SARS-CoV-2 при использовании репликона REP в клеточных линиях Vero E6 (сплошная линия) и Vero E6\_TK (пунктирная линия). Представлены средние значения по результатам не менее 4 экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение

Анализ способности модифицированных нуклеозидов ингибировать репликацию и транскрипцию с репликона REP проверяли на обеих клеточных линиях, Vero E6 и Vero E6\_TK, а соединений LN140, Z876 – только на клетках Vero E6, поскольку они могли выступать только в качестве ненуклеозидных ингибиторов полимеразы, для которых фосфорилирование не требуется. Полученные результаты представлены на рис. 6 и в табл. 1.

Молнупиравир, который является модифицированным вариантом N4-гидроксицитидина и используется для лечения пациентов, инфицированных SARS-CoV-2 [29], был использован в качестве контроля пригодности сконструированного нами репликона для скрининга потенциальных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2. В нашей системе молнупиравир оказался несколько менее эффективен (табл. 1), чем в тестах на клетках, инфи-

цированных непосредственно SARS-CoV-2: показатель IC<sub>50</sub> варьировал между 0,3 мкМ и 3,5 мкМ в зависимости от использованного изолята вируса и культуры клеток [29]. Тем не менее молнупиравир практически одинаково ингибировал репортевые белки и из первого (Rluc), и из второго (Fluc) блоков (табл. 1), т.е. он ингибировал активность RdRp и в реакции репликации вирусного генома, и в прерывистой транскрипции, результатом которой является экспрессия люциферазы Fluc. Надо также отметить, что в клетках Vero E6\_TK ингибирование происходило более эффективно (рис. 6, а), что подтверждает активность молнупиравира как нуклеозидного ингибитора RdRp, для которого необходимо фосфорилирование и превращение в нуклеозидтрифосфат.

Ацикловир хорошо известен как ингибитор герпесвирусов [30, 31] и никогда не применялся для подавления SARS-CoV-2. И действительно,

**Таблица 1.** Ингибирующая активность исследуемых соединений ( $IC_{50}$ ) в реакциях репликации вирусной РНК (экспрессия Rluc) и прерывистой транскрипции (экспрессия Fluc) при использовании репликона REP в клеточных линиях Vero E6 и Vero E6\_TK

Название	Значения $IC_{50}^*$ , мкМ			
	Rluc		Fluc	
	Vero E6	Vero E6_TK	Vero E6	Vero E6_TK
Молнунировир	25 ± 6	10 ± 2	29 ± 7	10 ± 3
Ацикловир	> 100	40 ± 10	> 100	11 ± 3
Аденозин-N1-оксид	9 ± 3	6 ± 2	14 ± 5	6 ± 2
2'-Амино-2'-дезоксиаденозин	8 ± 2	8 ± 2	6 ± 2	5 ± 1
3'-O-метиладенозин	70 ± 20	31 ± 9	28 ± 8	15 ± 4
Ставудин	> 100	> 100	> 100	> 100
LN140	37 ± 11	н.д.**	> 100	н.д.
Z876	45 ± 13	н.д.	> 100	н.д.

\* Представлены средние значения по результатам не менее 4 экспериментов ± стандартное отклонение.

\*\* н.д. – нет данных.

в клетках Vero E6 он был практически не активен в отношении репликона REP. Однако в клетках Vero E6\_TK он оказался способен ингибировать RdRp SARS-CoV-2 (рис. 6, б), хотя и значительно менее эффективно, чем молнунировир (табл. 1).

Аденозин-N1-оксид и 2'-амино-2'-дезоксиаденозин ранее никогда не тестировались в качестве ингибиторов SARS-CoV-2, но оба оказались активными ингибиторами вирусной RdRp (рис. 6, в, г соответственно). Они практически одинаково ингибировали экспрессию обеих репортерных люцифераз (табл. 1). Интересно при этом, что наличие в клетках ТК несколько усиливало ингибиторное действие аденоzin-N1-оксида, но при этом никак не влияло на активность 2'-амино-2'-дезоксиаденозина.

3'-O-метиладенозин также оказался способен ингибировать RdRp SARS-CoV-2 (рис. 6, д), однако эффективность его ингибирующего действия оказалась ниже, чем у двух предыдущих аналогов аденоzина. Надо отметить, что 3'-O-метиладенозин сильнее влиял на эффективность прерывистой транскрипции, чем репликации, поскольку в его присутствии уровень люминесценции Fluc снижался сильнее, чем для Rluc (табл. 1). Кроме того, в клетках Vero E6\_TK ингибирование под действием 3'-O-метиладенозина происходило более эффективно, что указывает на его действие как нуклеозидного ингибитора RdRp.

В отличие от трёх предыдущих соединений ставудин является производным тимицина, способным эффективно ингибировать РНК-зависимую ДНК-полимеразу ВИЧ-1 [32]. Однако ставудин

оказался неспособен достоверно снижать уровень ни одной из люцифераз (рис. 6, е). Исследование на клетках Vero E6\_TK также не позволило детектировать его ингибирующую активность.

Соединения LN140 и Z876 не являются нуклеозидами и не могут фосфорилироваться нуклеозидкиназами, поэтому их тестировали только на линии Vero E6. Оба соединения оказались заметно более эффективными ингибиторами экспрессии первой люциферазы, Rluc (рис. 6, ж и з соответственно). Надо отметить, что ингибирующая активность LN140 при использовании репликона оказалась сравнима с его способностью ингибировать гибель клеток Vero, индуцированную заражением штаммом PIK35 вируса SARS-CoV-2 [33]. Этот результат дополнительно подтверждает функциональную активность нашего репликона и его применимость для скрининга ингибиторов RdRp SARS-CoV-2.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пандемия инфекционного заболевания COVID-19, которое вызывается бетакоронавирусом SARS-CoV-2, сделала крайне актуальной разработку простых и безопасных клеточных систем для изучения патогенеза этой вирусной инфекции, позволяющих манипулировать геномом вируса, а также проводить высокопроизводительный скрининг его потенциальных ингибиторов. В случае коронавирусов создание таких систем осложняется крайне большим размером вирусной РНК,

составляющим в зависимости от вируса 26–32 тысяч оснований [34]. Тем не менее развитие методов молекулярного клонирования позволило работать с кДНК коронавирусов и собирать полноразмерные вирусные кДНК из отдельных фрагментов. Полученные таким образом генетические системы сыграли значительную роль в содействии разработке вакцин против SARS-CoV-2 и терапевтических средств первого поколения.

Удобным вариантом системы для скрининга противовирусных препаратов является полноразмерная кДНК вируса, клонированная в ВАС. Векторы на основе ВАС подходят для клонирования фрагментов ДНК больших размеров, до 300 тысяч п.н. [35]. При размножении в клетках *E. coli* сохраняется только одна или две копии ВАС на клетку, что позволяет минимизировать токсичность, связанную с присутствием последовательностей вирусного генома [36]. После трансфекции эукариотических клеток ВАС-вектором, содержащим полноразмерную кДНК вируса, клеточной РНК-полимеразой синтезируется вирусная РНК и собираются инфекционные вирусные частицы.

Поскольку нам необходимо было создать безопасную клеточную систему, которая позволила бы проводить скрининг ингибиторов SARS-CoV-2, а также исследовать отдельные этапы репликации и транскрипции вирусной РНК, для клонирования в ВАС-вектор была использована не полноразмерная кДНК, а кДНК модифицированного генома SARS-CoV-2, не содержащего генов структурных белков S, E и M (рис. 1). Помимо этого, впервые в состав репликона был вставлен не один, а два блока репортерных генов. Первый блок, представленный люциферазой *Renilla reniformis* и зелёным флуоресцентным белком (Rluc-GFP), находится под контролем CMV-промотора. Второй блок репортерных генов представлен люциферазой светлячка *Photinus pyralis* и красным флуоресцентным белком (Fluc-RFP) и находится после последовательности, регулирующей прерывистую транскрипцию (transcription regulation sequence, TRS), характерную для семейства *Coronaviridae*. При синтезе (−)-цепи РНК РНК-полимерный комплекс диссоциирует от (+)-РНК-матрицы в районе TRS, связывается в области 5'-UTR и продолжает синтез РНК. В некоторых случаях «перескок» РНК-полимеразного комплекса возможен и при синтезе (+)-РНК-цепи; в этом случае комплекс диссоциирует от TRS-последовательности, расположенной в 5'-UTR, и вновь гибридизуется с TRS перед началом белок-кодирующей последовательности. Полученные в процессе такой прерывистой транскрипции укороченные РНК служат матрицей для последующей трансляции неструктурных белков SARS-CoV-2 [5]. В сконструированном нами репликоне белки второго блока репортеров

должны синтезироваться именно с такой укороченной РНК, которая образуется в результате работы вирусной RdRp. В то же время экспрессия первого репортера, который находится под контролем CMV-промотора, может происходить как в результате репликации вирусной РНК под действием RdRp самого вируса, так и в результате транскрипции под действием клеточной РНК-полимеразы II (рис. 2). Соответственно, уровень экспрессии люциферазы Rluc из первого репортерного блока должен быть выше уровня экспрессии люциферазы Fluc из второго блока. Именно этот результат был зафиксирован после трансфекции клеток Vero E6 сконструированным репликоном REP (рис. 3). Тем не менее для дополнительной проверки функциональной активности закодированной в репликоне вирусной RdRp нами был создан мутантный вариант репликона, REP\_mut, в котором в активном центре полимеразной субъединицы RdRp (NSP12) произведены замены аминокислот (D760A, D761A) методом сайт-направленного мутагенеза. Указанные замены, согласно литературным данным [25], приводят к потере каталитической активности RdRp. Трансфекция клеток Vero E6 репликоном REP\_mut показала, что в этом случае экспрессия первой люциферазы, Rluc, существенно снижена, а второй, Fluc – практически отсутствует (рис. 3). Эти данные подтвердили функциональную активность сконструированного репликона REP и позволили использовать его для скрининга потенциальных ингибиторов полимеразы SARS-CoV-2. При этом проверялась способность исследуемых соединений подавлять экспрессию как первой, так и, главное, второй репортерной полимеразы – Fluc, которая является продуктом прерывистой транскрипции, осуществляющей вирусной полимеразой.

Существует два типа ингибиторов вирусных полимераз: нуклеозидные и ненуклеозидные [37]. Нуклеозидные ингибиторы – соединения, имеющие структурное сходство с природными нуклеозидами, которые воспринимаются вирусным репликативным аппаратом как субстрат для синтеза нукleinовой кислоты – включаются в растущую цепь нукleinовой кислоты и нарушают репликацию вируса. Для того чтобы полимераза могла встроить нуклеозидные ингибиторы в растущую цепь нукleinовой кислоты, они должны быть предварительно превращены в нуклеозид-5'-трифосфаты в результате тройного фосфорилирования клеточными ферментами.

Ненуклеозидные ингибиторы обычно действуют как аллостерические ингибиторы, и их связывание вызывает структурные изменения активного центра фермента, приводящие к потере его ферментативной активности. Для проявления ингибирующего действия никакой

дополнительной модификации ненуклеозидным ингибиторам не требуется.

Мы использовали соединения как нуклеозидной, так и ненуклеозидной природы для проверки их способности ингибировать функционирование закодированной в репликоне REP вирусной полимеразы. В качестве контрольного нуклеозидного ингибитора использовали молнуниравир, встраивание которого в РНК приводит к ошибкам полимеразы при её повторном прохождении через сайт включения ингибитора, в результате чего происходит изменение нуклеотидной последовательности генома вируса [29]. Учитывая, что модифицированные нуклеозиды могут оказаться плохими субстратами для клеточных нуклеозидкиназ, осуществляющих первое фосфорилирование, мы сконструировали клеточную линию Vero E6\_TK, в геноме которой содержится ген ТК. Ранее было показано, что наличие ТК в клетке повышает способность 3'-азидотимидина ингибировать репликацию ВИЧ-1 [28].

Молнуниравир практически одинаково ингибирал экспрессию обеих люцифераз, при этом в клетках Vero E6\_TK ингибирование происходило более эффективно, чем в клетках Vero E6 (рис. 6, а). Это дополнительно подтвердило активность молнуниравира как нуклеозидного ингибитора RdRp, для которого необходимо фосфорилирование. Убедившись в том, что с помощью репликона REP и клеточной линии Vero E6\_TK можно не только проверить ингибирующую действие соединений, но и достоверно показать механизм их действия как нуклеозидных ингибиторов полимеразы, мы проверили активность нескольких модифицированных нуклеозидов: ацикловира, 2'-амино-2'-дезоксиаденозина, аденоцин-N1-оксида, 3'-О-метиладенозина и ставудина (2',3'-дидегидро-2',3'-дидеокситимидина).

Ацикловир является известным ингибитором герпесвирусов, однако в присутствии ТК он способен также ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ-1 [38]. Мы впервые показали, что в клетках Vero E6\_TK ацикловир способен ингибировать RdRp SARS-CoV-2 (рис. 6, б), хотя и гораздо менее эффективно, чем молнуниравир (табл. 1). В то же время в клетках Vero E6 ацикловир не проявлял ингибирующей активности.

Из всех модифицированных аналогов аденоцина – 2'-амино-2'-дезоксиаденозина, аденоцин-N1-оксида и 3'-О-метиладенозина – наиболее эффективным ингибитором экспрессии обеих люцифераз оказался 2'-амино-2'-дезоксиаденозин (табл. 1). Интересно при этом, что его ингибирующее действие не зависело от наличия ТК в клетках. Возможно, наличие 2'-аминогруппы не препятствует узнаванию и эффективному фосфорилированию этого нуклеозида клеточной аденоцинкиназой.

Аденозин-N1-оксид и 3'-О-метиладенозин также оказались ингибиторами RdRp SARS-CoV-2, но их ингибирующее действие сильнее проявлялось в клетках Vero E6\_TK (табл. 1). Отметим также, что ингибирующая активность 3'-О-метиладенозина была заметно ниже, чем у двух других аналогов аденоцина. Способность ингибировать REP для всех исследованных нами производных аденоцина была показана впервые. Ранее *in vitro* изучалась способность ингибировать действие полимеразного комплекса, состоящего из полимеразной субъединицы NSP12 и субъединиц NSP7 и NSP8, для 5'-трифосфатов 2'-амино-2'-дезоксиуридина и 3'-О-метилуридина, т.е. аналогов уридурина, содержащих такие же модификации, как у исследованных нами аналогов аденоцина. При этом было обнаружено, что 2'-амино-2'-дезоксиуридин не является ингибитором полимеразы, а 5'-трифосфат 3'-О-метилуридина эффективно встраивается в РНК и обрывает рост цепи [39].

Ставудин известен как эффективный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ-1 [40]. В нашем исследовании он был выбран, поскольку в *in vitro* экспериментах по ингибированию полимеразного комплекса, состоящего из полимеразной субъединицы NSP12 и субъединиц NSP7 и NSP8, 5'-трифосфат ставудина эффективно терминировал синтез новой цепи РНК [39]. Однако в экспериментах на разработанной нами клеточной системе ставудин не проявил ингибирующее действие. Очевидно, это связано с различиями использованных систем для тестирования ингибиторов, из-за которых данные, полученные на рекомбинантных белках и в клеточных системах, не всегда совпадают.

В качестве потенциальных ненуклеозидных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2 мы исследовали соединения LN140 и Z876, которые ранее продемонстрировали антивирусную активность на клетках Vero E6, инфицированных SARS-CoV-2 [20, 41]. Для соединения Z876 было также с помощью докинга показано, что оно может связываться с гидрофобной областью RdRp этого вируса, и экспериментально продемонстрирована его способность ингибировать полимеразный комплекс, состоящий из полимеразной субъединицы NSP12 и субъединиц NSP7 и NSP8. Эти результаты позволили авторам предположить, что Z876 является ненуклеозидным ингибитором вирусной полимеразы. Однако если IC<sub>50</sub> для Z876 в клетках Vero E6 по отношению к различным штаммам SARS-CoV-2 варьировалась от 20 до 30 мкМ, то его IC<sub>50</sub> по отношению к полимеразному комплексу была больше 50 мкМ [20]. Мы решили проверить, являются ли соединения LN140 и Z876 ненуклеозидными ингибиторами RdRp SARS-CoV-2 на сконструированном нами репликоне. Как LN140, так и Z876 оказались способны ингибировать экспрессию

только первой люциферазы Rluc (табл. 1). При этом ингибирующая активность обоих соединений была сравнима с активностью, приведённой в опубликованных ранее работах: для LN140 IC<sub>50</sub> 37 ± 11 (табл. 1) и 21 ± 6 [33], для Z876 IC<sub>50</sub> 45 ± 13 (табл. 1) и 29,33 для штамма Дельта [20]. Учитывая, что Rluc образуется в результате трансляции с РНК, которая может синтезироваться как вирусной RdRp, так и клеточной РНК-полимеразой II, мы не можем однозначно утверждать, что эти соединения действительно являются ненуклеозидными ингибиторами RdRp SARS-CoV-2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведённого исследования нами была получена улучшенная безвирусная репортерная система для поиска нуклеозидных и ненуклеозидных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2. Для облегчения поиска нуклеозидных ингибиторов RdRp была создана клеточная линия Vero E6\_TK, экспрессирующая тимидинкиназу вируса простого герпеса, способную осуществить первую стадию фосфорилирования различным образом модифицированных нуклеозидов в клетке. Созданная система была использована для проверки способности ряда соединений ингибировать каталитическую активность RdRp SARS-CoV-2. В результате проведённого тестирования была впервые обнаружена антивирусная активность у 2'-амино-2'-дезоксиаденозина и аденоzin-N1-оксида, превышающая активность используемого для лечения COVID-19 молнунипиравира.

**Вклад авторов.** Концепция – А.Н.А., М.Б.Г., С.П.К., С.Н.К. и А.Л.Х.; методология – А.Н.А., С.О.Г., М.Б.Г., С.П.К. и А.Л.Х.; проведение экспериментов – Л.А.А., А.Н.А., С.О.Г., Е.С.М., М.С.Н., С.П.К., А.Л.Х., А.А.Ш. и М.В.Я.; анализ данных – А.Н.А., С.П.К. и А.А.Ш.; научное руководство – М.Б.Г., С.Н.К. и А.Л.Х.; написание текста – А.Н.А., М.Б.Г., С.П.К., А.Л.Х. и А.А.Ш.; редактирование текста – А.Н.А., М.Б.Г., С.П.К., С.Н.К. и А.Л.Х.; привлечение финансирования – С.Н.К. Все авторы прочитали текст статьи и согласны на её публикацию.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации («Аналоги компонентов нуклеиновых кислот как потенциальные ингибиторы коронавирусов»).

**Благодарности.** Лентивирусный вектор, кодирующий тимидинкиназу вируса простого герпеса первого типа, был любезно предоставлен к.б.н., н.с. Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН И.В. Алексеенко. Отбор клеток Vero E6\_TK проводили под руководством д.х.н., проф. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова М.П. Рубцовой с помощью сортировки GFP+ клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSaria III, приобретённом по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова ПНР 5.13.

**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. Amani, B., and Amani, B. (2023) Efficacy and safety of nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid) for COVID-19: A rapid review and meta-analysis, *J. Med. Virol.*, **95**, e28441, <https://doi.org/10.1002/jmv.28441>.
2. Sola, I., Almazan, F., Zuniga, S., and Enjuanes, L. (2015) Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses, *Annu. Rev. Virol.*, **2**, 265–288, [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3).
3. Masters, P. S. (2006) The molecular biology of coronaviruses, *Adv. Virus Res.*, **66**, 193–292, [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3).
4. Kurhade, C., Xie, X., and Shi, P.-Y. (2023) Reverse genetic systems of SARS-CoV-2 for antiviral research, *Antiviral Res.*, **210**, 105486, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105486>.
5. Галкин С. О., Анисенко А. Н., Шадрина О. А., Готтих М. Б. (2022) Генно-инженерные системы для изучения вирусных патогенов человека из семейства Coronaviridae, *Мол. Биол.*, **56**, 82–102, <https://doi.org/10.31857/S0026898422010025>.
6. Chiem, K., Ye, C., and Martinez-Sobrido, L. (2020) Generation of recombinant SARS-CoV-2 using a bacterial artificial chromosome, *Curr. Protoc. Microbiol.*, **59**, e126, <https://doi.org/10.1002/cpmc.126>.
7. Chiem, K., Park, J., Morales Vasquez, D., Plempner, R. K., Torrelles, J. B., Kobie, J. J., Walter, M. R., Ye, C., and Martinez-Sobrido, L. (2022) Monitoring SARS-CoV-2 infection using a double reporter-expressing virus, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e0237922, <https://doi.org/10.1128/spectrum.02379-22>.
8. Ye, C., and Martinez-Sobrido, L. (2022) Use of a bacterial artificial chromosome to generate recombinant SARS-CoV-2 expressing robust levels of reporter genes, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e0273222, <https://doi.org/10.1128/spectrum.02732-22>.

9. Chiem, K., Morales Vasquez, D., Park, J. G., Platt, R. N., Anderson, T., Walter, M. R., Kobie, J. J., Ye, C., and Martinez-Sobrido, L. (2021) Generation and Characterization of recombinant SARS-CoV-2 expressing reporter genes, *J. Virol.*, **95**, e0220920, <https://doi.org/10.1128/JVI.02209-20>.
10. Jin, Y.-Y., Lin, H., Cao, L., Wu, W.-C., Ji, Y., Du, L., Jiang, Y., Xie, Y., Tong, K., Xing, F., Zheng, F., Shi, M., Pan, J.-A., Peng, X., and Guo, D. (2021) A convenient and biosafe replicon with accessory genes of SARS-CoV-2 and its potential application in antiviral drug discovery, *Virol. Sin.*, **36**, 913-923, <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00385-9>.
11. Zhang, Q. Y., Deng, C. L., Liu, J., Li, J. Q., Zhang, H. Q., Li, N., Zhang, Y. N., Li, X. D., Zhang, B., Xu, Y., and Ye, H. Q. (2021) SARS-CoV-2 replicon for high-throughput antiviral screening, *J. Gen. Virol.*, **102**, 001583, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001583>.
12. Kotaki, T., Xie, X., Shi, P. Y., and Kameoka, M. (2021) A PCR amplicon-based SARS-CoV-2 replicon for antiviral evaluation, *Sci. Rep.*, **11**, 2229, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105486>.
13. Wang, B., Zhang, C., Lei, X., Ren, L., Zhao, Z., Wang, J., and Huang, H. (2021) Construction of non-infectious SARS-CoV-2 replicons and their application in drug evaluation, *Virol. Sin.*, **36**, 5, 890-900, <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00369-9>.
14. He, X., Quan, S., Xu, M., Rodriguez, S., Goh, S. L., Wei, J., Fridman, A., Koeplinger, K. A., Carroll, S. S., Grobler, J. A., Espeseth, A. S., Olsen, D. B., Hazuda, D. J., and Wang, D. (2021) Generation of SARS-CoV-2 reporter replicon for high-throughput antiviral screening and testing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2025866118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2025866118>.
15. Luo, Y., Yu, F., Zhou, M., Liu, Y., Xia, B., Zhang, X., Liu, J., Zhang, J., Du, Y., Li, R., Wu, L., Zhang, X., Pan, T., Guo, D., Peng, T., and Zhang, H. (2021) Engineering a reliable and convenient SARS-CoV-2 replicon system for analysis of viral RNA synthesis and screening of antiviral inhibitors, *mBio*, **12**, e02754-20, <https://doi.org/10.1128/mBio.02754-20>.
16. Kwong, C. D., Krauth, C. A., Shortnacy-Fowler, A. T., Arnett, G., Hollingshead, M. G., Shannon, W. M., Montgomery, J. A., and Secrist, J. A. III (1998) Synthesis and antiviral evaluation of analogs of adenosine-N<sup>1</sup>-oxide and 1-(benzyloxy)adenosine, *Nucleosid. Nucleotid.*, **17**, 1409-1443, <https://doi.org/10.1080/07328319808003478>.
17. Alexandrova, L. A., and Smrt, J. (1977) Synthesis of cytidylyl-(3'→5')-2'-O(and 3'-O)-methyladenosine 3'-O(and 2'-O)-N-formyl-L-methionyl derivatives, *Collection Czech. Chem. Commun.*, **42**, 1694-1704, <https://doi.org/10.1135/cccc19771694>.
18. Шаркин Ю. А., Ясько М. В., Скоблов А. Ю., Александрова Л. А. (1996) Синтез 5'-Н-фосфонатов и фторфосфатов 2'-модифицированных нуклеозидов, *Биоорг. Хим.*, **22**, 297-302.
19. Klimenko, A., Matyugina, E., Logashenko, E., Solyev, P., Zenkova, M., Kochetkov, S., and Khandazhinskaya, A. (2018) Novel 5'-norcarbocyclic derivatives of bicyclic pyrrolo-and furano[2,3-d]pyrimidine nucleosides, *Molecules*, **23**, 2654, <https://doi.org/10.3390/molecules23102654>.
20. Siniavin, A. E., Novikov, M. S., Gushchin, V. A., Terechov, A. A., Ivanov, I. A., Paramonova, M. P., Gureeva, E. S., Russu, L. I., Kuznetsova, N. A., Shidlovskaya, E. V., Luyksaar, S. I., Vasina, D. V., Zolotov, S. A., Zigangirova, N. A., Logunov, D. A., and Gintzburg, A. L. (2022) Antiviral activity of N1,N3-disubstituted uracil derivatives against SARS-CoV-2 variants of concern, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10171, <https://doi.org/10.3390/ijms231710171>.
21. Wang, Y., Wang, F., Wang, R., Zhao, P., and Xia, Q. (2015) 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*, *Sci. Rep.*, **5**, 16273, <https://doi.org/10.1038/srep16273>.
22. Almazan, F., DeDiego, M. L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuniga, S., Alonso, S., Moreno, J. L., Nogales, A., Capiscol, C., and Enjuanes, L. (2006) Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis, *J. Virol.*, **80**, 10900-10906, <https://doi.org/10.1128/JVI.00385-06>.
23. Ye, C., Chiem, K., Park, J.-G., Oladunni, F., Platt, R. N., Anderson, T., and Martinez-Sobrido, L. (2020) Rescue of SARS-CoV-2 from a single bacterial artificial chromosome, *mBio*, **11**, e02168-20, <https://doi.org/10.1128/mbio.02168-20>.
24. Wright, D. A., Thibodeau-Beganny, S., Sander, J. D., Winfrey, R. J., Hirsh, A. S., Eichtinger, M., Fu, F., Porteus, M. H., Dobbs, D., Voytas, D. F., and Joung, J. K. (2006) Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly, *Nat. Protoc.*, **1**, 1637-1652, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.259>.
25. Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T., Sun, Q., Ming, Z., Zhang, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T., Hua, T., Zhang, B., Yang, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Xu, W., Guddat, L. W., Wang, Q., Lou, Z., and Rao, Z. (2020) Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus, *Science*, **368**, 779-782, <https://doi.org/10.1126/science.abb7498>.
26. Emeny, J. M., and Morgan, M. J. (1979) Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production, *J. Gen. Virol.*, **43**, 247-252, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>.
27. Chew, T., Noyce, R., Collins, S. E., Hancock, M. H., and Mossman, K. L. (2009) Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production, *Mol. Immunol.*, **46**, 393-399, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.010>.

28. Guettari, N., Loubiere, L., Brisson, E., and Klatzmann, D. (1997) Use of herpes simplex virus thymidine kinase to improve the antiviral activity of zidovudine, *Virology*, **235**, 398-405, <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8706>.
29. Tian, L., Pang, Z., Li, M., Lou, F., An, X., Zhu, S., Song, L., Tong, Y., Fan, H., Fan, J. (2022) Molnupiravir and its antiviral activity against COVID-19, *Front. Immunol.*, **13**, 855496, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.855496>.
30. Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., De Miranda, P., Beauchamp, L., and Schaeffer, H. J. (1977) Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5716-5720, <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5716>.
31. Freeman, S., and Gardiner, J. M. (1996) Acyclic nucleosides as antiviral compounds, *Mol. Biotechnol.*, **5**, 125-137, <https://doi.org/10.1007/BF02789061>.
32. Hurst, M., and Noble, S. (1999) Stavudine: an update of its use in the treatment of HIV infection, *Drugs*, **58**, 919-949, <https://doi.org/10.2165/00003495-199958050-00012>.
33. Матюгина Е. С., Новиков М. С., Козловская Л. И., Волок В. П., Шустова Е. Ю., Ишмухаметов А. А., Кочетков С. Н., Хандажинская А. Л. (2021) Оценка противовирусного потенциала модифицированных гетероциклических оснований и 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов в отношении SARS-CoV-2, *Acta Naturae*, **13**, 78-81, <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11479>.
34. Lai, M. M., and Cavanagh, D. (1997) The molecular biology of coronaviruses, *Adv. Virus Res.*, **48**, 1-100, [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9).
35. Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8794-8797, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8794>.
36. Adler, H., Messerle, M., and Koszinowski, U. H. (2003) Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes, *Rev. Med. Virol.*, **13**, 111-121, <https://doi.org/10.1002/rmv.380>.
37. Singh, A. K., and Das, K. (2022) Insights into HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibition and drug resistance from thirty years of structural studies, *Viruses*, **14**, 1027, <https://doi.org/10.3390/v14051027>.
38. Lisco, A., Vanpouille, C., Tchesnokov, E. P., Grivel, J. C., Biancotto, A., Brichacek, B., Elliott, J., Fromentin, E., Shattock, R., Anton, P., Gorelick, R., Balzarini, J., McGuigan, C., Derudas, M., Gotte, M., Schinazi, R. F., and Margolis, L. (2008) Acyclovir is activated into a HIV-1 reverse transcriptase inhibitor in herpesvirus-infected human tissues, *Cell Host Microbe*, **4**, 260-270, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.07.008>.
39. Jockusch, S., Tao, C., Li, X., Anderson, T. K., Chien, M., Kumar, S., Russo, J. J., Kirchdoerfer, R. N., and Ju, J. (2020) A library of nucleotide analogues terminate RNA synthesis catalyzed by polymerases of coronaviruses that cause SARS and COVID-19, *Antiviral Res.*, **180**, 104857, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104857>.
40. Huang, P., Farquhar, D., and Plunkett, W. (1992) Selective action of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidinetriphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and human DNA polymerases, *J. Biol. Chem.*, **267**, 2817-2822.
41. Matyugina, E., Petushkov, I., Surzhikov, S., Kezin, V., Maslova, A., Ivanova, O., Smirnova, O., Kirillov, I., Fedyakina, I., Kulbachinskiy, A., Kochetkov, S., and Khandazhinskaya, A. (2023) Nucleoside analogs that inhibit SARS-CoV-2 replication by blocking interaction of virus polymerase with RNA, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 3361, <https://doi.org/10.3390/ijms24043361>.

## DUAL-REPORTER SARS-CoV-2 REPLICON FOR SCREENING VIRAL POLYMERASE INHIBITORS

**S. P. Korolev<sup>1,2,3\*</sup>, A. A. Shulepova<sup>1,3</sup>, A. N. Anisenko<sup>1,2,3</sup>, S. O. Galkin<sup>3</sup>,  
L. A. Alexandrova<sup>4</sup>, M. V. Jasko<sup>4</sup>, E. S. Matyugina<sup>4</sup>, M. S. Novikov<sup>5</sup>,  
A. L. Khandazhinskaya<sup>4</sup>, S. N. Kochetkov<sup>2,4</sup>, and M. B. Gottikh<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119992 Moscow, Russia; e-mail: spkorolev@mail.ru

<sup>2</sup> Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,  
119234 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

<sup>5</sup> Department of Pharmaceutical & Toxicological Chemistry, Volgograd State Medical University,  
400131 Volgograd, Russia

To prepare a safe cellular system for testing inhibitors targeting the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of SARS-CoV-2, a genetic construct containing viral cDNA with two blocks of reporter genes while lacking genes encoding the structural S, E and M proteins was engineered. The first reporter block, consisting of renilla luciferase and green fluorescent protein (Rluc-GFP), located upstream of the SARS-CoV-2 5'-UTR. Meanwhile, the second block, represented by firefly luciferase and red fluorescent protein (Fluc-RFP), was positioned downstream of the transcription regulatory sequence (TRS-N). Although the first block of reporter genes can be transcribed by both viral RdRp and cellular polymerases, the second block can only be transcribed by the viral polymerase, aligning with the *Coronaviridae* discontinuous transcription mechanism. This allowed us to accurately assess the effectiveness of viral RdRp inhibition. To facilitate the search for nucleoside RdRp inhibitors the cell line was obtained expressing herpes simplex virus thymidine kinase which provides the first stage of nucleoside phosphorylation. When screening the ability of a number of compounds to inhibit the catalytic activity of SARS-CoV-2 RdRp, we first discovered the antiviral activity of 2'-amino-2'-deoxyadenosine and adenosine-N1-oxide, exceeding the activity of molnupiravir, a therapeutic agent used in the treatment of COVID-19.

*Keywords:* dual-reporter replicon, inhibitors, RNA-dependent RNA polymerase, SARS-CoV-2, viruses

## ГЕНЫ днРНК СЕМЕЙСТВА SNHG: КОМЕТИЛИРОВАНИЕ И ОБЩИЕ ФУНКЦИИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

© 2024 Э.А. Брага<sup>1\*</sup>, Е.А. Филиппова<sup>1</sup>, Л.А. Урошлев<sup>2</sup>, С.С. Лукина<sup>1</sup>,  
И.В. Пронина<sup>1</sup>, Т.П. Казубская<sup>3</sup>, Д.Н. Кушлинский<sup>3</sup>, В.И. Логинов<sup>1</sup>,  
М.В. Фридман<sup>2</sup>, А.М. Бурдённый<sup>1\*</sup>, Н.Е. Кушлинский<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии,  
125315 Москва, Россия; электронная почта: eleonora10\_45@mail.ru; burdennyu@gmail.com

<sup>2</sup> Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, Россия

<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина  
Минздрава России, 115522 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.07.2024

После доработки 01.09.2024

Принята к публикации 03.09.2024

Гены длинных некодирующих РНК (днРНК) семейства генов-хозяев малых ядрышковых РНК (SNHG) могут участвовать в онкогенезе как за счёт регуляторных функций, свойственных днРНК, так и за счёт влияния на образование малых ядрышковых РНК и биогенез рибосом. Цель данной работы – оценить в клинических образцах рака яичников (РЯ) изменения уровня метилирования и степень кометилирования группы генов днРНК семейства SNHG (*SNHG1*, *GAS5/SNHG2*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*) для разных стадий рака как критерии сходства их роли в онкогенезе. На представительной выборке 122 образцов РЯ методом количественной МС-ПЦР показано статистически значимое ( $p < \{0,01-0,0001\}$ ) повышение уровня метилирования 5 исследуемых генов днРНК. Показана статистически значимая связь повышенного уровня метилирования *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12* с прогрессией РЯ: с клинической стадией, размером опухоли и метастазированием, что указывает на возможную функциональную значимость гиперметилирования этих генов. Для 4 из 5 генов (*SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12*) впервые выявлена статистически значимая попарная положительная корреляция уровней метилирования ( $r_s > 0,35$ ;  $p \leq 0,001$ ). Полученные нами данные о кометилировании этих 4 генов находятся в согласии с данными GEPIA 2.0 (для 426 образцов РЯ), выявляющими их коэкспрессию ( $r_s > 0,5$ ;  $p < 0,001$ ); корреляция уровней экспрессии *GAS5* и *SNHG6* подтверждена количественной ОТ-ПЦР ( $r_s = 0,46$ ;  $p = 0,007$ ). Для днРНК *SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12* биоинформационически предсказаны общие миРНК, потенциально способные взаимодействовать с одной или несколькими из них по механизму конкурирующих эндогенных РНК. Предсказаны также мРНК, на экспрессию которых они, таким образом, способны влиять. Изучено возможное участие генов, соответствующих этим мРНК, в ряде значимых для онкогенеза процессов, включая процессинг и сплайсинг РНК и эпителиально-мезенхимальный переход. Таким образом, определены 4 днРНК семейства SNHG, имеющие сходство как в своей регуляции, так и в предполагаемых биологических функциях в патогенезе РЯ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рак яичников, длинные некодирующие РНК, семейство генов-хозяев малых ядрышковых РНК, миРНК, миРНК, процессинг РНК, сплайсинг РНК, ЭМП.

DOI: 10.31857/S0320972524110179 EDN: IJAVG

### ВВЕДЕНИЕ

По состоянию на 2024 г. в мире ежегодно диагностируется 314 000 новых случаев рака яични-

ков (РЯ) и 207 000 случаев имеют неблагоприятный исход, что ставит РЯ на первое место по показателям смертности среди злокачественных новообразований женской репродуктивной системы

Принятые сокращения: днРНК – длинные некодирующие РНК; миРНК – микроРНК; миРНК – малые ядрышковые РНК; нкРНК – некодирующие РНК; РЯ – рак яичников; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; SNHG – семейство генов-хозяев малых ядрышковых РНК.

\* Адресат для корреспонденции.

в экономически развитых странах, в том числе в России [1, 2]. РЯ протекает бессимптомно до поздних стадий с обширным метастазированием, ввиду чего исследование механизмов развития и прогрессии РЯ необходимо для своевременного выявления метастатического заболевания [3].

В последнее время превалирует точка зрения, что в процессах прогрессирования рака главную роль играют не столько генетические нарушения, сколько эпигенетические факторы, такие как ДНК- и РНК-метилирование, модификация гистонов, реモデリング хроматина, а также воздействия некодирующих РНК (нкРНК), которые почти не имеют рамок считывания, но вовлечены в сложную регуляцию экспрессии генов [4]. Эпигенетические модификации обратимы и могут повышать фенотипическую пластичность опухолевой клетки, необходимую, например, при осуществлении процессов, связанных с метастазированием, таких как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [5]. Постгеномные исследования показали, что в транскриптоме человека преобладают нкРНК. Взаимодействия РНК-белок, РНК-РНК или РНК-ДНК, реализуемые с участием нкРНК, позволили по-новому взглянуть на механизмы регуляции разнообразных биологических процессов в онкогенезе. Открытие микроРНК (миРНК) и длинных нкРНК (днРНК) подняло на новый уровень представления о транскриптоме и регуляторных генных сетях в развитии и прогрессии злокачественных опухолей [6]. Важным этапом стало выявление механизма конкурирующих эндогенных РНК (ceRNA-model), объяснившего участие разных миРНК в регуляции экспрессии множества мРНК за счёт общих сайтов связывания миРНК (MiRNA Response Elements, MRE) [6]. Этот же механизм оказался задействованным в регуляции генов с участием днРНК по схеме днРНК/миРНК/мРНК, в частности, при раке яичников [7].

В геноме человека обнаружено 232 гена малых ядрышковых РНК (мякРНК); среди них выявлены гены, получившие название генов-хозяев малых ядрышковых РНК (Small Nucleolar RNA Host Genes, SNHG), которые не кодируют стабильную мРНК, но кодируют днРНК. На сегодняшний день это семейство насчитывают 32 гена SNHG1–SNHG33, включая DANCR (SNHG13), GASS5 (SNHG2), MEG8 (SNHG23) (<https://www.genenames.org/tools/search/?#/?query=snhg>; на 17.08.2024). Изучение функциональной значимости этих генов в норме и в патологии привлекает всё большее внимание биологов и онкологов [8, 9]. Так, стало известно, что многие днРНК семейства SNHG участвуют в онкогенезе как за счёт функций типичных днРНК (например, взаимодействий с миРНК по механизму конкурирующих эндогенных РНК [7]), так и за счёт влияния на регуляцию уровня мякРНК и био-

генез рибосом [8–10]. Представляется актуальным поиск подходов к исследованию механизмов участия днРНК и мякРНК в онкогенезе и биогенезе рибосом.

Анализ коэкспрессии генов используют для выявления генов с общими функциями и выяснения новых функций генов [11]. Кометилирование может также отражать скоординированную регуляцию генов и их совместное участие в определённых процессах. Цель данной работы – оценить в клинических образцах РЯ изменения уровня метилирования и степень кометилирования для группы генов днРНК, относящихся к семейству SNHG. Кроме того, для продолжения дальнейших исследований мы ставили себе целью предварительно оценить влияние метилирования на их экспрессию и коэкспрессию. В исследование включены 5 генов этого семейства: SNHG1, GAS5/SNHG2, SNHG6, SNHG12, SNHG17, для которых обнаружено гиперметилирование в опухолях яичников [12–14]. Из этих 5 днРНК наиболее исследован ген GAS5 (growth arrest-specific transcript 5), для которого отмечены супрессорные свойства, в том числе в опухолях яичников [15].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Образцы опухолей яичников** собраны и морфологически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследовали образцы опухолей больных, которые до операции не получали лучевую, химио- или гормонотерапию. Все опухоли были классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [16]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70–80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилином-эозином. Образцы тканей хранили при –70 °С. В работе использовали 122 образца опухолей и 105 образцов гистологически неизменённой ткани яичников (табл. 1).

**Анализ уровня метилирования** генов днРНК проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени, как описано в работе Van Dam et al. [11]. Использован набор реактивов qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). Амплификацию проводили на приборе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», США). Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса ACTB с использованием олигонуклеотидов, специфичных к неконвертированной матрице. Для сравнительного

**Таблица 1.** Обобщённые данные по образцам опухолей яичников

Клинико-гистологический параметр		<i>n</i> = 122
Гистологический тип	серозная аденокарцинома	91
	эндометриоидная аденокарцинома	21
	другие типы	10
Клиническая стадия	I	26
	II	19
	III	68
	IV	9
Размер и распространенность	T1	26
	T2	20
	T3	76
Гистологическая степень	G1	28
	G2	35
	G3	57
Отдаленные метастазы	M <sub>0</sub>	113
	M <sub>1</sub>	9
Лимфатические метастазы	N <sub>0</sub>	101
	N <sub>1-3</sub>	21
Диссеминация по брюшине и в сальник	нет	45
	есть	77
Метастазы всех типов	нет	43
	есть	79

анализа эффективности амплификации также применялся локус *ACTB* с использованием олигонуклеотидов, специфичных к конвертированной матрице. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР для генов днРНК приведены в табл. 2. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 («Promega», США). В качестве положительного контроля 100%-ного метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 («Thermo Fisher Scientific», США). Исследование метилирования 5 генов днРНК выполнено на тотальной выборке из 122 образцов опухолей яичников.

**Анализ относительного уровня экспрессии днРНК и миРНК.** Выделение РНК и получение кДНК проводили, как описано ранее [17]. Изменения уровня экспрессии днРНК и миРНК определяли методом количественной ПЦР в реальном времени на приборе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System. Данные анализировали с использованием метода  $\Delta\Delta Ct$  [18]. Изменение уровня экспрессии менее чем в 2 раза ( $|\Delta\Delta Ct| \leq 2$ ) принимали за отсутствие изменений. Праймеры для анализа уровня экспрессии 5 днРНК и контрольного гена *B2M* приведены в табл. 3. Наличие продуктов ПЦР и их размер проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием интеркалирующим красителем бромидом этидия. Исследование изменений уровня экспрессии 5 генов днРНК выполнено на тотальной выборке из 68 парных образцов РНК.

Анализ изменений уровня экспрессии миРНК проводили с использованием наборов TaqMan MicroRNA Assays («Thermo Fisher Scientific»): hsa-miR-124-3p (Assay ID: 4427975-001182); hsa-miR-124-5p (Assay ID: 4427975-002197); hsa-miR-137-3p (Assay ID: 4427975-001129) и контрольных наборов TaqMan™ MicroRNA Assays («Thermo Fisher Scientific»): RNU48 (Assay ID: 4427975-001006); RNU6B (Assay ID: 4427975-001093). Исследование уровня экспрессии миРНК выполнено на тотальной выборке из 44 парных образцов РНК.

**Статистический анализ.** Для анализа результатов использовали пакет статистических программ IBM SPSS Statistics 22; значимость различий между исследуемыми группами оценивали, используя непараметрический U-тест Манна–Уитни для независимых выборок. Анализ корреляции производили с помощью критерия Спирмена. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Биоинформационический анализ.** Данные полногеномного бисульфитного секвенирования серозной аденокарциномы яичников в NCBI's Gene Expression Omnibus (NCBI GEO) GSE146556 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE146555>) и GSE81228 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE81228>) привлечены как первичный тест наличия гиперметилирования у генов днРНК в опухолях яичников.

Для оценки предсказанных изменений уровня экспрессии исследуемых генов днРНК и предсказанных корреляций между этими изменениями была использована база данных GEPIA 2.0 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) [19], содержащая данные об экспрессии генов из библиотек TCGA для 426 образцов серозной аденокарциномы яичников и 88 образцов нормальной ткани яичников (<http://gepi2.cancer-pku.cn/#index>).

Оценка мРНК, положительно коррелирующих с исследуемыми днРНК, выполнена в среде про-

**Таблица 2.** Праймеры и условия метил-специфичной ПЦР

Ген днРНК	M/U	Праймер, нуклеотидная последовательность (5'→3')	Размер, п.н.	T <sub>отж.</sub> , °C
GAS5	M	MF: CGTTATCGTCGGTATTGGAGGGG	185	60
		MR: CGCCCGACGCCTTATCCCC		
	U	UF: TGTTATTGTTGGTATTGGAGGGGTGAG	179	60
		UR: CAACACCTTATCCCCATCTTCTCCA		
SNHG1	M	MF: CGGCGATCGAGGTTTAGGA	210	60
		MR: ACTAACTCACCGACCGCATT		
	U	UF: TGGTGATTGAGGTTTAGGA	210	55
		UR: ACTAACTCACCAACCACATT		
SNHG6	M	MF: TTGAGTTATCGCGTCGGTT	295	61
		MR: CTCTTCCGATAACGCGACCC		
	U	UF: CTCTTCCAATACACAAACCC	295	58
		UR: CAAAAACCATAAACCCACCTCC		
SNHG12	M	MF: CGCGTTAGAAAATTATATATTAGTGGAAAGAGATAAG	239	60
		MR: CCCGACGCTAAACCCACGC		
	U	UF: TGTGTTAGAAAATTATATATTAGTGGAAAGAGATAAG	245	56
		UR: TCAATACCCAACACTAAACCCACAC		
SNHG17	M	MF: GCGCGAAACGAGCGTA	168	59
		MR: CGACGCCCTAACGTCGAATA		
	U	UF: TTGGTGTGAAATGAGTGTA	170	57
		UR: CAACACCCTAACATCAAATAACA		
ACTB1		BSF: TGGTGATGGAGGAGGTTAGTAAGT	60	135
		BSR: AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTAA		

Примечание. MF/UF и MR/UR – прямые и обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю соответственно. Олигонуклеотиды подобраны с использованием базы данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) и программы (<http://www.urogene.org/methprimer2/>) с проверкой в программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 («DNASTAR», США).

граммирования R с использованием набора данных из NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE211669>) для 131 больных РЯ; учитывали данные при  $r_s > 0,5$  и  $p < 10^{-8}$ .

Оценка миРНК, отрицательно коррелирующих с исследуемыми днРНК, выполнена с использованием данных полнотранскриптомного секвенирования из ICGC (International Cancer Genome Consortium; <https://github.com/icgc-dcc>) для 300 больных серозной цистаденокарциномой яичников и набора данных из NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE119055>)

для 6 образцов РЯ и 4 гистологически нормальных тканей яичников. Локальное выравнивание последовательностей между миРНК и днРНК было выполнено с использованием Архива нуклеотидов NCBI и алгоритма Смита–Уотермана [20].

Гены, связанные с ЭМП, отбирали с использованием баз данных GeneCards (<https://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=epithelial-mesenchymal>) и dbEMT 2.0 (<http://dbemt.bioinfo-minzhao.org/>).

Расчёт анализа обогащения выполнен с привлечением набора инструментов g:Profiler

**Таблица 3.** Праймеры, условия ПЦР и размеры продукта ПЦР 5 днРНК и контрольного гена

РНК	Праймеры, нуклеотидная последовательность (5'→3')	$T_{\text{отж.}}$ , °C	Размер, п.н.
<i>GAS5</i>	F: GAGCAAGCCTAACTCAAGCC R: TCAAGCCGACTCTCCATACCC	60	157
<i>SNHG6</i>	F: GCGAGGTGCAAGAAAGCC R: TGCTGCATGCCACACTTGA	60	94
<i>SNHG12</i>	F: TCTGGTGATCGAGGACTTCC R: AGCATGCTGTTGTTCTACCTAA	60	157
<i>SNHG17</i>	F: GGGATCTGGGTTGCTGATATT R: GTAGCCTCACTCTCCATTCTCT	62	89
<i>B2M</i>	F: TGACTTTGTACAGCCCCAAGATAG R: CAAATGCGGCATCTCAAACCTC	60/62	81

Примечание. Праймеры подбирали в программе Beacon Designer (Premier Biosoft International) и с использованием PrimerSelect, Lasergene (<http://www.dnastar.com/t-primerselect.aspx>).

(<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler>): Gene Ontology (GO; <https://geneontology.org/>); Reactome Pathway Database (REAC; <https://reactome.org/>); Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/>); базы транскрипционных факторов (TF); WikiPathway (WP); The Human Protein Atlas (HPA; <https://www.proteinatlas.org/>); CORUM: the comprehensive resource of mammalian protein complexes–2022 (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/corum/>) [21].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

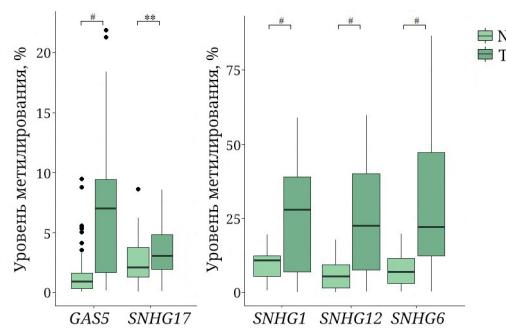
**Гиперметилирование группы генов днРНК семейства SNHG и связь уровня метилирования с прогрессией рака яичников.** Методом количественной МС-ПЦР проведён анализ изменений уровней метилирования 5 генов днРНК (*SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*) на выборке из 122 образцов опухолей яичников (рис. 1).

Как видно из рис. 1, все 5 генов статистически значимо повышают уровень метилирования в опухоли яичников в сравнении с гистологически неизменённой тканью, что согласуется с данными полногеномного бисульфитного секвенирования NCBI GEO (GSE146556 и GSE81228) и работ Burdennyy et al. [12, 13] и Lukina et al. [14]. Однако 4 гена (*GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6* и *SNHG17*) изменяют своё метилирование в разы ( $p < 0,0001$ ), в то время как изменение метилирования *SNHG17* гораздо менее значительно ( $p < 0,01$ ).

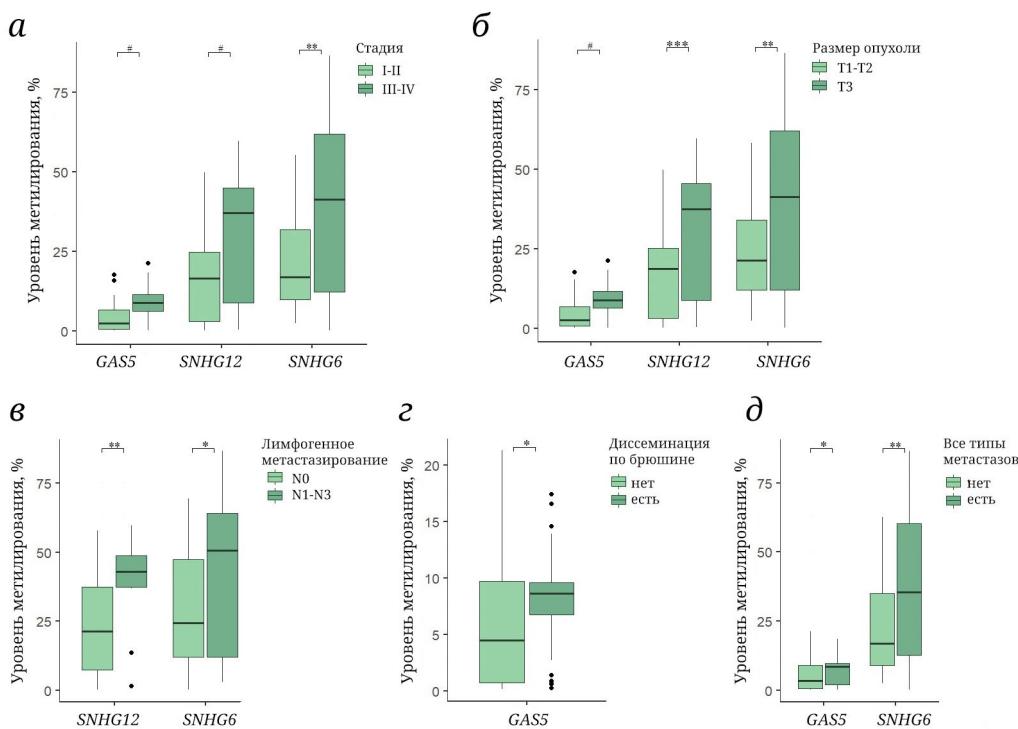
Проведён анализ связи изменений уровня метилирования 5 генов днРНК с прогрессией РЯ (рис. 2). Для 3 генов днРНК (*GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12*) показано статистически значимое ( $p < 0,01$ ) повышение на более поздних клинических стадиях (III–IV по сравнению с I–II) с наи-

более высокой достоверностью для генов *GAS5* и *SNHG12* ( $p < 0,0001$ ). С увеличением размера и распространённости РЯ (T3 по сравнению с T1–T2) также наблюдается статистически значимое повышение уровня метилирования этих 3 генов с наибольшей достоверностью гена *GAS5* ( $p < 0,0001$ ), с меньшей – *SNHG12* ( $p < 0,001$ ) и *SNHG6* ( $p < 0,01$ ).

Известно, что при РЯ доминирует перитонеальный путь метастазирования [3]. В соответствии с этим диссеминация в брюшную полость и сальник отмечена у 77 пациентов, а метастазирование в лимфоузлы – только у 21 больного из 122. С образованием метастазов связаны те же 3 гена (*GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12*), но ассоциации не такие высокозначимые, как с клинической стадией. Так, с лимфогенными метастазами ассоциировано повышение метилирования у генов *SNHG6* ( $p < 0,05$ ) и *SNHG12* ( $p < 0,01$ ); с диссеминацией по брюшине и в сальник – у гена *GAS5* ( $p < 0,05$ ); при учёте



**Рис. 1.** Изменения уровней метилирования 5 генов днРНК семейства генов SNHG в опухолях яичников; гены *GAS5* и *SNHG6* исследованы в 122 образцах опухолей и 105 образцах нормы; гены *SNHG1*, *SNHG12*, *SNHG17* – в 93 образцах опухолей и 75 образцах нормы; \*\*  $p < 0,01$ , #  $p < 0,0001$ ; N – образцы парной нормальной ткани яичника; Т – опухолевые образцы рака яичника

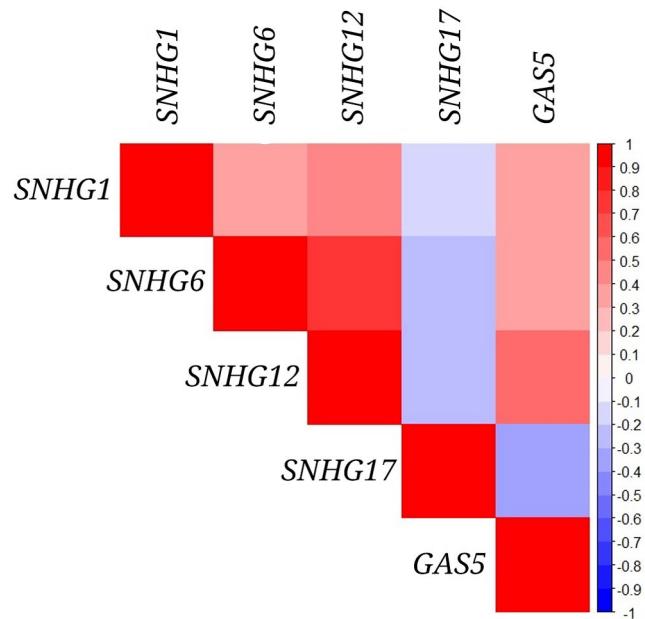


**Рис. 2.** Связь уровней метилирования генов *GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12* с прогрессией РЯ; а – с клинической стадией (I-II – 45 образцов РЯ, III-IV – 77 образцов РЯ); б – с размером и распространённостью рака (T1 + T2 – 46 образцов РЯ, T3 – 76 образцов РЯ); в – с метастазированием в лимфоузлы (N0 – 101 образец РЯ, N1 – 21 образец РЯ); г – с диссеминацией по брюшине и в сальник (нет – 45, есть – 77); д – с учётом всех типов метастазирования (43 – нет, 79 – есть); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; #  $p < 0,0001$

всех типов метастазирования ассоциации выявлены у генов *GAS5* ( $p < 0,05$ ) и *SNHG6* ( $p < 0,01$ ). Выявленная связь с прогрессией РЯ у 3 генов (*GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12*) указывает на возможную функциональную значимость метилирования этих генов при РЯ.

**Кометилирование и коэкспрессия группы генов днРНК семейства *SNHG* при РЯ.** Методом статистического анализа на основании расчёта коэффициента корреляции Спирмена определены попарные корреляции уровней метилирования 5 аберрантно метилированных генов днРНК (рис. 3).

Как видно из корреляционной матрицы, 4 гена (*GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*) из 5 исследованных проявили попарные положительные корреляции, тогда как отрицательные корреляции выявлены только для гена *SNHG17*. Статистически значимое кометилирование ( $r_s > 0,35$ ;  $p \leq 0,001$ ) показано для 6 попарных сочетаний этих 4 генов: *GAS5* – *SNHG1*, *GAS5* – *SNHG6*, *GAS5* – *SNHG12*, *SNHG1* – *SNHG6*, *SNHG1* – *SNHG12*, *SNHG6* – *SNHG12*. Количественные данные о попарных положительных корреляциях представлены в табл. 4. Для гена *SNHG17* обнаруживаются 3 отрицательных корреляции с генами *GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12* (табл. 4), с геном *SNHG1* корреляция тоже отрицательная, хотя статистически не значимая (см. рис. 3).



**Рис. 3.** Корреляционная матрица, отражающая степень корреляции уровней метилирования 5 генов днРНК (*GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*) при РЯ (попарные корреляции для 5 генов в 93 образцах РЯ, кроме пары *GAS5* – *SNHG6*, для которой корреляция определена в 122 общих образцах). Положительные корреляции показаны красным, отрицательные – синим; интенсивность цвета эквивалентна коэффициенту корреляции Спирмена

**Таблица 4.** Данные о попарном кометилировании группы генов днРНК и их сопоставление с данными о коэкспрессии по GEPIA 2.0

Пара генов днРНК	Кометилирование		Коэкспрессия по GEPIA 2.0	
	$r_s$	p-value	$r_s$	p-value
1. <i>GAS5 – SNHG1</i>	0,39	< 0,001	0,55	< 0,001
2. <i>GAS5 – SNHG6</i>	0,39	< 0,001	0,52	< 0,001
3. <i>GAS5 – SNHG12</i>	0,59	< 0,001	0,50	< 0,001
4. <i>SNHG1 – SNHG6</i>	0,36	0,001	0,41	< 0,001
5. <i>SNHG1 – SNHG12</i>	0,48	< 0,001	0,68	< 0,001
6. <i>SNHG6 – SNHG12</i>	0,77	< 0,001	0,39	< 0,001
7. <i>SNHG17 – GAS5</i>	-0,35	0,001	-	-
8. <i>SNHG17 – SNHG6</i>	-0,27	0,010	-	-
9. <i>SNHG17 – SNHG12</i>	-0,29	0,005	-	-

Примечание. Приведены значения коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ) и уровня статистической значимости (p-value).

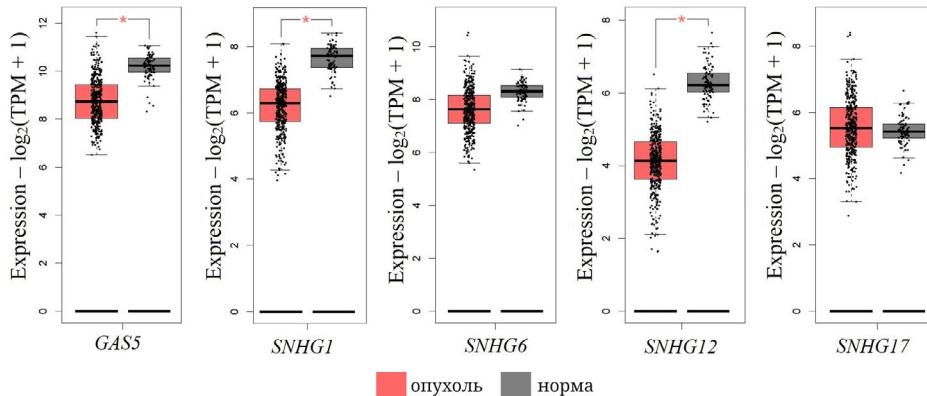
Для оценки функциональной значимости вывода о кометилировании, эти результаты были сопоставлены с данными об уровнях экспрессии и о возможной коэкспрессии 5 исследуемых генов днРНК, полученных из базы данных GEPIA 2.0 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>), содержащей данные из библиотек TCGA для более 400 образцов рака яичников. На рис. 4 приведены изменения уровней экспрессии 5 днРНК.

Следует отметить, что в отличие от гена *SNHG17*, другие 4 гена днРНК, по данным GEPIA 2.0, показали выраженное снижение уровня экспрессии, причём *GAS5*, *SNHG1*, *SNHG12* – статистически значимое ( $p < 0,01$ ), что согласуется с их гиперметилированием при РЯ. Результат ана-

лиза корреляций экспрессии исследуемых днРНК, по данным GEPIA 2.0., приведён на рис. 5.

Важно подчеркнуть, что коэкспрессия, по данным GEPIA 2.0, выявлена для тех же 4 днРНК семейства *SNHG* (*SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12*), которые проявили кометилирование (рис. 5). Причём выявлены те же 6 попарных сочетаний днРНК: *SNHG1 – GAS5*, *SNHG1 – SNHG6*, *SNHG1 – SNHG12*, *GAS5 – SNHG6*, *GAS5 – SNHG12*, *SNHG6 – SNHG12* (табл. 4;  $r_s = 0,39–0,68$ ;  $p < 0,001$ ).

Нами были определены уровни экспрессии 2 днРНК *GAS5* и *SNHG6* методом количественной ОТ-ПЦР на представительных выборках образцов РЯ, а также получены пилотные данные для днРНК *SNHG12* и *SNHG17*. Наблюдается сни-



**Рис. 4.** Изменения уровней экспрессии 5 днРНК *GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, при серозной цистоаденокарциноме яичников, по данным GEPIA 2.0 (красный цвет – в опухоли, темно-серый – в норме); 426 образцов опухолей, 88 образцов нормальной ткани; красная звездочка соответствует  $p < 0,01$ ; TPM – transcripts per million (транскриптов на миллион картированных прочтений)

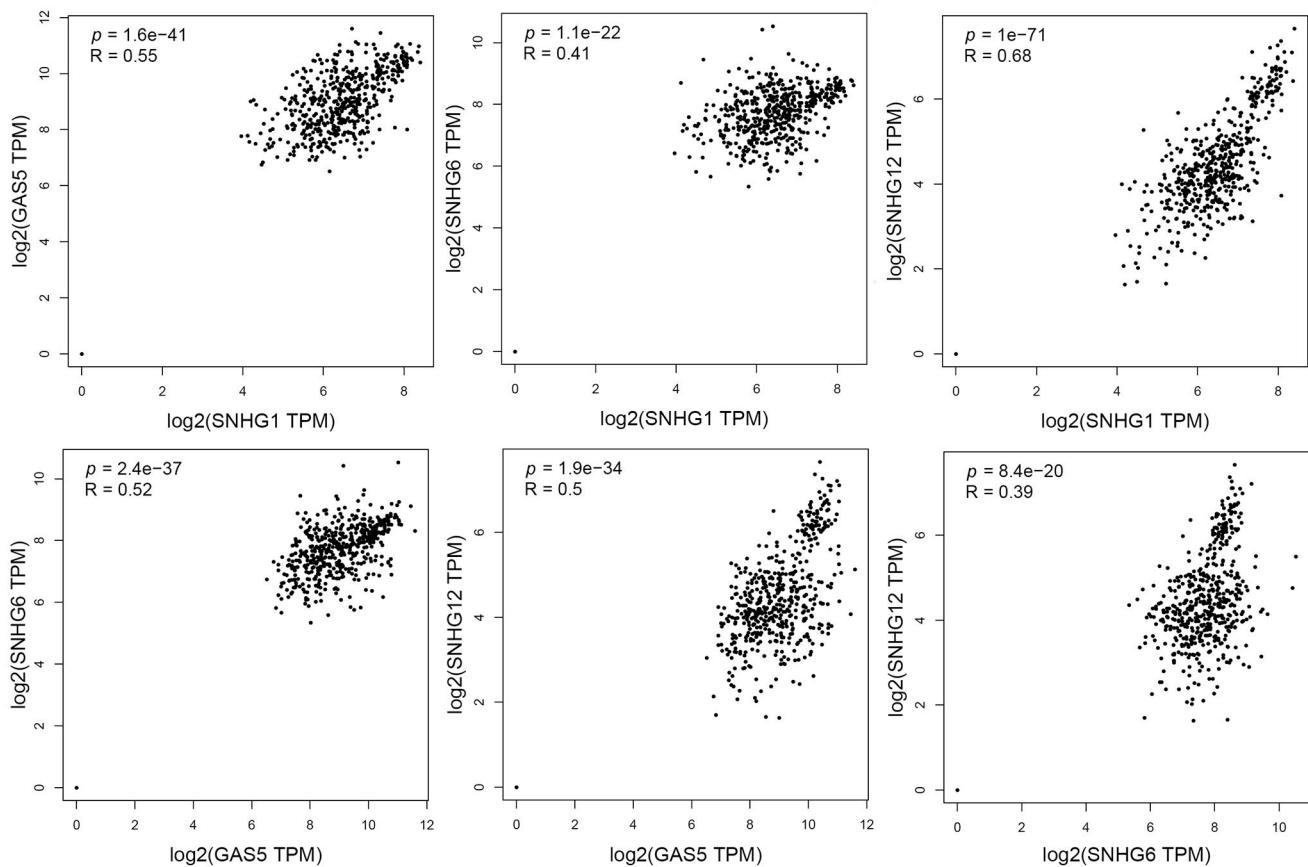


Рис. 5. Положительные корреляции между изменениями уровней экспрессии в 6 парах 4 днРНК семейства *SNHG*, по данным GEPIA 2.0 (выборка: 426 образцов серозной цистаденокарциномы яичников, 88 образцов нормы). Приведены коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ) и значимость ( $p$ -value)

жение уровней экспрессии днРНК *GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12* (рис. 6, а), что согласуется с данными об их гиперметилировании. Статистически значимое повышение уровня экспрессии *SNHG17* ( $p = 0,048$ ) может указывать на отсутствие функциональной значимости гиперметилирования гена *SNHG17* (рис. 6, а).

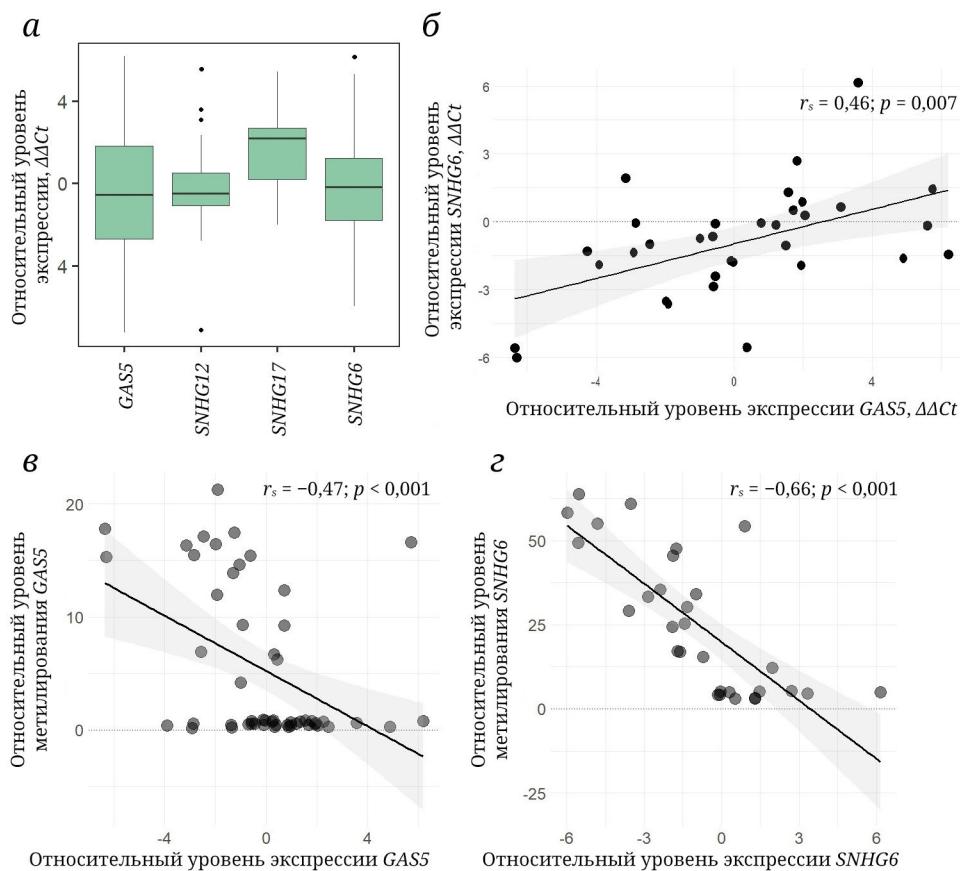
Проведён анализ возможной коэкспрессии днРНК *GAS5* и *SNHG6* в опухолях яичников с расчётом коэффициента корреляции Спирмена, и определена статистически значимая положительная корреляция ( $r_s = 0,46$ ;  $p = 0,007$ ; рис. 6, б). Важно, что экспериментально полученный результат о коэкспрессии этих днРНК совпал с результатом анализа базы данных GEPIA для этой пары днРНК *GAS5* – *SNHG6* ( $r_s = 0,52$ ;  $p < 0,001$ ; рис. 5).

Проведён анализ возможных корреляций между изменениями уровней экспрессии и метилирования для генов днРНК *GAS5* и *SNHG6* в опухолях яичников с расчётом коэффициентов корреляции Спирмена. Показаны статистически значимые отрицательные корреляции между изменениями уровней экспрессии и метилирования для гена днРНК *GAS5* ( $r_s = -0,47$ ;  $p < 0,001$ ) и для гена днРНК *SNHG6* ( $r_s = -0,66$ ;  $p < 0,001$ ; рис. 6, в и г).

Полученный результат о статистически значимых обратных зависимостях между уровнями экспрессии и метилирования, показанными для обоих генов *GAS5* и *SNHG6*, служит дополнительным подтверждением согласованных изменений уровней метилирования и экспрессии генов днРНК *GAS5* и *SNHG6*.

Итак, для 4 из 5 исследованных днРНК (*GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*) получены экспериментальные данные о статистически значимом кометилировании для 6 возможных попарных сочетаний между ними: *SNHG1* – *GAS5*, *SNHG1* – *SNHG6*, *SNHG1* – *SNHG12*, *GAS5* – *SNHG6*, *GAS5* – *SNHG12*, *SNHG6* – *SNHG12* (рис. 3; табл. 4), и об их коэкспрессии, которая показана в результате анализа GEPIA 2.0 для тех же 6 попарных сочетаний (рис. 5). На примере пары *GAS5* – *SNHG6* коэкспрессия показана также экспериментально (рис. 6, б). На согласованность в регуляции этих двух днРНК указывают также обратные зависимости между уровнями метилирования и экспрессии, полученные для генов *GAS5* и *SNHG6* (рис. 6, в и г).

Обращает на себя внимание совершенно иное поведение *SNHG17* в онкогенезе РЯ по сравнению с другими членами этого семейства, несмотря



**Рис. 6.** Выявление согласованной регуляции среди группы генов днРНК семейства *SNHG*. *a* – Изменение уровней экспрессии 4 днРНК *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17* в образцах опухолей относительно нормальной ткани; *GAS5* исследовали на выборке из 68 парных образцов РЯ; *SNHG6* – в 57 парных образцах РЯ; *SNHG12*, *SNHG17* – в 29 парных образцах РЯ. *б* – Положительная корреляция уровней экспрессии днРНК *GAS5* и *SNHG6* на выборке из 33 общих образцов РЯ. *в* – Отрицательная корреляция между уровнями экспрессии и метилирования днРНК *GAS5* на выборке из 53 общих образцов РЯ; *г* – отрицательная корреляция между уровнями экспрессии и метилирования днРНК *SNHG6* на выборке из 30 общих образцов РЯ. Рассчитан коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ )

на то что он тоже является геном-хозяином для мякРНК *SNORA71B* [22]. Такая ситуация ставит вопрос о том, не могут ли различия быть связанными с функцией соответствующих днРНК в патогенезе РЯ.

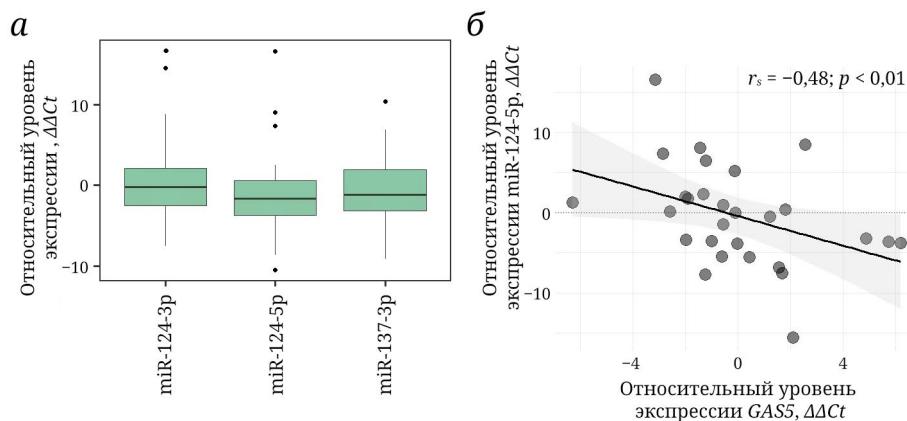
**Скрининг потенциально регулируемых миРНК для 4 днРНК семейства *SNHG* при РЯ.** Основной механизм посттранскрипционной ре-

гуляции генов в опухолях при участии днРНК и миРНК осуществляется по схеме днРНК/миРНК/мРНК [7]. Проведён отбор миРНК, статистически значимо отрицательно коррелирующих с 4 днРНК семейства *SNHG* (*SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12*). С использованием набора данных ICGC (<https://github.com/icgc-dcc>) для РЯ определена группа потенциально регулируемых миРНК: miR-124,

**Таблица 5.** Значения коэффициента Спирмена и  $p$ -value для корреляции между 4 днРНК и 2 миРНК, согласно результатам анализа базы данных ICGC

миРНК	днРНК	$r_s$	$p =$	миРНК	днРНК	$r_s$	$p =$
miR-124	<i>SNHG1</i>	-0,71	0,0001	miR-137	<i>SNHG1</i>	-0,71	0,0027
	<i>GAS5</i>	-0,56	0,0051		<i>GAS5</i>	-0,74	0,0015
	<i>SNHG6</i>	-0,53	0,0073		<i>SNHG6</i>	-0,80	0,0003
	<i>SNHG12</i>	-0,68	0,0003		<i>SNHG12</i>	-0,80	0,0003

Примечание. В использованном наборе данных отсутствовали данные о 3р- и 5р-плечах.



**Рис. 7.** Выявление корегулируемых миРНК. *а* – Уровень экспрессии miR-124-3р, miR-124-5р, miR-137-3р в образцах опухолей яичников относительно парной нормы; miR-124-3р исследован в 38 парных образцах РЯ, miR-124-5р – в 44 образцах РЯ, miR-137-3р – в 41 образце РЯ. *б* – Отрицательная корреляция уровней экспрессии днРНК GAS5 и miR-124-5р на выборке из 28 общих парных образцов РЯ

miR-137, miR-1286, miR-1290, miR-4771, miR-4791 и др. ( $r_s < -0,5$ ;  $p < 0,01$ ). Для miR-124 и miR-137 отрицательная корреляция биоинформатически выявляется со всеми 4 днРНК: SNHG1, GAS5, SNHG6 и SNHG12 (табл. 5), но не с SNHG17.

Нами исследован относительный уровень экспрессии трёх миРНК (miR-124-3р, miR-124-5р, miR-137-3р) и возможные корреляции между изменениями уровней трёх миРНК и днРНК GAS5 и SNHG6; получены данные о статистически значимой отрицательной корреляции между GAS5 и miR-124-5р:  $r_s = -0,48$ ;  $p = 0,009$  (рис. 7, *а* и *б*).

Можно отметить, что этот результат согласуется с данными другой предсказательной базы для рака яичников (GSE119055), согласно которой среди этих 2 миРНК и 4 днРНК максимальная отрицательная корреляция предсказана для пары miR-124-5р – GAS5 ( $r_s = -0,71$ ;  $p < 0,0014$ ) и несколько ниже – для пары miR-124-5р – SNHG6 ( $r_s = -0,64$ ;  $p = 0,005$ ).

Чтобы выявить полный набор общих миРНК, способных к прямому связыванию с каждой из днРНК GAS5 и SNHG6, проведён скрининг миРНК на основе анализа корреляций и комплементарностей. Для этого выполнен анализ набора данных для рака яичников (GSE119055) при  $r_s \leq -0,6$  ( $p < 0,01$ ) и проведено локальное выравнивание последовательностей с использованием алгоритма Смита–Уотермана [20]. В результате определены 9 общих миРНК (табл. 6), которые, наряду с миРНК специфичными для GAS5 (66) и для SNHG6 (40), могут участвовать в опухолях яичников в прямом связывании с обеими днРНК и в снижении их уровня.

Из этого анализа можно заключить, что до 10% отобранных миРНК могут участвовать в опухолях яичников в регуляции генов совместно с обеими днРНК GAS5 и SNHG6 по схеме: днРНК/

миРНК/мРНК. МиРНК hsa-miR-578, по-видимому, обладает наибольшей комплементарностью к сайтам связывания на обеих днРНК GAS5 и SNHG6 и представляется наиболее вероятным кандидатом.

Предсказанные общие коэкспрессирующиеся мРНК при РЯ и общие процессы для 5 днРНК семейства SNHG при РЯ. Обнаружение согласованных изменений в метилировании и экспрессии для 4 днРНК (GAS5, SNHG1, SNHG6, SNHG12) и выявление общих регуляторных миРНК позволили предположить также общие мишени и общие функции для этих 4 днРНК семейства SNHG в патогенезе РЯ. Чтобы проверить эту гипотезу, биоинформатически были определены мРНК, коэкспрессирующиеся совместно с исследуемыми днРНК в опухолях яичников. Такие мРНК могут

**Таблица 6.** Данные локального выравнивания последовательностей

МИРНК	GAS5	SNHG6
hsa-miR-32-3р	6mer	<b>7mer-a1</b>
hsa-miR-181a-2-3р	6mer	g-bulged 6mer
hsa-miR-199a-5р	<b>7mer-a1</b>	g-bulged 6mer
hsa-miR-298	6mer	<b>7mer-m8</b>
hsa-miR-425-5р	<b>7mer-a1</b>	6mer
hsa-miR-532-5р	6mer	<b>g-bulged 7mer</b>
hsa-miR-548c-3р	6mer	g-bulged 6mer
hsa-miR-578	<b>7mer-m8</b>	<b>7mer-a1</b>
hsa-miR-642a-5р	<b>g-bulged 7mer</b>	6mer

Примечание. Жирным шрифтом выделены наилучшие показатели комплементарности.

**Таблица 7.** Процессы, предсказанные для 5 днРНК семейства *SNHG* при РЯ

днРНК	Предсказанные процессы, согласно gprofiler2 ( <a href="https://biit.cs.ut.ee/gprofiler">https://biit.cs.ut.ee/gprofiler</a> ) с учётом баз данных: GO, REAC, KEGG, HP, HPA, CORUM, TF, WP ( $p < 0,05$ )
<i>SNHG1</i>	151; GO: RNA processing, ncRNA processing, mRNA processing, tRNA processing, RNA methylation, RNA binding, nucleic acid binding; HPA: fallopian tube, endometrium, breast, cervix; MIRNA: hsa-mir-6807; REAC: mRNA-3'-end Processing, mRNA Splicing, mRNA Splicing – Major Pathway; TF: E2F, YY1, MYC; WP: mRNA processing
<i>GAS5</i>	716; CORUM: TNF-alpha/NF-kappa B signaling complex 6; GO: translation, cytoplasmic translation, ribosome biogenesis, RNA processing, ncRNA processing, ribonucleoprotein complex biogenesis, nucleolus, nucleus, cytoplasm, gene expression, signal transduction by p53 class mediator, positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator, negative regulation of post-translational protein modification, focal adhesion, extracellular exosome, cell junction, RNA binding, nucleic acid binding, rRNA binding, mRNA binding, protein binding, cadherin binding; HP: neoplasm; HPA: fallopian tube, endometrium, breast, cervix, ovary; MIRNA: hsa-mir-615-3p, hsa-mir-16-5p; REAC: translation, regulation of expression of SLITs and ROBOs, rRNA processing; TF: ELF, YY1, EHF
<i>SNHG6</i>	742; CORUM: TNF-alpha/NF-kappa B signaling complex 6; GO: translation, cytoplasmic translation, ribosome biogenesis, RNA processing, ncRNA processing, ribonucleoprotein complex biogenesis, nucleolus, nucleoplasm, gene expression, mRNA 5'-UTR binding, signal transduction by p53 class mediator, positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator, focal adhesion, extracellular exosome, RNA binding, nucleic acid binding, rRNA binding, mRNA binding, protein binding; HP: neoplasm; HPA: fallopian tube, endometrium, breast, cervix, ovary; MIRNA: hsa-mir-100-5p, hsa-mir-615-3p; REAC: translation, regulation of expression of SLITs and ROBOs, rRNA processing, Cellular responses to stress; TF: ELF, YY1, EHF, ELK; WP: Direct reversal repair
<i>SNHG12</i>	13; REAC: mRNA Splicing, mRNA Splicing – Major Pathway
<i>SNHG17</i>	3; GO: nucleus, nucleoplasm

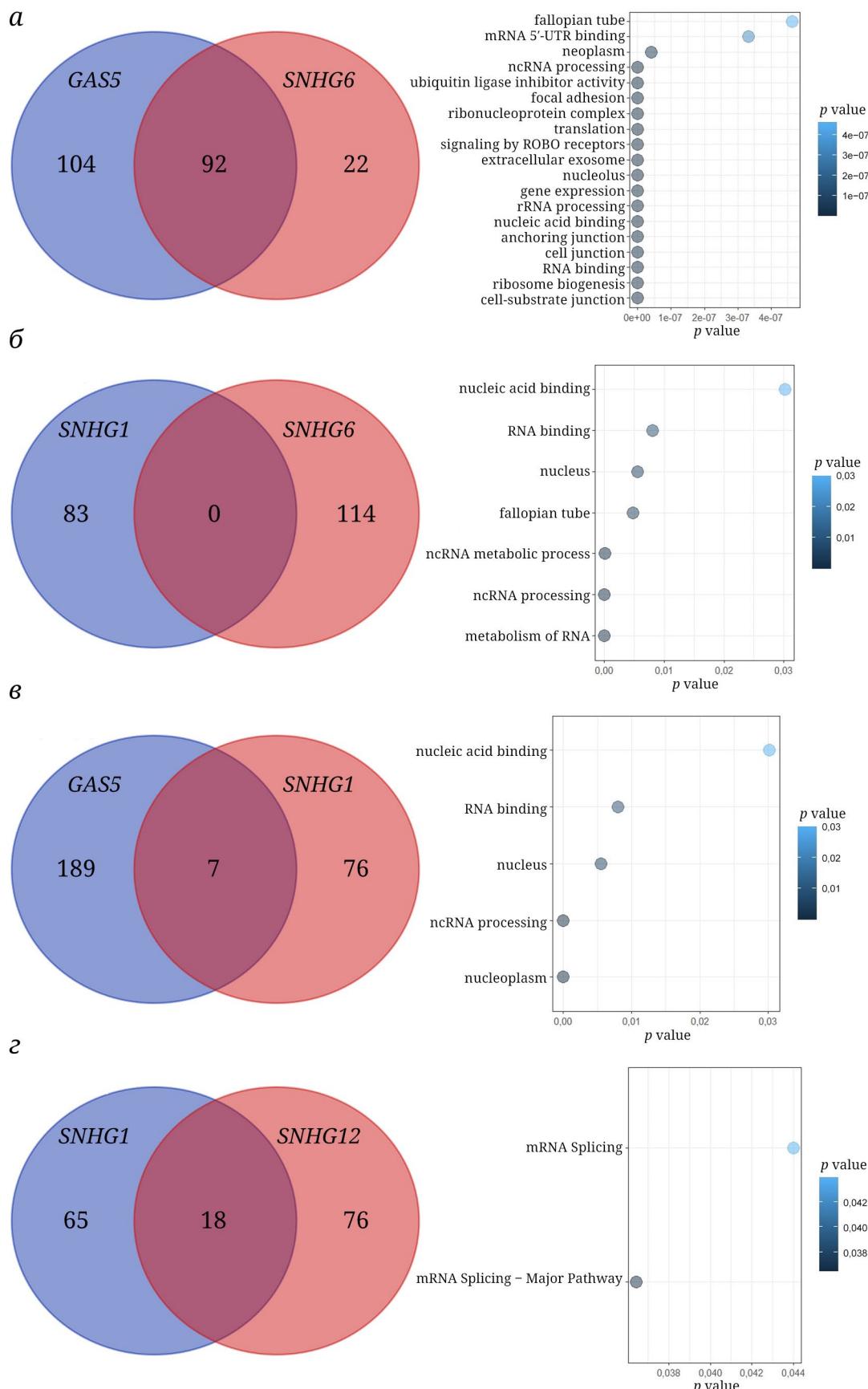
Примечание. Обозначены базы данных, использованные для поиска; перечислены наиболее значимые процессы, связанные с онкогенезом РЯ, рака эндометрия, шейки матки и молочной железы.

представлять мишени днРНК, и их взаимодействие может осуществляться при посредничестве миРНК, белков или напрямую. При наиболее обычном взаимодействии по типу конкурирующих эндогенных РНК (днРНК/миРНК/мРНК) корреляция между экспрессией днРНК и мРНК положительна. На основе данных NCBI GEO (GSE211669) были рассчитаны группы мРНК, уровни которых положительно коррелируют с днРНК семейства *SNHG* при РЯ. Так, для *SNHG1* предсказано 83 коэкспрессирующихся мРНК, для *GAS5* – 196, *SNHG6* – 114, *SNHG12* – 94, *SNHG17* – 53 мРНК ( $r_s > 0,5$ ;  $p < 10^{-8}$ ). Далее, были определены наборы коэкспрессирующихся мРНК, общих для попарных сочетаний 4 исследуемых днРНК: *GAS5* – *SNHG1* (7 общих мРНК),

*GAS5* – *SNHG6* (92 общих мРНК), *GAS5* – *SNHG12* (8 общих мРНК), *SNHG1* – *SNHG12* (18 общих мРНК), *SNHG6* – *SNHG12* (1 общая мРНК). Среди мРНК, коэкспрессирующихся с днРНК *SNHG17*, не обнаружено общих с другими 4 днРНК.

Далее, был применён анализ обогащения по функциональной принадлежности с привлечением пакета gprofiler2 (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler>), и в результате на основе данных о наборах коэкспрессирующихся мРНК были определены процессы, характерные для 5 днРНК семейства *SNHG*: *GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *SNHG17* (табл. 7).

Далее, мы отобрали процессы, общие для попарных сочетаний 4 днРНК (*GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6*,



**Рис. 8.** Диаграммы Венна мРНК, коэкспрессирующихся с *GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6* и *SNHG12*, и диаграммы распределения, отражающие процессы, общие для 4 попарных сочетаний днРНК при РЯ; процессы предсказаны по gprofiler2 и данным GO, REAC, KEGG, HP, HPA, CORUM, TF, WP ( $p < 0,05$ )

**Таблица 8.** Гены, коэкспрессирующиеся с днРНК *GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* ( $r_s > 0,5$ ) и ассоциированные с ЭМП-процессом

днРНК		ЭМП-ассоциированные гены
<i>SNHG1</i>		<i>GLS2</i> , <i>GNL3</i> , <i>HNRNPUL2</i> , <i>ILF3</i> , <i>LETMD1</i> , <i>METTL3</i> , <i>MTA1</i> , <i>OGT</i> , <i>PABPN1</i> , <i>SRSF11</i> , <i>TFAP4</i>
<i>SNHG12</i>		<i>CIRBP</i> , <i>CNKS1R1</i> , <i>EIF3I</i> , <i>HDAC1</i> , <i>HRAS</i> , <i>RASSF1</i> , <i>TAZ</i> , <i>YPEL3</i>
<i>SNHG6</i>	Общие с <i>GAS5</i>	<i>ALKBH2</i> , <i>FAU</i> , <i>NACA</i> , <i>RPL12</i> , <i>RPL14</i> , <i>RPL22L1</i> , <i>RPL27A</i> , <i>RPL38</i> , <i>RPL6</i> , <i>RPL7</i> , <i>RPL7A</i> , <i>RPL9</i> , <i>RPLP2</i> , <i>RPS13</i> , <i>RPS4X</i> , <i>RPS6</i> , <i>RPS8</i> , <i>UBA52</i> , <i>USMG5</i>
	Специфичные <i>SNHG6</i>	<i>MGMT</i> , <i>RPLP22L1</i>
<i>GAS5</i>	Общие с <i>SNHG6</i>	<i>ALKBH2</i> , <i>FAU</i> , <i>NACA</i> , <i>RPL12</i> , <i>RPL14</i> , <i>RPL22L1</i> , <i>RPL27A</i> , <i>RPL38</i> , <i>RPL6</i> , <i>RPL7</i> , <i>RPL7A</i> , <i>RPL9</i> , <i>RPLP2</i> , <i>RPS13</i> , <i>RPS4X</i> , <i>RPS6</i> , <i>RPS8</i> , <i>UBA52</i> , <i>USMG5</i>
	Специфичные <i>GAS5</i>	<i>BTF3</i> , <i>CCT3</i> , <i>EEF1D</i> , <i>EIF3E</i> , <i>EIF3F</i> , <i>IMPDH2</i> , <i>NOX1</i> , <i>PDCD5</i> , <i>PDZD9</i> , <i>RPL13</i> , <i>RPL15</i> , <i>RPL21</i> , <i>RPL4</i> , <i>RPS20</i> , <i>RPS25</i> , <i>RPS27A</i> , <i>RPSA</i> , <i>TPT1</i>

*SNHG12*), и сопоставили их с числом общих коэкспрессирующихся мРНК (рис. 8). Наибольшее количество общих процессов выявлено для днРНК *GAS5* и *SNHG6*, среди которых типичные вовлечённые в онкогенез процессы: адгезия клеток, связывание нуклеиновых кислот (мРНК, нкРНК, микроРНК, дНК), экспрессия генов (рис. 8, а). Кроме того, выявляется роль *GAS5* и *SNHG6* в процессинге РНК, трансляции и биогенезе рибосом, что может быть связано с возможным участием днРНК этого семейства в регуляции экспрессии малых ядрышковых РНК. Для *GAS5* и *SNHG6* показана связь с функцией таких органов, как фаллопиевые трубы и яичники, что согласуется с вовлечённостью этих днРНК в развитие опухолей яичников. Среди процессов, общих как для *GAS5* и *SNHG1*, так и для *SNHG1* и *SNHG6*, выявляются процессинг РНК, связывание нуклеиновых кислот (нкРНК, мРНК, рРНК, тРНК, дНК), а также связь с рядом транскрипционных факторов, например, EHF (ETS Homologous Factor) и YY1 (yin yang 1), ассоциированных с онкогенезом [23–25] (табл. 6; рис. 8, б и в).

Из процессов, значимых в онкогенезе, *SNHG12* вовлечена в сплайсинг, а *SNHG1* – в процессинг и сплайсинг РНК, связывание и метилирование РНК, а также для *SNHG1* показана связь с функционально значимыми процессами, происходящими в фаллопиевых трубах, из клеток которых развиваются определённые формы рака яичников (табл. 7). Для обеих днРНК *SNHG1* и *SNHG12* предсказано участие в сплайсинге (рис. 8, г).

Следует отметить, что для *SNHG17* биоинформационически не выявлены ни мРНК, ни процессы, общие с другими 4 исследованными днРНК семейства *SNHG*, что согласуется с отсутствием кометилирования и коэкспрессии между ними и *SNHG17* при РЯ.

Известно, что ЭМП относится к важнейшим процессам при инвазии и метастазировании РЯ [3]. Чтобы дополнительно оценить связь днРНК с процессами, типичными для онкогенеза в опухолях яичников, данные по мРНК, коэкспрессирующимся с 4 днРНК семейства *SNHG* (*SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12*), были сопоставлены с данными по генам, ассоциированным с ЭМП (табл. 8). Использованы базы данных GeneCards (<https://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=epithelial-mesenchymal>) и dbEMT 2.0 (<http://dbemt.bioinfo-minzhao.org/>).

Как следует из табл. 8, *SNHG1* положительно коррелирует с 11 ЭМП-ассоциированными генами, *SNHG12* – с 8, *SNHG6* – с 21, *GAS5* – с 37 ЭМП-генами. Так, среди белков, ассоциированных с *SNHG1*, белок митохондриального матрикса (LETMD1), который был открыт как онкопротеин, способный стимулировать морфогенез эпителия или мезенхимы во время неопластической трансформации и переходы ЭМП–МЭП (мезенхимально-эпителиальный переход) при раке шейки матки (HCCR-1); повышение уровня miR-494 усиливает инвазию, регулируя уровень LETMD1 при этом виде рака [26]. Ген *GLS2*, кодирующий глутаминазу, относится к потенциальным мишениям *SNHG1*; повышенная экспрессия *GLS2* снижает стволовость и мезенхимальные свойства клеток рака молочной железы, препятствуя ЭМП, а также повышает чувствительность к химиотерапии и ассоциирована с лучшей выживаемостью больных [27].

Связь с процессом ЭМП, играющим важнейшую роль в развитии, прогрессии и метастазировании рака, и в частности, опухолей яичников [3, 4], указывает на значимость днРНК *SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12* в патогенезе РЯ. Важно, что 19 ЭМП-ассоциированных генов оказались общими между наборами генов, ассоциированных

с *GAS5* и *SNHG6*, что подтверждает сходство функций этих днРНК в онкогенезе яичников (табл. 8). Так, например, среди этих 19 общих для *GAS5* и *SNHG6* ЭМП-генов выявлен ген альфа-кетоглутарат-зависимой диоксигеназы (*ALKBH2*), который участвует в репарации ДНК и экспрессируется при различных типах злокачественных новообразований; ген *ALKBH2* в регуляторных сетях связан с онкобелком *MUC1*, нокдаун *ALKBH2* подавляет ЭМП и влияет на NF-кБ-путь [28]. Ген *USMG5*, также известный как субъединица ATP-синтазы мембранны (ATP5MK), предложен как маркер множественной миеломы [29], а ген *RPL22L1*, кодирующий рибосомный белок с РНК-связывающей активностью, по данным работы Wu et al. [30], усиливает метастазирование РЯ через индукцию ЭМП; *RPL22L1* цитирован в 30 статьях по раку (PubMed/2024/05/09).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В связи с открытием днРНК семейства *SNHG* вырос интерес к исследованию многофункциональных генов малых ядрышковых РНК (мякРНК), кодирующих РНК трёх типов: из инtronов формируются малые ядрышковые РНК, представляющие нкРНК длиной 60–300 нуклеотидов, в основном функционирующие в ядрышке; из экзонов при повторном сплайсинге могут образовываться мРНК; а полноразмерный первичный транскрипт, включающий и экзоны, и интроны, сохраняется в ядре и цитоплазме и может функционировать как днРНК семейства *SNHG* [31, 32]. Надо отметить, что из 232 генов мякРНК только 32 гена кодируют именно днРНК семейства *SNHG* (<https://www.genenames.org/tools/search/#/?query=snhg>; на 17.08.2024), а образующиеся мРНК, если они даже есть, как в случае *GAS5*, не являются долгоживущими и функциональными. Представляется актуальным поиск подходов к исследованию генов днРНК, вовлечённых и в онкогенез, и в биогенез рибосомы.

Кометилирование, как и коэкспрессия генов, в опухолях может указывать на их скоординированную регуляцию и совместное участие в общих сигнальных путях/процессах [33, 34]. Однако если анализу коэкспрессии генов в опухолях посвящены более 9000 публикаций, то кометилированию – только 54 работы (PubMed 2024/05/13). Причём при РЯ только в одном из недавних наших исследований анализируется кометилирование ДНК для группы генов регуляторных миРНК [35]. В настоящей работе с использованием общей представительной выборки образцов опухолей яичников впервые исследовано кометилирование 5 генов днРНК семейства

*SNHG*: *SNHG1*, *GAS5/SNHG2*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*.

В настоящей работе обнаружена статистически значимая положительная корреляция уровней метилирования 4 из 5 исследованных генов: *SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12* ( $r_s > 0,35$ ;  $p \leq 0,001$ ), в отличие от гена *SNHG17*. Наблюдаемое кометилирование 4 из 5 генов оказалось в согласии с их коэкспрессией, по данным GEPIA 2.0. Причём для пары *GAS5* – *SNHG6* коэкспрессия подтверждена нами экспериментально. И кометилирование, и коэкспрессия выявлены для 6 попарных сочетаний: *SNHG1* – *GAS5*, *SNHG1* – *SNHG6*, *SNHG1* – *SNHG12*, *GAS5* – *SNHG6*, *GAS5* – *SNHG12*, *SNHG6* – *SNHG12*.

Далее, были получены данные, указывающие на возможное участие миРНК в механизмах действия этой группы генов днРНК. Так, с помощью скрининга баз данных ICGC (<https://github.com/icgc-dcc>) и (GSE119055) были определены общие миРНК, потенциально взаимодействующие с 4 днРНК *SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12*. Кроме того, предсказаны миРНК, способные участвовать в прямых связываниях с двумя днРНК, *GAS5* и *SNHG6*.

Полученные результаты о возможных механизмах действия 4 днРНК (*SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12*) при РЯ позволили предположить их совместное участие в биологических процессах. С помощью скрининга коэкспрессируемых мРНК с использованием данных NCBI GEO (GSE211669) были определены общие мРНК для попарных сочетаний 4 днРНК. Далее, был выполнен анализ обогащения по функциональной принадлежности с привлечением пакета gprofiler2 (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler>), что позволило выявить для всех 4 днРНК (*SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6* и *SNHG12*) вовлённость в процессинг и/или сплайсинг РНК. Для *SNHG1* предсказано также участие в связывании нуклеиновых кислот (мРНК, нкРНК, ДНК) и метилировании РНК. Для *GAS5* и *SNHG6* предсказано наибольшее количество разнообразных процессов, среди которых типичные для онкогенеза: адгезия клеток, связывание нуклеиновых кислот (ДНК, мРНК, нкРНК, миРНК), экспрессия генов, формирование комплексов с белком, апоптоз, сигналинг p53, и др. Для *GAS5*, *SNHG6* и *SNHG1* показана связь с процессами, ассоциированными с функционированием таких органов, как фалlopиевые трубы и яичники, что согласуется с вовлённостью этих днРНК в развитие опухолей яичников.

Необходимо подчеркнуть, что для *GAS5* и *SNHG6* получены также данные о непосредственном участии в биогенезе рибосом и трансляции. Эти результаты согласуются с данными литературы о роли днРНК семейства *SNHG* в механизмах патогенеза опухолей, в том числе связанных с биогенезом рибосом и посттранскрипционными модификациями РНК.

Как отмечено в недавних публикациях [8–10, 32], семейство *SNHG* относится к особому виду днРНК. Так, подобно другим днРНК, члены этого семейства выполняют функции в ядре (эпигенетическая модификация и регуляция транскрипции) и цитоплазме (регуляция трансляции, конкурентное связывание свободных миРНК и посттранскрипционная модификация). Однако, помимо этого, днРНК семейства *SNHG* могут участвовать в регуляции уровня мякРНК, которые вовлечены в процессы сплайсинга и процессинга предшественников рибосомальной РНК (рРНК), а также в посттранскрипционной модификации и биосинтезе рибосом [8–10, 32, 36].

Установлено, что гиперактивация биогенеза рибосом и нарушение структуры рибосом могут быть вызваны активацией онкогенов или потерей активности генов-супрессоров опухоли и играют важную роль в инициации и прогрессировании рака [37–39]. Для мякРНК, в регуляции которых задействованы днРНК семейства *SNHG*, показано участие в метилировании разных компонентов рибосом, включая 2'-О-метилирование рРНК, что необходимо для сборки рибосом [40]. В опухолях обнаружены взаимосвязанные нарушения профилей метилирования компонентов рибосом и профилей экспрессии мякРНК, регулируемых днРНК семейства *SNHG*. Таким образом, днРНК семейства *SNHG* могут участвовать в онкогенезе, воздействуя на процессы биогенеза рибосом, посттранскрипционной модификации и трансляции [36].

Известно, что класс мякРНК, вовлечённых в ядрышковый процессинг прерибосомальных РНК, делят на два семейства в зависимости от структуры и модификаций, которыми они управляют: семейство SNORD (C/D box), которое управляет метилированием 2'-О-рибозы, и семейство SNORA (H/ACA box), которое опосредует переход уридинов в псевдоуридины [8, 32, 41].

Методом биоинформационического поиска нами выявлено наибольшее число общих процессов для пары днРНК *GAS5* и *SNHG6*, предполагающих их совместное участие в процессинге РНК, биогенезе рибосом и трансляции мРНК, которые регулируются мякРНК, что указывает на связь днРНК *GAS5* и *SNHG6* с регуляцией мякРНК.

Как известно, транскрипт *GAS5* (Growth Arrest-Specific 5, Ch1q25.1) размером в 4 т.п.н. содержит 13 экзонов и может посредством альтернативного сплайсинга образовывать до 50 транскриптов и до 24 различных зрелых изоформ днРНК [42] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/60674>). 10 C/D-мякРНК, кодируемых в инtronах *GAS5*, предсказаны как регулирующие 2'-О-метилирование рРНК, тем самым облегчая сворачивание РНК и взаимодействие с рибосомами, а SNORDA103 участвует в конверсии уридинов [43, 44]. С помо-

щью CRISPR/Cas9-модификаций в клеточных культурах показано, что созревание предшественника днРНК *GAS5* является SNORD-зависимым [42].

Таким образом, *GAS5* характеризуется сложной организацией и может обладать разнообразными функциями. Биоинформационистам также удалось выявить 196 потенциальных мРНК-мишней и более 700 значимых процессов. И действительно, по данным литературы, *GAS5* регулирует экспрессию множества генов, в том числе при посредничестве миРНК или через связывание с промотором [42].

m6A(N6-метиладенозин)-метилирование РНК (мРНК, миРНК и днРНК) играет решающую роль в сплайсинге, стабильности, экспорте и трансляции РНК. m6A-Метилирование вовлечено в регуляцию сплайсинга *GAS5* и *SNHG1*. SNORD75 связывает факторы, участвующие в сплайсинге *GAS5*, среди которых METTL3/METTL14 (methyltransferase-like 3/14) [45]. *SNHG1* содержит 18 сайтов m6A-метилирования, и показано, что в клетках колоректального рака происходит модификация по этим сайтам под действием METTL3, которая повышает стабильность *SNHG1* [46].

Ассоциация *SNHG1* и *SNHG12* со сплайсингом РНК и сплайсосомой обнаружена при глиоме и при гепатобластоме, причём при гепатобластоме показана вовлечённость в альтернативный механизм сплайсинга через связывание с регулятором сплайсинга PABPN1 (Polyadenylate-binding nuclear protein 1), который приводит к снижению уровня мякРНК (SNORD27, SNORA24, SNORA16A, SNORA61 и SNORD60) при сохранении инtronов и уровня днРНК [47, 48].

Ген *SNHG6* подвержен альтернативному сплайсингу, имеет 8 сплайс-вариантов; содержащаяся в интроне *SNHG6* мякРНК U87 (SNORD87) участвует в метилировании рРНК и в биогенезе рибосом [49]. Гены-мишени *SNHG6*, предсказанные при раке предстательной железы, также связаны с процессингом рРНК, трансляцией и сплайсингом мРНК [50]. В другой работе, тоже *in silico*, показано, что родственные и экспрессируемые совместно с *SNHG6* гены, колокализованные на 8q-плече, влияют на структурную целостность рибосомы и уровень трансляции при гепатоцеллюлярной карциноме [51]. Биоинформационистский анализ белков, регулируемых с участием днРНК *SNHG6*, при колоректальном раке показал связь с рибосомами, сплайсосомами и процессингом мРНК и влияние на процессы транскрипции и трансляции [52].

Интересно отметить также, что для днРНК *SNHG1*, *GAS5* и *SNHG12* с применением технологии аффинной очистки транслирующих рибосом (TRAP, translating ribosome affinity purification) показана непосредственная связь с рибосомами

в пирамидных нейронах префронтальной коры мозга мышей [53, 54].

На вовлечённость в онкогенез 4 исследованных днРНК семейства *SNHG* указывает также обнаруженная ассоциация с ЭМП-связанными генами. Так, среди генов, ассоциированных с *SNHG12*, выявлены классический опухолевый супрессор *RASSF1A*, ингибирующий ЭМП при раке лёгкого и желудка [55, 56]; классический супрессор ЭМП и индуктор старения клеток через путь Hippo, ген *YPEL3* (Yippee-like 3) [57, 58]; а также ген *TAZ* (tafazzin, phospholipid-lysophospholipid transacylase), выполняющий, напротив, роль онкогена, драйвера ЭМП и стволовости через ингибирование пути Hippo [59, 60].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для группы генов днРНК семейства *SNHG* (*SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12*) в опухолях яичников нами впервые обнаружена роль кометилирования и коэкспрессии, биоинформационически определены общие регуляторные миРНК и общие коэкспрессирующиеся мРНК, а также предсказано участие в общих биологических процессах, ассоциированных с онкогенезом. Среди предсказанных процессов преобладают связывание нуклеиновых кислот (рРНК, тРНК, мРНК, нкРНК, днРНК и ДНК), процесинг и альтернативный сплайсинг, биогенез рибосом и трансляция, в осуществлении которых важная роль отводится мякРНК, содержащимся в инtronах генов этого семейства.

На участие в онкогенезе этой группы днРНК указывает также их ассоциация с ЭМП-связанными генами. Определение 19 общих ЭМП-связанных генов для днРНК *GAS5* и *SNHG6* дополнительно подтверждает их сходство в функциях.

Таким образом, полученные нами данные важны для определения путей регуляции и функций

этой группы днРНК семейства *SNHG* в патогенезе опухолей. Наши результаты о связи днРНК *GAS5*, *SNHG1*, *SNHG6* и *SNHG12* с биогенезом рибосомы при РЯ согласуются с данными литературы, полученными в опухолях других локализаций, что отражает новизну нашего исследования и приоритетность результатов.

**Вклад авторов.** Э.А. Брага, А.М. Бурдённый и Н.Е. Кушлинский – концепция работы; С.С. Лукина и И.В. Пронина – проведение экспериментов; Е.А. Филиппова, Л.А. Урошлев и В.И. Логинов – биоинформационический и статистический анализ; Т.П. Казубская и Д.Н. Кушлинский – сбор и характеристика клинических образцов; М.В. Фридман – анализ литературных данных, написание текста статьи, обсуждение результатов исследования; Э.А. Брага и А.М. Бурдённый – написание текста статьи. Все авторы – чтение, редактирование текста статьи и обсуждение результатов.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00368-П).

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

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике, Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Экспериментальное исследование «Кометилирование группы генов длинных некодирующих РНК семейства *SNHG* в опухолях яичников как потенциальный маркер их корегуляции и общих функций» рассмотрено и одобрено локальным Этическим комитетом ФГБНУ «НИИОПП» (протоколы № 5 от 09.11.2022 и № 3 от 07.05.2024).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sideris, M., Menon, U., and Manchanda, R. (2024) Screening and prevention of ovarian cancer, *Med. J. Aust.*, **220**, 264-274, <https://doi.org/10.5694/mja2.52227>.
2. Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. (2022) Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность), *МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России*, Москва, 252 с.
3. Braga, E. A., Fridman, M. V., and Kushlinskii, N. E. (2017) Molecular mechanisms of ovarian carcinoma metastasis: key genes and regulatory microRNAs, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 529-541, <https://doi.org/10.1134/S0006297917050017>.
4. Dawson, M. A., and Kouzarides, T. (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy, *Cell*, **150**, 12-27, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>.
5. Hanahan, D. (2022) Hallmarks of cancer: new dimensions, *Cancer Discov.*, **12**, 31-46, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

6. Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., and Pandolfi, P. P. (2018) A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language, *Cell*, **146**, 353-358, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>.
7. Braga, E., A., Fridman, M., V., Moscovtsev, A., A., Filippova, E., A., Dmitriev, A. A., and Kushlinskii, N. E. (2020) LncRNAs in ovarian cancer progression, metastasis, and main pathways: ceRNA and alternative mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8855, <https://doi.org/10.3390/ijms21228855>.
8. Monziani, A., and Ulitsky, I. (2023) Noncoding snoRNA host genes are a distinct subclass of long noncoding RNAs, *Trends Genet.*, **39**, 908-923, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.09.001>.
9. Xiao, H., Feng, X., Liu, M., Gong, H., and Zhou, X. (2023) SnoRNA and lncSNHG: advances of nucleolar small RNA host gene transcripts in anti-tumor immunity, *Front. Immunol.*, **14**, 1143980, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1143980>.
10. Zheng, H., Wang, G., Wang, Y., Liu, J., Ma, G., and Du, J. (2023) Systematic analysis reveals a pan-cancer SNHG family signature predicting prognosis and immunotherapy response, *iScience*, **26**, 108055, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108055>.
11. Van Dam, S., Vösa, U., van der Graaf, A., Franke, L., and de Magalhães, J. P. (2018) Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions, *Brief Bioinform.*, **19**, 575-592, <https://doi.org/10.1093/bib/bbw139>.
12. Burdennyy, A. M., Filippova, E. A., Lukina, S. S., Ivanova, N. A., Pronina, I. V., Loginov, V. I., Kazubskaya, T. P., Kushlinskii, N. E., and Braga, E. A. (2023) DNA methylation of a group of long non-coding RNA genes at different stages of ovarian cancer dissemination, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **176**, 495-500, <https://doi.org/10.1007/s10517-024-06054-7>.
13. Burdennyy, A. M., Lukina, S. S., Uroshlev, L. A., Filippova, E. A., Pronina, I. V., Fridman, M. V., Zhordaniya, K. I., Kazubskaya, T. P., Kushlinskii, N. E., Loginov, V. I., and Braga, E. A. (2024) Hypermethylation in ovarian cancer of long noncoding RNA genes: HOTAIR, GASS5, LINC00472, LINC00886, TUG1, *Russ. J. Genet.*, **60**, 665-675, <https://doi.org/10.1134/S1022795424700029>.
14. Lukina, S. S., Burdennyy, A. M., Filippova, E. A., Uroshlev, L. A., Pronina, I. V., Ivanova, N. A., Fridman, M. V., Zhordaniya, K. I., Kazubskaya, T. P., Kushlinskii, N. E., Loginov, V. I., and Braga, E. A. (2024) Methylation of long noncoding RNA genes SNHG6, SNHG12, and TINCR in ovarian cancer, *Mol. Biol.*, **58**, 429-438, <https://doi.org/10.1134/S0026893324700067>.
15. Dong, Q., Long, X., Cheng, J., Wang, W., Tian, Q., and Di, W. (2021) LncRNA GASS5 suppresses ovarian cancer progression by targeting the miR-96-5p/PTEN axis, *Ann. Transl. Med.*, **9**, 1770, <https://doi.org/10.21037/atm-21-6134>.
16. Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., and Wittekind, C. (2017) *The TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edn., Wiley-Blackwell, Oxford, p. 272.
17. Pronina, I. V., Loginov, V. I., Burdennyy, A. M., Fridman, M. V., Senchenko, V. N., Kazubskaya, T. P., Kushlinskii, N. E., Dmitriev, A. A., and Braga, E. A. (2017) DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression, *Gene*, **604**, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.018>.
18. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method, *Methods*, **25**, 402-408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
19. Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., and Zhang, Z. (2019) GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis, *Nucleic Acids Res.*, **47**, W556-W560, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>.
20. Smith, T. F., and Waterman, M. S. (1981) Identification of common molecular subsequences, *J. Mol. Biol.*, **147**, 195-197, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5).
21. Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Adler, P., Vilo, J., and Peterson, H. (2023) g:Profiler-interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update), *Nucleic Acids Res.*, **51**, W207-W212, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad347>.
22. Wu, G., Hao, C., Qi, X., Nie, J., Zhou, W., Huang, J., and He, Q. (2020) LncRNA SNHG17 aggravated prostate cancer progression through regulating its homolog SNORA71B via a positive feedback loop, *Cell Death Dis.*, **11**, 393, <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2569-y>.
23. Fossum, S. L., Mutolo, M. J., Tugores, A., Ghosh, S., Randell, S. H., Jones, L. C., Leir, S. H., and Harris, A. (2017) Ets homologous factor (EHF) has critical roles in epithelial dysfunction in airway disease, *J. Biol. Chem.*, **292**, 10938-10949, <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.775304>.
24. Sizemore, G. M., Pitarresi, J. R., Balakrishnan, S., and Ostrowski, M. C. (2017) The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours, *Nat. Rev. Cancer*, **17**, 337-351, <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.20>.
25. Hosea, R., Hillary, S., Wu, S., and Kasim, V. (2023) Targeting transcription factor YY1 for cancer treatment: current strategies and future directions, *Cancers (Basel)*, **15**, 3506, <https://doi.org/10.3390/cancers15133506>.

26. Wen, N., Zhang, J., and Zhang, Q. (2022) MiR-494 inhibits the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells by regulating LETMD1, *Cell Mol. Biol.*, **67**, 81-87, <https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.5.11>.
27. Ramirez-Peña, E., Arnold, J., Shrivakumar, V., Joseph, R., Vidhya Vijay, G., den Hollander, P., Bhangre, N., Allegakoen, P., Prasad, R., Conley, Z., Matés, J. M., Márquez, J., Chang, J. T., Vasaikar, S., Soundararajan, R., Sreekumar, A., and Mani, S. A. (2019) The epithelial to mesenchymal transition promotes glutamine independence by suppressing GLS2 expression, *Cancers (Basel)*, **11**, 1610, <https://doi.org/10.3390/cancers11101610>.
28. Ke, B., Ye, K., and Cheng, S. (2020) ALKBH2 inhibition alleviates malignancy in colorectal cancer by regulating BMI1-mediated activation of NF-κB pathway, *World J. Surg. Oncol.*, **18**, 328, <https://doi.org/10.1186/s12957-020-02106-0>.
29. Zhao, J., Wang, X., Zhu, H., Wei, S., Zhang, H., Ma, L., and He, P. (2022) Integrative analysis of bulk RNA-Seq and single-cell RNA-seq unveils novel prognostic biomarkers in multiple myeloma, *Biomolecules*, **12**, 1855, <https://doi.org/10.3390/biom12121855>.
30. Wu, N., Wei, J., Wang, Y., Yan, J., Qin, Y., Tong, D., Pang, B., Sun, D., Sun, H., Yu, Y., Sun, W., Meng, X., Zhang, C., Bai, J., Chen, F., Geng, J., Lee, K. Y., Fu, S., and Jin, Y. (2015) Ribosomal L22-like1 (RPL22L1) Promotes ovarian cancer metastasis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition, *PLoS One*, **10**, e0143659, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143659>.
31. Williams, G. T., and Farzaneh, F. (2012) Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer? *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 84-88, <https://doi.org/10.1038/nrc3195>.
32. Huo, M., Rai, S. K., Nakatsu, K., Deng, Y., and Jijiwa, M. (2024) Subverting the canon: novel cancer-promoting functions and mechanisms for snoRNAs, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 2923, <https://doi.org/10.3390/ijms25052923>.
33. Akulenko, R., and Helms, V. (2013) DNA co-methylation analysis suggests novel functional associations between gene pairs in breast cancer samples, *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 3016-3022, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt158>.
34. Sun, S., Dammann, J., Lai, P., and Tian, C. (2022) Thorough statistical analyses of breast cancer co-methylation patterns, *BMC Genom. Data*, **23**, 29, <https://doi.org/10.1186/s12863-022-01046-w>.
35. Lukina, S. S., Burdennyy, A. M., Filippova, E. A., Pronina, I. V., Ivanova, N. A., Kazubskaya, T. P., Kushlinskii, D. N., Utkin, D. O., Loginov, V. I., Braga, E. A., and Kushlinskii, N. E. (2022) Synergy between the levels of methylation of microRNA gene sets in primary tumors and metastases of ovarian cancer patients, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **173**, 87-91, <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05499-y>.
36. Huldani, H., Gandla, K., Asiri, M., Romero-Parra, R. M., Alsalamy, A., Hjazi, A., Najm, M. A. A., Fawaz, A., Hussien, B. M., and Singh, R. (2023) A comprehensive insight into the role of small nucleolar RNAs (snoRNAs) and SNHGs in human cancers, *Pathol. Res. Pract.*, **249**, 154679, <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154679>.
37. Montanaro, L., Treré, D., and Derenzini, M. (2008) Nucleolus, ribosomes, and cancer, *Am. J. Pathol.*, **173**, 301-310, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070752>.
38. Pelletier, J., Thomas, G., and Volarević, S. (2018) Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 51-63, <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.104>.
39. Turi, Z., Lacev, M., Mistrik, M., and Moudry, P. (2019) Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging, *Aging (Albany NY)*, **11**, 2512-2540, <https://doi.org/10.1863/aging.101922>.
40. Barros-Silva, D., Klavert, J., Jenster, G., Jerónimo, C., Lafontaine, D. L. J., and Martens-Uzunova, E. S. (2021) The role of OncoSnoRNAs and ribosomal RNA 2'-O-methylation in cancer, *RNA Biol.*, **18** (Sup. 1), 61-74, <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1991167>.
41. Tanaka, R., Satoh, H., Moriyama, M., Satoh, K., Morishita, Y., Yoshida, S., Watanabe, T., Nakamura, Y., and Mori, S. (2000) Intronic U50 small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene of no protein-coding potential is mapped at the chromosome breakpoint t(3;6)(q27;q15) of human B-cell lymphoma, *Genes Cells*, **5**, 277-287, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00325.x>.
42. Matveeva, A., Vinogradov, D., Zhuravlev, E., Semenov, D., Vlassov, V., and Stepanov, G. (2023) Intron editing reveals SNORD-dependent maturation of the small nucleolar RNA host gene GAS5 in human cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 17621, <https://doi.org/10.3390/ijms242417621>.
43. Popławski, P., Bogusławska, J., Hanusek, K., and Piekiełko-Witkowska, A. (2021) Nucleolar proteins and non-coding RNAs: roles in renal cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13126, <https://doi.org/10.3390/ijms222313126>.
44. Toraih, E. A., Alghamdi, S. A., El-Wazir, A., Hosny, M. M., Hussein, M. H., Khashana, M. S., and Fawzy, M. S. (2018) Dual biomarkers long non-coding RNA GAS5 and microRNA-34a co-expression signature in common solid tumors, *PLoS One*, **13**, e0198231, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198231>.
45. Filippova, J. A., Matveeva, A. M., Zhuravlev, E. S., Balakhonova, E. A., Prokhorova, D. V., Malanin, S. J., Shah Mahmud, R., Grigoryeva, T. V., Anufrieva, K. S., Semenov, D. V., Vlassov, V. V., and Stepanov, G. A. (2019) Are small nucleolar RNAs "CRISPRable"? A report on box C/D Small nucleolar RNA editing in human cells, *Front. Pharmacol.*, **10**, 1246, <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01246>.

46. Xu, Y., Bao, Y., Qiu, G., Ye, H., He, M., and Wei, X. (2023) METTL3 promotes proliferation and migration of colorectal cancer cells by increasing SNHG1 stability, *Mol. Med. Rep.*, **28**, 217, <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13104>.
47. Gandhi, S., Bhushan, A., Shukla, U., Pundir, A., Singh, S., and Srivastava, T. (2023) Downregulation of lncRNA SNHG1 in hypoxia and stem cells is associated with poor disease prognosis in gliomas, *Cell Cycle*, **22**, 1135-1153, <https://doi.org/10.1080/15384101.2023.2191411>.
48. Zhen, N., Zhu, J., Mao, S., Zhang, Q., Gu, S., Ma, J., Zhang, Y., Yin, M., Li, H., Huang, N., Wu, H., Sun, F., Ying, B., Zhou, L., and Pan, Q. (2023) Alternative splicing of lncRNAs from SNHG family alters snoRNA expression and induces chemoresistance in hepatoblastoma, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 735-755, <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.07.007>.
49. Jafari-Oliayi, A., and Dabiri, S. (2022) SNHG6 203 RNA may be involved in the cell cycle progression in HER2-negative breast cancer cells, *Iran. J. Pathol.*, **17**, 251-260, <https://doi.org/10.30699/IJP.2022.525346.2607>.
50. Yan, Y., Chen, Z., Xiao, Y., Wang, X., Qian, K. (2019) Long non-coding RNA SNHG6 is upregulated in prostate cancer and predicts poor prognosis, *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 2771-2778, <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04723-9>.
51. Birgani, M. T., Hajjari, M., Shahrisa, A., Khoshnevisan, A., Shoja, Z., Motahari, P., and Farhangi, B. (2018) Long non-coding RNA SNHG6 as a potential biomarker for hepatocellular carcinoma, *Pathol. Oncol. Res.*, **24**, 329-337, <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0241-3>.
52. Yao, X., Lan, Z., Lai, Q., Li, A., Liu, S., and Wang, X. (2020) LncRNA SNHG6 plays an oncogenic role in colorectal cancer and can be used as a prognostic biomarker for solid tumors, *J. Cell Physiol.*, **235**, 7620-7634, <https://doi.org/10.1002/jcp.29672>.
53. Heiman, M., Kulicke, R., Fenster, R. J., Greengard, P., and Heintz, N. (2014) Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP), *Nat. Protoc.*, **9**, 1282-1291, <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.085>.
54. Rizavi, H. S., Gavin, H. E., Krishnan, H. R., Gavin, D. P., and Sharma, R. P. (2023) Ethanol- and PARP-mediated regulation of ribosome-associated long non-coding RNA (lncRNA) in pyramidal neurons, *Noncoding RNA*, **9**, 72, <https://doi.org/10.3390/ncrna9060072>.
55. Dubois, F., Keller, M., Calvayrac, O., Soncin, F., Hoa, L., Hergovich, A., Parrini, M. C., Mazières, J., Vaisse-Lesteven, M., Camonis, J., Levallet, G., and Zalcman, G. (2016) RASSF1A suppresses the invasion and metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells by inhibiting YAP activation through the GEF-H1/RhoB pathway, *Cancer Res.*, **76**, 1627-1640, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1008>.
56. Bin, Y., Deng, W., Hu, H., Zeng, Q., Chen, J., Xu, Y., Dai, Y., Liao, A., and Xiao, W. (2023) RASSF1A inhibits epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells by downregulating P-JNK, *Cell Biol. Int.*, **47**, 573-583, <https://doi.org/10.1002/cbin.11958>.
57. Zhang, J., Wen, X., Ren, X. Y., Li, Y. Q., Tang, X. R., Wang, Y. Q., He, Q. M., Yang, X. J., Sun, Y., Liu, N., and Ma, J. (2016) YPEL3 suppresses epithelial-mesenchymal transition and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells through the Wnt/β-catenin signaling pathway, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **35**, 109, <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0384-1>.
58. Kwon, Y., Lee, H., Park, H., Lee, B., Kwon, T. U., Kwon, Y. J., and Chun, Y. J. (2023) YPEL3 expression induces cellular senescence via the Hippo signaling pathway in human breast cancer cells, *Toxicol. Res.*, **39**, 711-719, <https://doi.org/10.1007/s43188-023-00208-x>.
59. Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A. R., Poletti, A., Daidone, M. G., Dupont, S., Basso, G., Bicciato, S., and Piccolo, S. (2011) The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells, *Cell*, **147**, 759-772, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.048>.
60. Santoro, R., Zanotto, M., Carbone, C., Piro, G., Tortora, G., and Melisi, D. (2018) MEKK3 sustains EMT and stemness in pancreatic cancer by regulating YAP and TAZ transcriptional activity, *Anticancer Res.*, **38**, 1937-1946, <https://doi.org/10.21873/anticanres.12431>.

## LncRNA GENES OF THE SNHGs FAMILY: COMETYLATION AND COMMON FUNCTIONS IN OVARIAN CANCER

E. A. Braga<sup>1\*</sup>, E. A. Filippova<sup>1</sup>, L. A. Uroshlev<sup>2</sup>, S. S. Lukina<sup>1</sup>, I. V. Pronina<sup>1</sup>,  
T. P. Kazubskaya<sup>3</sup>, D. N. Kushlinskiy<sup>3</sup>, V. I. Loginov<sup>1</sup>, M. V. Fridman<sup>2</sup>,  
A. M. Burdennyy<sup>1\*</sup>, and N. E. Kushlinskii<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,

125315 Moscow, Russia; e-mail: eleonora10\_45@mail.ru, burdennyy@gmail.com

<sup>2</sup> N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

<sup>3</sup> N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,

Ministry of Health of the Russian Federation, 115522 Moscow, Russia

Long non-coding RNA (lncRNA) genes of the small nucleolar RNA host gene family (SNHGs) may participate in oncogenesis both through regulatory functions inherent to lncRNA and through their influence on the formation of small nucleolar RNAs and ribosome biogenesis. The aim of this work is to evaluate changes in the methylation level and the degree of comethylation of a group of lncRNA genes of the SNHGs family (*SNHG1*, *GAS5/SNHG2*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*) in clinical samples of ovarian cancer (OC) for different stages of cancer as a criterion for the similarity of their role in oncogenesis. On a representative set of 122 OC samples, MS-qPCR showed a statistically significant ( $p < \{0.01-0.0001\}$ ) increase in the methylation level of 5 studied lncRNA genes. A statistically significant relationship was shown between the increased methylation level of *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12* and OC progression: with the clinical stage, tumor size and metastasis, which indicates the possible functional significance of hypermethylation of these genes. For 4 of the 5 genes: *SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6*, *SNHG12*, a statistically significant pairwise positive correlation of methylation levels was revealed for the first time ( $r_s > 0.35$ ;  $p \leq 0.001$ ). Our data on co-methylation of these 4 genes are in agreement with the GEPPIA 2.0 data (for 426 OC samples), revealing their co-expression ( $r_s > 0.5$ ;  $p < 0.001$ ); the correlation of *GAS5* and *SNHG6* expression levels was confirmed by quantitative RT-PCR ( $r_s = 0.46$ ;  $p = 0.007$ ). For lncRNA *SNHG1*, *GAS5*, *SNHG6* and *SNHG12*, common miRNAs were predicted bioinformatically, potentially capable of interacting with one or more of them via the mechanism of competing endogenous RNAs. The mRNAs, the expression of which they are thus capable of influencing, were also predicted. The possible involvement of genes corresponding to these mRNAs in a number of processes significant for oncogenesis, including RNA processing and splicing and epithelial-mesenchymal transition, was studied. Thus, 4 lncRNAs of the SNHGs family were identified, which have similarities both in their regulation and in their putative biological functions in the pathogenesis of OC.

**Keywords:** ovarian cancer, long noncoding RNAs, small nucleolar RNA host gene family, snoRNA, miRNA, mRNA, RNA processing, RNA splicing, EMT

## ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДА C3f СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

© 2024 И.А. Кренев<sup>1</sup>, Е.В. Егорова<sup>1,2</sup>, М.М. Хайдукова<sup>1,3</sup>, А.Д. Микушина<sup>1,4</sup>,  
Я.А. Забродская<sup>1,5,6</sup>, А.С. Комлев<sup>1</sup>, И.Е. Елисеев<sup>1,4</sup>, О.В. Шамова<sup>1,2</sup>, М.Н. Берлов<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
197022 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: berlov.mn@iemspb.ru

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»,  
192019 Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский  
Академический университет имени Ж.И. Алферова, 194021 Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева», 197376 Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
195251 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 09.02.2024

После доработки 01.10.2024

Принята к публикации 08.10.2024

Пептид C3f является побочным продуктом регуляции активированной системы комплемента, не имеющим собственной твердо установленной функции. Ранее мы показали, что в условиях *in vitro* C3f проявляет умеренную антимикробную активность против некоторых грамположительных бактерий. Наличие двух остатков гистидина в аминокислотной последовательности пептида позволило предположить усиление его антимикробной активности при понижении pH и в присутствии катионов металлов, в частности цинка. Поскольку такие условия могут реализовываться в очагах воспаления, исследование зависимости активности C3f от pH и присутствия катионов металлов дает возможность оценить биологическую значимость антимикробных свойств пептида. Пептид C3f и его аналоги с заменами гистидинов лизинами или серинами, C3f[H/K] и C3f[H/S], получили методом твердофазного синтеза. С помощью спектроскопии КД мы установили, что C3f содержит β-шпильку и неструктурные регионы; присутствие Zn<sup>2+</sup> не сказывалось на конформации пептида. В настоящей работе показано, что C3f может проявлять антимикробную активность и в отношении грамотрицательных бактерий, в частности, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583. Действие пептида на *Ps. aeruginosa* и *Listeria monocytogenes* EGD сопровождается нарушением барьерной функции бактериальных мембран. Ионы Zn<sup>2+</sup>, но не Cu<sup>2+</sup>, повышали антимикробную активность C3f в отношении *L. monocytogenes*, причем 4-кратный и 8-кратный молярный избыток Zn<sup>2+</sup> был не более эффективен, чем 20%-ный. Активность аналогов C3f также в некоторой степени усиливалась ионами цинка. Таким образом, мы предполагаем гистидин-независимое формирование комплексов C3f-Zn<sup>2+</sup>, приводящее к повышению суммарного заряда и антимикробной активности пептида. В присутствии 0,15 M NaCl C3f терял активность независимо от наличия Zn<sup>2+</sup>, что свидетельствует о незначительной роли C3f как эндогенного антимикробного пептида. Присутствие C3f отменило бактерицидный эффект Zn<sup>2+</sup> в отношении цинк-чувствительного штамма *Escherichia coli* ESBL 521/17, что косвенно подтверждает взаимодействие пептида с Zn<sup>2+</sup>. При снижении pH возрасла активность C3f против *Micrococcus luteus* A270, но не против *L. monocytogenes*. В данной работе на примере C3f мы показываем значимость таких факторов, как pH и катионы металлов, в реализации активности антимикробных пептидов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** врожденный иммунитет, комплемент, антимикробные пептиды, C3f, круговой дихроизм, Zn<sup>2+</sup>, зависимость активности от pH.

DOI: 10.31857/S0320972524110186 EDN: IJRSR

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Комплément, центральное гуморальное звено врожденного иммунитета, участвует в опсонизации патогенов, стимуляции клеточного ответа, оказывает прямой бактерицидный эффект. Хотя последний обычно связывают с действием мембраноатакующего комплекса [1–3], возрастает объем сведений о том, что антимикробной активностью могут обладать и другие продукты активации комплемента. Ввиду локального характера их генерации вблизи таргетных клеток их эффекты могут вносить вклад в инактивацию патогенов [4].

Наряду с системой комплемента важными эффекторными молекулярными факторами врожденного иммунитета являются антимикробные пептиды (АМП) [5, 6]. АМП привлекают внимание как перспективные противоинфекционные агенты в условиях неуклонно растущей антибиотикорезистентности. Большинство АМП характеризуется положительным зарядом и пространственным разобщением катионных и гидрофобных аминокислотных остатков. Наиболее распространенный механизм действия АМП состоит во взаимодействии с отрицательно заряженными мембранами патогенов, приводящем к повышению их проницаемости и утечке жизненно важных компонентов из клетки [7, 8]. Представителями основных АМП человека являются  $\alpha$ -дефенсины (HNP; human neutrophil peptides),  $\beta$ -дефенсины, гистатины, кателицидин LL-37, дермцидин, а также пептиды, известные в первую очередь по другим функциональным активностям (например, хемокины и гепсидин). В роли АМП могут также выступать производные некоторых из этих и других пептидов и белков [9]. Среди подходов к классификации АМП целесообразно подчеркнуть разделение на классы  $\alpha$ -спиральных,  $\beta$ -структурных, включающих и  $\alpha$ - и  $\beta$ -структуры, неструктурированных АМП, а также выделение АМП, обогащенных той или иной аминокислотой [10].

В литературе отмечен функциональный параллелизм комплемента и АМП [11]. Система комплемента сама по себе является продуcentом АМП, в качестве которых могут функционировать С3a и С4a [12, 13]. В настоящей работе мы стремимся уточнить это представление. Ключевой этап в развертывании каскада комплемента – конвертация белка С3 с образованием анафилатоксина С3a и белка С3b. После ковалентной фиксации к поверхностным молекулам клеток за счет содержащейся в белке высокореактивной тиоэфирной связи С3b может участвовать в дальнейшей деятельности комплемента. Однако, связавшись с хозяйской клеткой, содержащей CD35, CD46

или привлекающей циркулирующий фактор Н, С3b инактивируется фактором I. Эта протеаза при участии названных кофакторов вносит два разрыва в полипептидную цепь белка, образуя iC3b и высвобождая пептид С3f (SSKITHRIHWESASLLR; ~2 кДа) [14, 15]. В аминокислотной последовательности С3f обращает на себя внимание наличие двух остатков гистидина (11,8% от общего числа аминокислотных остатков), что потенциально может быть важным для реализации его функциональной активности. Хотя некоторые эффекты, оказываемые пептидом С3f, были описаны [16–19], его собственная физиологическая роль остается неясной. Аминокислотный состав и физико-химические свойства С3f в целом соответствуют характеристикам типичных АМП. Ранее методом радиальной диффузии мы впервые показали умеренную антимикробную активность С3f в отношении некоторых грамположительных бактерий. Самым чувствительным объектом оказалась *Listeria monocytogenes* (минимальная ингибирующая концентрация – 70 мкМ) [20]. Активность пептида исследовалась в среде с низкой ионной силой и нейтральным pH, что не соответствует условиям *in vivo*, в частности, в очаге воспаления. Среди факторов, которые могут влиять на активность АМП в очагах воспаления, можно отметить слабокислые значения pH [21, 22]. Также важную роль может играть и наличие в среде катионов металлов, в частности цинка. Изменение концентрации ионов цинка может быть разнонаправленным. Хотя воспаление инфекционной природы сопровождается снижением уровня ионов цинка в циркуляции на 30–40% [23, 24], некоторые данные свидетельствуют о том, что возможно, напротив, повышение концентрации цинка в сайтах локализации патогенных бактерий [25].

С учетом значимости электростатических взаимодействий в реализации антимикробных свойств АМП ионная сила способна существенно влиять на их активность [26]. Кроме того, значение pH среды модулирует активность АМП за счет протонирования/депротонирования  $\alpha$ -аминогруппы,  $\alpha$ -карбоксильной группы, боковых групп аминокислотных остатков [27]. Важная роль принадлежит остаткам гистидина, значение  $pK_a$  боковой группы которого сопоставимо с pH внутренней среды организма [28]. Повышение антимикробной активности при снижении pH было описано для таких гистидин-содержащих АМП, как гистатины слюны человека [29, 30], гепсидин человека и его укороченная изоформа [31], фрагменты тромбина [32], пептиды Gad-1 и Gad-2 из атлантической трески *Gadus morhua* [33], ченсинин-1 из дальневосточной лягушки *Rana chensinensis* [34] и др.

Принятые сокращения: АМП – антимикробные пептиды; HNP –  $\alpha$ -дефенсины человека.

Взаимодействие с ионами металлов также способно модулировать активность АМП [35]. Особенno часто встречаются примеры усиления активности АМП в присутствии ионов цинка. Взаимоотношения между АМП и  $Zn^{2+}$  могут реализовываться посредством образования комплекса либо взаимодействия без образования координационных связей [36]. В ряде случаев ключевую роль в координации ионов  $Zn^{2+}$  играют остатки гистидина [37, 38]. Повышение антимикробной активности в присутствии ионов цинка было показано для гистатина-5 [39], фрагментов кининогена [39] и семеногелинов [40] человека, клаванина A из асцидии *Styela clava* [41] и других гистидин-содержащих пептидов. Наличие двух остатков гистидина в структуре C3f позволяет предположить влияние pH и  $Zn^{2+}$  на его антимикробную активность.

Поскольку пространственная структура пептида C3f и его физиологическая роль остаются не исследованными, целью настоящей работы было охарактеризовать структурные свойства и антимикробную активность C3f в различных условиях. В ходе работы антимикробную активность пептида исследовали в условиях, которые могут соответствовать условиям очага воспаления (значения pH в слабокислой области, присутствие катионов двухвалентных металлов), где происходит активация комплемента и образуется C3f. Чтобы оценить роль остатков гистидина в антимикробной активности C3f, наряду с этим пептидом были исследованы также его аналоги с заменами гистидинов лизинами или серинами. Поскольку при различных значениях pH боковая группа гистидина может быть положительно заряженной или незаряженной, в качестве замещающих аминокислот были использованы лизин (катионная боковая группа) и серин (незаряженная гидрофильная боковая группа). Включение в работу аналогов пептида с замененными остатками гистидинов позволяло оценить их функциональную роль, в частности, в предполагаемом взаимодействии C3f с ионами цинка и зависимости его антимикробной активности от pH.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Пептиды.** Пептид C3f и его аналоги с замененными остатками гистидина, C3f[H/K] и C3f[H/S], получали методом твердофазного синтеза по ортональной Fmoc/tBu (флуоренилметилоксикарбонил/трем-бутил) стратегии по стандартному протоколу [42]. Для синтеза использовали смолу Ванга с предварительно связанной С-концевой аминокислотой («Iris Biotec», Германия) и Fmoc-производные аминокислот («Iris Biotec»).

Удаление примесей и аналитический контроль чистоты пептидов проводили с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) в градиенте ацетонитрила, содержащего 0,1% трифтормукусной кислоты (ТФУ). Препартивную ОФ ВЭЖХ проводили на колонке Waters Symmetry C-18, 300 × 19 мм, 7 мкм («Waters Corp», США), аналитическую – на колонке Luna C-18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм («Phenomenex Inc.», США). Соответствие расчетной и фактической молекулярной массы пептидов подтверждали с помощью масс-спектрометрии с временным детектором на основе матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI TOF; matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) на приборе Ultraflex («Bruker», Германия).

Тотальную фракцию HNP получали из лейкоцитов человека, как описано ранее [20].

**Спектроскопия кругового диахроизма (КД).** Для определения вторичной структуры пептида C3f при отсутствии и в присутствии  $ZnCl_2$  изменили спектры КД на приборе Chirascan («Applied Photophysics», Великобритания). Концентрация C3f в пробах была 0,19 мг/мл (94 мкМ); концентрация  $ZnCl_2$  – 113 мкМ (соответствует 20%-ному молярному избытку ионов цинка по отношению к пептиду); в качестве растворителя использовали деионизованную воду. В ходе оптимизации условий измерения выбрали следующие параметры: кювета с длиной оптического пути 0,5 мм; диапазон измерений – 180–260 нм с шагом 1,0 нм; усреднение по 5 спектрам для каждого образца; время накопления – 1,0 с на точку; ширина спектральной щели – 1,0 нм. После регистрации спектры усредняли, фон вычитали, спектры конвертировали в единицы молярного коэффициента экстинкции  $\Delta\epsilon$  ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). Для деконволюции спектров применяли алгоритм BeSTSel, имплементированный на одноименном сервере (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) [43].

**Определение антимикробной активности.** Антимикробную активность пептидов и катионов металлов исследовали в отношении следующих микроорганизмов: грамположительные бактерии *Listeria monocytogenes* EGD, *Micrococcus luteus* A270, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583, *Escherichia coli* ESBL 521/17 (клинический изолят из мочи). В работе использовали штаммы *St. aureus* и *Ps. aeruginosa* из коллекции отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; культуры остальных микроорганизмов были любезно предоставлены проф. Р. Лерером, Калифорнийский университет, Лос-Анджелес, США (*L. monocytogenes*), д.б.н. С.И. Чернышом, Санкт-

Петербургский государственный университет (*M. luteus*), д.б.н. А.Г. Афиногеновой, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург (*E. coli*).

Для определения антимикробной активности использовали метод подсчета колоний [44]. Инокулят объемом 20 мкл содержал суспензию бактерий в логарифмической (*L. monocytogenes*, *M. luteus*, *St. aureus*, *Ps. aeruginosa*) или стационарной (*E. coli*) фазе роста (конечная концентрация –  $\sim 1 \times 10^4$  колониеобразующих единиц на 1 мл) и исследуемые вещества в рабочем буфере. При изучении зависимости антимикробной активности от pH в качестве рабочего буфера использовали 10 мМ натрий-fosфатный буфер с различными значениями pH в диапазоне 4,5–8,0; в остальных экспериментах – 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4). Если не указано иное, концентрация ионов металлов в пробах превосходила концентрацию пептидов в 1,2 раза. Инкубацию проводили в круглодонном 96-луночном планшете («Sarstedt», Германия) при +37 °C в течение часа с перемешиванием на шейкере. По окончании инкубации по 10 мкл содержимого лунок смешивали с 2 мл расплавленной среды Trypticase soy agar («Himedia», Индия), терmostатированной при +45 °C, в чашках Петри диаметром 40 мм. Чашки инкубировали в течение ночи (+37 °C), затем подсчитывали число выросших колоний. Выживаемость бактерий выражали в % от числа колоний, соответствующих контрольным пробам без добавления пептидов и ионов металлов.

Нарушение структурной целостности бактериальной оболочки в присутствии пептидов оценивали с помощью окрашивания клеток йодидом пропидия, образующего флуоресцирующий комплекс с нуклеиновыми кислотами, но не способного проникать через интактные мембранны [45, 46]. В лунки плоскодонного планшета («Jet Bio-Filtration», Китай) вносили суспензию бактериальных клеток (*L. monocytogenes* или *Ps. aeruginosa* в логарифмической фазе роста; конечная концентрация –  $\sim 2,5 \times 10^7$  колониеобразующих единиц на 1 мл) и раствор пептида в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4); общий объем – 100 мкл. Планшет инкубировали при +37 °C в течение часа с перемешиванием на шейкере, затем добавляли 2 мкл 750 мКМ раствора йодида пропидия и инкубировали при комнатной температуре еще 15 мин. Флуоресценцию измеряли на приборе SpectraMax Gemini EM («Molecular Devices», США), длина волны возбуждения – 535 нм, эмиссии – 615 нм. Из полученных значений интенсивности флуоресценции вычитали значение фоновой флуоресценции йодида пропидия в буфере и выражали их в процентах по отношению к пробе с положительным контролем. Для получения

этой пробы к бактериальным клеткам добавляли изопропанол до конечной концентрации 50% и инкубировали в течение часа. Перед внесением в планшет и добавлением йодида пропидия контрольную пробу центрифугировали и ресуспендировали осадок в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4).

**Обработка данных и программное обеспечение.** При определении антимикробной активности в каждой серии экспериментов проводили не менее трех независимых опытов. Данные обрабатывали с помощью языка R v4.3.0 в интегрированной среде разработки RStudio v2023.03.0. Для визуализации данных использовали пакеты ggplot2 v3.4.2 и ggrepel v0.6.0. На рисунках результаты представлены в виде экспериментальных точек и среднего арифметического.

Теоретическую моноизотопную молярную массу пептидов рассчитывали при помощи сервера Peptide Mass Calculator (<https://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>). Для расчета заряда пептидов при различных значениях pH использовали пакет Peptides v2.4.5 [47]. Трехмерную структуру белка С3 [48] визуализировали с помощью программы Visual Molecular Dynamics v1.9.3 (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) [49]. Предсказание наличия и положения β-поворота в молекуле пептида осуществляли при помощи сервера NetTurnP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetTurnP-1.0/>) [50].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Синтез пептидов.** Перечень синтезированных пептидов, их первичные структуры и характеристики приведены в табл. 1. Результаты аналитической ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа приведены на рис. П1 и П2 в Приложении.

**Структурная характеристика С3f.** Результаты спектроскопии КД показали, что спектры образцов С3f при отсутствии и в присутствии ZnCl<sub>2</sub> имеют одинаковую форму (рис. 1).

Оценка компонентов вторичной структуры С3f по спектральным данным алгоритмом BeStSel показала, что пептид содержит антипараллельный β-складчатый слой, но значительная часть молекулы представлена неупорядоченной структурой. При сравнении спектров пептида при отсутствии и в присутствии ионов цинка изменения содержания структурных элементов не наблюдается (табл. 2). С учетом длины пептида (17 а.о.) можно утверждать, что молекула С3f содержит антипараллельную β-шпильку, включающую по 3 а.о. в каждом из тяжей, соединенных β-поворотом из 4 а.о.; остальные 7 а.о. участвуют в формировании неупорядоченных структур.

**Таблица 1.** Синтезированные пептиды и их характеристики

Пептид	Первичная структура	Молярная масса, г/моль	Молярная масса, MALDI, г/моль	Чистота, %
C3f	SSKITHRIHWESASLLR	2020,09	2021,06	97,34
C3f[H/K]	SSKITKRIKWESASLLR	2002,16	2003,22	97,18
C3f[H/S]	SSKITSRISWESASLLR	1920,03	1920,99	98,95

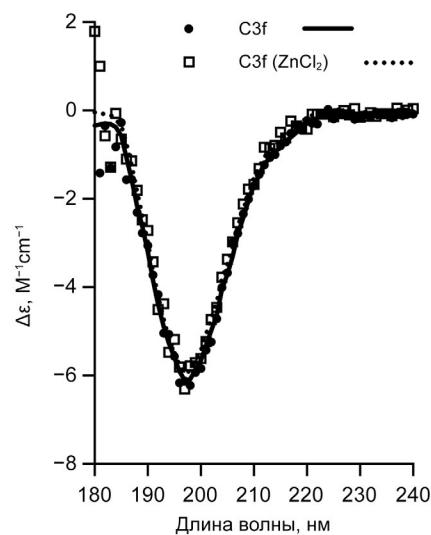
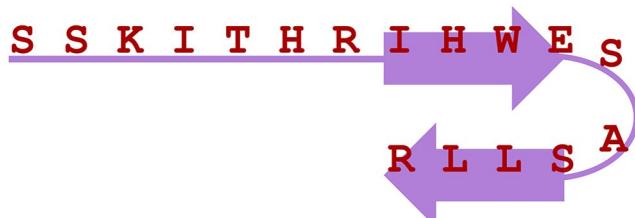
Примечание. Молярная масса – теоретическая моноизотопная молярная масса пептида; молярная масса, MALDI – моноизотопная молярная масса однозарядного иона ( $M + H$ )<sup>+</sup>, экспериментально определенная масс-спектрометрией. Чистоту препаратов пептидов определяли с помощью ОФ ВЭЖХ.

**Таблица 2.** Количественная оценка содержания элементов вторичной структуры C3f (в %) при отсутствии и в присутствии ZnCl<sub>2</sub> с помощью алгоритма BeStSel

Тип вторичной структуры	C3f без ZnCl <sub>2</sub>	C3f в присутствии ZnCl <sub>2</sub>
α-Спираль	0	0
Антипараллельный β-лист	33,8	35,5
Параллельный β-лист	0	0
β-Изгиб	22,1	22,1
Неупорядоченные структуры	44,1	42,5

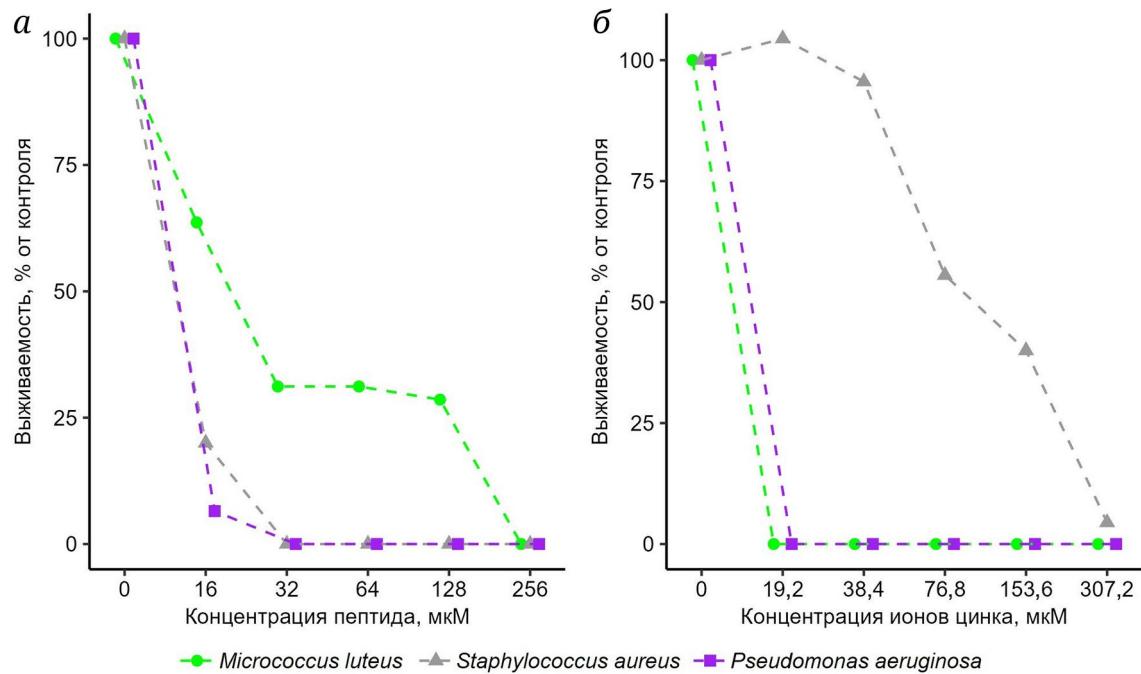
По результатам предсказания β-изгиба сервером NetTurnP можно предположить, что антипараллельная β-шпилька локализуется в C-концевом участке пептида, а β-поворот с наибольшей вероятностью приходится на область WESAS (табл. П1 в Приложении). N-Концевой участок пептида образует неупорядоченные структуры. Предположительное расположение элементов вторичной структуры в полипептидной цепи C3f представлено на рис. 2.

**Антибиотическая активность пептидов в различных условиях.** В предшествующей работе наиболее чувствительными к антибиотическому действию C3f бактериями оказались *L. monocytogenes* и *M. luteus* [20]. В настоящем исследовании мы расширили спектр исследованных микробов и обнаружили активность C3f против *St. aureus* и *Ps. aeruginosa*, как минимум не уступающую активности против *L. monocytogenes* (рис. 3, а; рис. 4, б). Тем не менее из четырех перечисленных видов бактерий только *L. monocytogenes* оказалась устойчивой к действию ионов Zn<sup>2+</sup>, а также ионов Cu<sup>2+</sup> (рис. 3, б; рис. 4, а). Поэтому именно *L. monocytogenes* была выбрана в качестве основного объекта для исследования антибиотической активности пеп-

**Рис. 1.** Спектры КД пептида C3f при отсутствии и в присутствии ZnCl<sub>2</sub>**Рис. 2.** Предполагаемая вторичная структура C3f

тида в различных условиях, включая присутствие ионов металлов.

При отсутствии ионов цинка пептид C3f проявлял антибиотическую активность в отношении *L. monocytogenes*, зависящую от концентрации, причем в присутствии 16 мкМ пептида выживаемость бактерии составляла около половины от контрольного уровня, а в присутствии 32 мкМ она была близка к нулю. Активность C3f в присутствии 20%-ного молярного избытка Zn<sup>2+</sup> заметно усиливалась: 2-кратное снижение выживаемости достигалось уже в присутствии 4 мкМ пептида, а при 16 мкМ наблюдалась почти полная утрата



**Рис. 3.** Антимикробная активность пептида С3f и ионов цинка в отношении *M. luteus*, *St. aureus* и *Ps. aeruginosa*. а – Выживаемость бактерий в присутствии С3f; б – выживаемость бактерий в присутствии Zn<sup>2+</sup>.

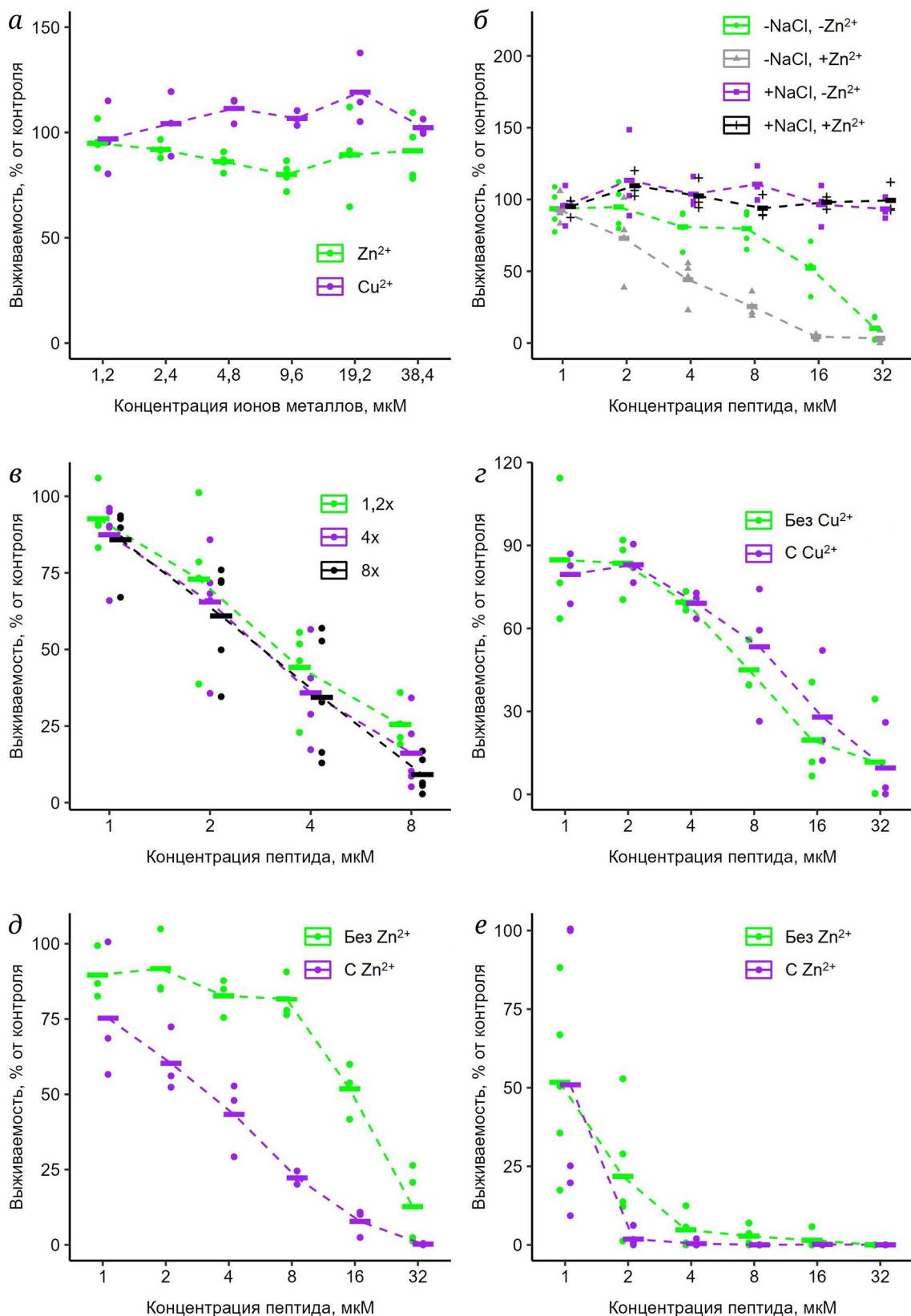
жизнеспособности бактерии. Добавление в буфер 0,15 М NaCl полностью ингибирировало антимикробную активность С3f независимо от присутствия Zn<sup>2+</sup> (рис. 4, б). Увеличение концентрации Zn<sup>2+</sup> до 4-кратного и 8-кратного молярного избытка по отношению к пептиду не приводило к усилению антимикробной активности С3f в большей степени, чем в присутствии 20%-ного избытка ионов цинка (рис. 4, в). В отличие от Zn<sup>2+</sup>, ионы Cu<sup>2+</sup> влияния на антимикробное действие С3f не оказывали (рис. 4, г).

Пептид С3f[H/S] обладал сопоставимой с исходным пептидом активностью в отношении *L. monocytogenes*. Несмотря на отсутствие остатков гистидина в структуре пептида, ионы Zn<sup>2+</sup> заметно усиливали его активность (рис. 4, д). Пептид С3f[H/K] проявлял более выраженное антимикробное действие: почти полное ингибирование роста бактерий достигалось уже при 8 мкМ пептида. Ионы Zn<sup>2+</sup> также в некоторой степени усиливали его действие (рис. 4, е).

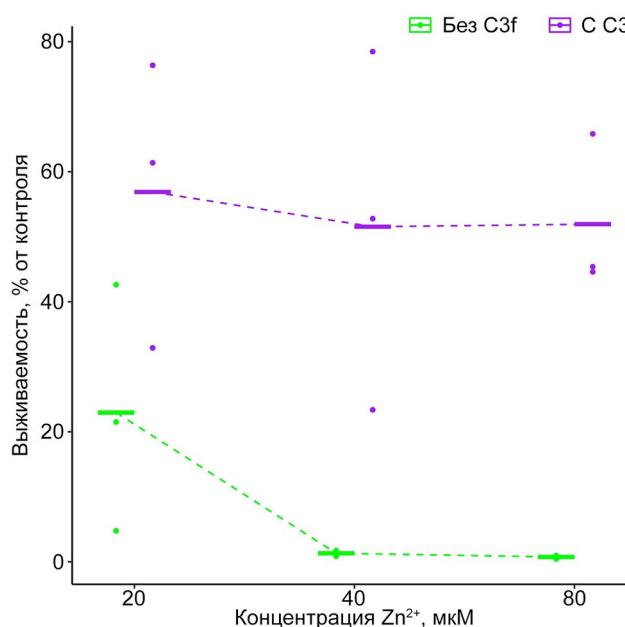
Бактерия *E. coli* ESBL 521/17, так же как *M. luteus*, *St. aureus* и *Ps. aeruginosa*, проявляет чувствительность к ионам цинка, но при этом она устойчива к действию самого С3f. ZnCl<sub>2</sub> в концентрациях 20–80 мкМ приводил к выраженному снижению выживаемости бактерии, однако присутствие С3f противостояло этому эффекту (рис. 5).

Зависимость антимикробной активности пептидов в отношении *L. monocytogenes* от pH исследовали в диапазоне значений pH 4,5–8,0. По результатам предварительных экспериментов

в этих условиях бактерия обладает одинаковой выживаемостью (данные не показаны). Характер зависимости антимикробной активности С3f в отношении *L. monocytogenes* от значения pH буферного раствора оказался противоположным ожидаемому. В концентрации 16 мкМ пептид не проявлял усиления антимикробной активности при снижении pH от 8,0 до 6,0. В более высоких концентрациях (32 и 64 мкМ) пептид приводил к почти полному ингибированию роста бактерии в диапазоне pH 5,5–8,0, однако при pH 5,0 бактерия оказалась резистентной к действию С3f; некоторое снижение устойчивости наблюдали при pH 4,5 (рис. 6, а). Предположив, что такой результат принципиально может быть обусловлен особенностями либо антимикробного действия пептида, либо *L. monocytogenes* как модельного объекта, провели две серии опытов. В первой серии (рис. 6, б) протестировали действие АМП, отличающихся от С3f по структуре, а именно HNP. Во второй – протестировали действие С3f против другого объекта – *M. luteus* (рис. 6, в). Оказалось, что *L. monocytogenes* похожим образом обладает устойчивостью к действию HNP при pH 6,0 с дальнейшим снижением устойчивости при pH 5,0. *M. luteus* оказался более чувствительным к кислотности среды сам по себе, из-за чего не проводили эксперименты с ним при pH ниже 6,0. Против *M. luteus* С3f действовал ожидаемым образом, то есть его активность была заметно выше при более низких значениях pH, чем при более высоких. Такую закономерность четко наблюдали



**Рис. 4.** Антимикробная активность C3f и его аналогов в отношении *L. monocytogenes* при отсутствии и в присутствии ионов металлов. *a* – Выживаемость бактерий в присутствии Zn<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup>; *б* – действие C3f в зависимости от присутствия Zn<sup>2+</sup> и 0,15 М NaCl; *в* – действие C3f при различном молярном избытке Zn<sup>2+</sup>; *г* – действие C3f в зависимости от присутствия Cu<sup>2+</sup>; *д* и *е* – действие C3f[H/S] и C3f[H/K] при отсутствии и в присутствии Zn<sup>2+</sup>

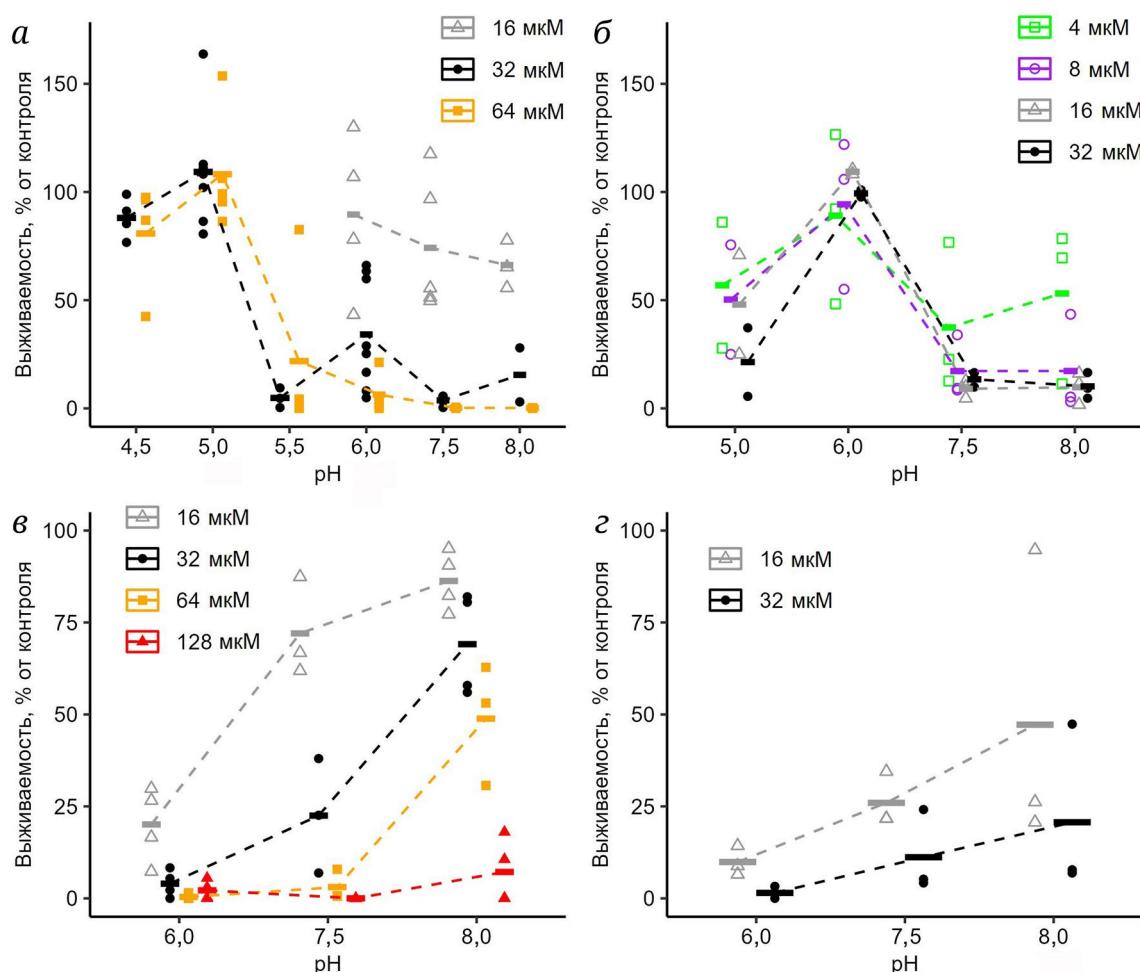


**Рис. 5.** Антимикробное действие  $ZnCl_2$  в отношении *E. coli* ESBL 521/17 при отсутствии и в присутствии 20%-ного молярного избытка C3f

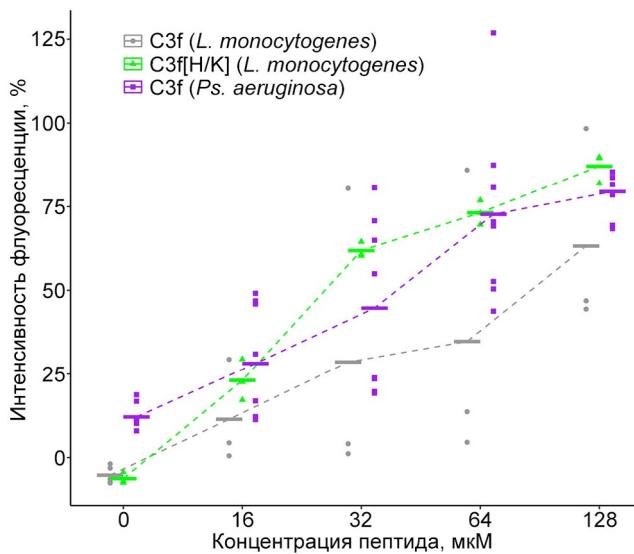
для концентраций 16–64 мкМ, а для 128 мкМ пептида выявили почти полное ингибиование роста при всех трех значениях pH, хотя и в этой концентрации активность была несколько снижена при pH 8,0.

Пептид C3f[H/K] также был более активен в отношении *M. luteus* при более низких значениях pH (рис. 6, г). Вместе с тем зависимость его активности от pH оказалась менее выраженной по сравнению с исходным пептидом. В частности, C3f в концентрации 32 мкМ приводил к почти полному ингибиованию роста бактерий при pH 6,0 и к выживаемости ~70% бактерий при pH 8,0, в то время как для 16 мкМ более активного C3f[H/K] при тех же значениях pH наблюдали 10%-ную и 50%-ную выживаемость бактерий (рис. 6, в и г).

При действии C3f на *L. monocytogenes* и *Ps. aeruginosa* происходит дезинтеграция бактериальных мембран, поскольку в экспериментах с использованием йодида пропиdia наблюдалось зависящее от концентрации повышение интенсивности флуоресценции в пробах, содержащих



**Рис. 6.** Антимикробная активность пептидов при различных значениях pH. *а* – Действие C3f в отношении *L. monocytogenes*; *б* – действие HNP в отношении *L. monocytogenes*; *в* и *г* – действие C3f и C3f[H/K] в отношении *M. luteus*



**Рис. 7.** Действие пептидов на проницаемость мембран бактериальных клеток, выявляемое по флуоресценции комплекса йодида пропидия с нуклеиновыми кислотами

16–128 мкМ пептида (рис. 7). Пептид C3f[H/K] приводил к более выраженному усилению флуоресценции в пробах с *L. monocytogenes* по сравнению с C3f. При отсутствии бактериальных клеток пептиды, взятые в максимальных концентрациях, не приводили к усилению сигнала (данные не показаны).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пептид C3f не обладает однозначно установленными физиологическими функциями, и, вероятно, по этой причине не привлекает большого внимания исследователей. Насколько нам известно, в настоящей работе пространственная структура C3f была экспериментально исследована впервые. В предшествующей работе, основываясь на предсказании *in silico*, мы предположили  $\alpha$ -спиральную конформацию C3f [20], однако анализ структуры пептида методом спектроскопии КД не выявил участков  $\alpha$ -спирали в молекуле. Результаты показывают, что пептид содержит участок с неупорядоченной структурой и антипараллельную  $\beta$ -шпильку (табл. 2), локализованные, по всей видимости, в N- и C-концевых частях молекулы соответственно (рис. 2). Нельзя исключать, что расхождения между данными моделирования и спектроскопии КД объясняются зависимостью структуры пептида от условий (растворитель, липидное окружение, концентрация, олигомеризация). Известно, что многие АМП, имеющие неупорядоченную структуру в водных растворах, приобретают конформа-

цию  $\alpha$ -спирали при контакте с липидными мембранами [51].

Склонность аминокислотной последовательности C3f к формированию  $\beta$ -складчатой структуры косвенно подтверждается конформацией участка полипептидной цепи белка C3, соответствующего пептиду. Этот участок занимает позиции 1282–1298 в пределах преимущественно  $\beta$ -структурного домена CUB<sup>f</sup>  $\alpha$ -цепи молекулы C3. Остатки SSK переходят в тяж ITHRIH поверхностного антипараллельного  $\beta$ -слоя, за которыми следует линкерная последовательность WESASL, а остатки LR, соответствующие C-концу C3f, входят в состав тяжа, принадлежащего другому, более глубокому, антипараллельному  $\beta$ -слою. Таким образом, в составе C3  $\beta$ -складчатая структура не формируется за счет водородных связей между остатками, составляющими сам фрагмент C3f (рис. П3 в Приложении).

Наше предположение о способности пептида C3f связывать ионы цинка не получило экспериментального подтверждения методом спектроскопии КД: присутствие Zn<sup>2+</sup> не оказывало заметного влияния на конформацию пептида (рис. 1). Тем не менее такой результат не опровергает возможность взаимодействия C3f с Zn<sup>2+</sup>. Пептид может изначально находиться в благоприятной для связывания Zn<sup>2+</sup> конформации, либо индуцируемые конформационные изменения могут затрагивать только N-концевой участок, не содержащий элементов упорядоченной вторичной структуры, и не отражаться в спектре КД.

В данной работе мы подтвердили бактерицидное действие C3f в отношении *L. monocytogenes* и *M. luteus* с хорошим соответствием данным, полученным ранее другим методом [20]. Кроме того, мы впервые показали антимикробную активность C3f против *St. aureus* и *Ps. aeruginosa* (рис. 3, а). Стоит отметить, что ранее была описана активность C3f только в отношении грамположительных бактерий, но в настоящей работе именно грамотрицательная *Ps. aeruginosa* проявила наибольшую чувствительность.

Мы уточнили характер антимикробного действия C3f в отношении *L. monocytogenes*, прилизив условия к реализующимся в очаге воспаления. Добавление 0,15 М NaCl полностью ингибировало бактерицидный эффект пептида (рис. 4, б), что указывает на важность электростатических взаимодействий с компонентами бактериальной оболочки в реализации действия C3f. Ингибирование антимикробной активности физиологическими значениями ионной силы характерно для многих умеренно катионных АМП, например, некоторых  $\alpha$ -дефенсинов [52]. Значимость электростатических взаимодействий также согласуется с уровнем антимикробной активности исходного

пептида C3f в сравнении с его аналогами. Антимикробная активность более катионного C3f[H/K] была значительно более выраженной, чем исходного C3f и C3f[H/S] (рис. 4, б, д и е).

В присутствии 20%-ного молярного избытка Zn<sup>2+</sup> активность C3f возрастила. В то же время добавление ионов Cu<sup>2+</sup>, уровень которых повышается при воспалении, не влияло на активность пептида, что показывает специфичность эффекта по отношению к природе двухвалентного катиона металла (рис. 4, б и г). Важно отметить, что повышенная активность C3f наблюдалась при концентрациях ионов цинка, не превышающих его уровень в плазме крови человека, который составляет ~20 мкМ [24]. В соответствии с предложенным ранее механизмом для связывающих цинк АМП [39] можно предположить, что возрастание антимикробной активности C3f в присутствии Zn<sup>2+</sup> вызвано образованием комплекса пептида с ионами, что повышает суммарный заряд пептида и аффинность к бактериальной мембране. Поскольку увеличение концентрации ионов цинка не приводило к дальнейшему возрастанию активности C3f (рис. 4, в), комплекс пептида с Zn<sup>2+</sup>, вероятно, формируется в стехиометрическом соотношении 1/1 подобно тому, как это было показано для гистатинов и клаванинов [37, 38]. Также эти данные свидетельствуют об относительно высокой аффинности предполагаемого взаимодействия C3f и Zn<sup>2+</sup>. Для оценки роли остатков гистидина во взаимодействии пептида с ионами цинка исследовали также антимикробную активность синтетических аналогов C3f. Ионы цинка усиливали антимикробную активность не только исходного пептида, но и его аналогов с замещенными остатками гистидина (рис. 4, д и е). Это позволяет предположить основной вклад в связывание Zn<sup>2+</sup> не столько гистидинов, сколько других остатков C3f, в первую очередь глутаминовой кислоты, боковая группа которой участвует в координации ионов цинка у многих белков [53], или α-карбоксильной группы C-концевого аргинина. Усиливающее действие Zn<sup>2+</sup> на активность C3f[H/K] оказалось менее выраженным, чем на активность исходного пептида и C3f[H/S], однако это может быть связано с более высокой собственной активностью C3f[H/K].

Несмотря на показанную нами ранее устойчивость *E. coli* к антимикробному действию C3f [20], токсичность ионов цинка для некоторых штаммов *E. coli* [54, 55] дала возможность исследования совместного действия C3f и Zn<sup>2+</sup> в отношении этого вида бактерий. Действительно, *E. coli* ESBL 521/17 была чувствительна к Zn<sup>2+</sup>, но присутствие C3f повышало выживаемость бактерии (рис. 5), что может объясняться нейтрализацией антимикробных свойств Zn<sup>2+</sup> вследствие его связывания пептидом.

Протонирование АМП при снижении pH среды способно усилить их действие (теоретические значения зарядов C3f, C3f[H/K], C3f[H/S] и HNP1 при разных значениях pH приведены в табл. П2 в Приложении). Исследуя активность C3f в отношении *L. monocytogenes*, против ожиданий мы выявили выраженное возрастание устойчивости бактерии при снижении pH с 8,0 до 5,0 с некоторой потерей устойчивости при pH 4,5 (рис. 6, а). Для HNP, структурно отличающихся от C3f АМП, паттерн зависимости их антимикробной активности от pH в отношении *L. monocytogenes* выглядел сходным образом (рис. 6, б). Ранее были опубликованы аналогичные результаты о действии АМП Css54 из яда скорпиона *Centruroides suffuses*, активность которого против *L. monocytogenes* слабо падает при снижении pH с 10 до 6 и затем несколько возрастает при pH 4 [56]. Эти данные указывают на уникальность *L. monocytogenes* как модельного объекта для такого рода исследований. Действительно, на протяжении жизненного цикла эта бактерия существует в широком диапазоне pH и после кислотной адаптации проявляет устойчивость к действию лантибиотика низина [57–60]. На другом объекте, *M. luteus*, мы наблюдали закономерное возрастание антимикробной активности C3f при снижении pH (рис. 6, в). Сходную, но менее выраженную зависимость от pH продемонстрировал и пептид C3f[H/K] (рис. 6, г). Разница между двумя пептидами может объясняться более сильным возрастанием заряда C3f по сравнению с C3f[H/K] при снижении pH с 8,0 до 6,0 (табл. П2 в Приложении), что обусловлено наличием двух остатков гистидина в молекуле C3f.

Мы изучили механизм антимикробного действия C3f и C3f[H/K] против грамположительной бактерии *L. monocytogenes*, а также C3f против грамотрицательной *Ps. aeruginosa*. Увеличение сигнала флуоресценции в экспериментах с йодидом пропиdia (рис. 7) свидетельствует о нарушении структурной целостности бактериальных мембран и находится в соответствии с данными об ингибирующей роли NaCl (рис. 4, б). Поскольку для проникновения красителя в цитоплазму грамотрицательной бактерии ему необходимо последовательно преодолеть и наружную, и внутреннюю мембранны, можно заключить, что C3f нарушает барьерные свойства обеих мембран *Ps. aeruginosa*. В опытах по оценке структурной целостности бактериальных мембран использовали более высокие концентрации пептидов, чем в опытах по определению антимикробной активности методом подсчета колоний, что отражает различную концентрацию бактериальных клеток. При этом в экспериментах обоих типов более катионный пептид C3f[H/K] оказался более эффективным по сравнению с C3f (рис. 4, б и е; рис. 7).

Таким образом, электростатические взаимодействия пептида с мембраной и последующий ее лизис лежат в основе механизма антимикробного действия C3f.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые охарактеризована пространственная структура пептида C3f, производного белка C3 системы комплемента. Наряду с неупорядоченной структурой молекула пептида включает антипараллельную  $\beta$ -шпильку, локализованную, по-видимому, в C-концевой области.

Ранее мы показали наличие у C3f антимикробных свойств [20]. В настоящей работе установлен мембранолитический механизм антимикробного действия C3f. В то же время можно сделать вывод о слабой физиологической значимости C3f как эндогенного АМП. Несмотря на то что ряд факторов, которые могут действовать в условиях воспаления (пониженные значения pH, присутствие ионов цинка), повышают активность пептида, физиологические значения ионной силы ее ингибируют. Если а-дефенсины, которые также инактивируются солью, вероятно, выполняют антимикробную функцию в фагосомной вакуоли нейтрофилов [26], то C3f вряд ли достигает достаточно высоких локальных концентраций в организме, чтобы преодолевать ингибирующее действие ионной силы.

Некоторые полученные данные (повышение антимикробной активности C3f в отношении *L. monocytogenes* в присутствии Zn<sup>2+</sup>, ингибирование пептидом активности Zn<sup>2+</sup> в отношении *E. coli*) косвенно свидетельствуют о взаимодействии C3f с ионами цинка. С другой стороны, присутствие Zn<sup>2+</sup> не приводило к изменению спектра КД пептида, а усиление антимикробной активности имело

место не только для C3f, но и для его аналогов, лишенных гистидина. На основании полученных результатов мы предполагаем гистидин-независимое формирование комплексов C3f-Zn<sup>2+</sup> в стехиометрическом соотношении 1/1, приводящее к повышению суммарного заряда и активности пептида. Необходимо проведение дальнейших исследований, например, методом ЯМР-спектроскопии, чтобы сделать однозначный вывод о возможности связывания ионов цинка пептидом C3f.

**Вклад авторов.** И.А. Кренев – дизайн исследования, исследование антимикробной активности, написание статьи; Е.В. Егорова – исследование антимикробной активности, написание статьи; М.М. Хайдукова – синтез и очистка пептидов; А.Д. Микушина – проведение КД-спектроскопии; Я.А. Забродская – проведение масс-спектрометрии; А.С. Комлев – методология; И.Е. Елисеев – методология, обсуждение результатов; О.В. Шамова – координация работы, обсуждение результатов; М.Н. Берлов – дизайн исследования, координация работы, обсуждение результатов, написание статьи. Все авторы прочитали и утвердили окончательный вариант статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание № 122020300189-6).

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

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L. T. (2015) Complement system Part I – Molecular mechanisms of activation and regulation, *Front. Immunol.*, **6**, 262, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>.
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L. T. (2015) Complement system Part II: role in immunity, *Front. Immunol.*, **6**, 257, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>.
- Xie, C. B., Jane-Wit, D., and Pober, J. S. (2020) Complement membrane attack complex: new roles, mechanisms of action, and therapeutic targets, *Am. J. Pathol.*, **190**, 1138-1150, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.02.006>.
- Егорова Е. В., Кренев И. А., Оборин Н. Н., Берлов М. Н. (2023) Антимикробная активность системы комплемента, *Мед. Акад. Журн.*, **23**, 31-45, <https://doi.org/10.17816/MAJ322841>.
- Radek, K., and Gallo, R. (2007) Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system, *Semin. Immunopathol.*, **29**, 27-43, <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0064-5>.
- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., and Mirnejad, R. (2018) Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria, *Microb. Drug Resist.*, **24**, 747-767, <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>.

7. Zhang, Q. Y., Yan, Z. B., Meng, Y. M., Hong, X. Y., Shao, G., Ma, J. J., Cheng, X. R., Liu, J., Kang, J., and Fu, C. Y. (2021) Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential, *Mil. Med. Res.*, **8**, 48, <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>.
8. Safranova, V. N., Bolosov, I. A., Panteleev, P. V., Balandin, S. V., and Ovchinnikova, T. V. (2023) Therapeutic potential and prospects of application of peptides in the era of the global spread of antibiotic resistance, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **49**, 435-447, <https://doi.org/10.1134/S1068162023030172>.
9. Wang, G. (2014) Human antimicrobial peptides and proteins, *Pharmaceuticals*, **7**, 545-594, <https://doi.org/10.3390/ph7050545>.
10. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., and Yi, H. (2020) Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields, *Front. Microbiol.*, **11**, 582779, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.
11. Zimmer, J., Hobkirk, J., Mohamed, F., Browning, M. J., and Stover, C. M. (2015) On the functional overlap between complement and anti-microbial peptides, *Front. Immunol.*, **5**, 689, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00689>.
12. Nordahl, E. A., Rydengård, V., Nyberg, P., Nitsche, D. P., Mörgelin, M., Malmsten, M., Björck, L., and Schmidtchen, A. (2004) Activation of the complement system generates antibacterial peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 16879-16884, <https://doi.org/10.1073/pnas.0406678101>.
13. Pasupuleti, M., Walse, B., Nordahl E., Mörgelin, M., Malmsten, M., and Schmidtchen A. (2007) Preservation of antimicrobial properties of complement peptide C3a, from Invertebrates to Humans, *J. Biol. Chem.*, **282**, 2520-2528, <https://doi.org/10.1074/jbc.M607848200>.
14. Lachmann, P. J. (2019) The story of complement factor I, *Immunobiology*, **224**, 511-517, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.05.003>.
15. Harrison, R. A., Farries, T. C., Northrop, F. D., Lachmann, P. J., and Davis, A. E. (1988) Structure of C3f, a small peptide specifically released during inactivation of the third component of complement, *Complement*, **5**, 27-32, <https://doi.org/10.1159/000463028>.
16. Ganu, V. S., Müller-Eberhard, H. J., and Hugli, T. E. (1989) Factor C3f is a spasmogenic fragment released from C3b by factors I and H: the heptadeca-peptide C3f was synthesized and characterized, *Mol. Immunol.*, **10**, 939-948, [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(89\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0161-5890(89)90112-0).
17. Dousset, B., Straczek, J., Maachi, F., Nguyen, D. L., Jacob, C., Capiaumont, J., Nabet, P., and Belleville, F. (1998) Purification from human plasma of a hexapeptide that potentiates the sulfation and mitogenic activities of insulin-like growth factors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 587-591, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8834>.
18. Xiang, Y., Matsui, T., Matsuo, K., Shimada, K., Tohma, S., Nakamura, H., Masuko, K., Yudoh, K., Nishioka, K., and Kato, T. (2007) Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: complement C3f-des-arginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells, *Arthritis Rheum.*, **56**, 2018-2030, <https://doi.org/10.1002/art.22645>.
19. Ourradi, K., Xu, Y., de Seny, D., Kirwan, J., Blom, A., and Sharif, M. (2017) Development and validation of novel biomarker assays for osteoarthritis. *PloS One*, **12**, e0181334, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181334>.
20. Pozolotin, V. A., Umnyakova, E. S., Kopeykin, P. M., Komlev, A. S., Dubrovskii, Y. A., Krenev, I. A., Shamova, O. V., and Berlov, M. N. (2021) Evaluation of antimicrobial activity of the C3f peptide, a derivative of human C3 protein, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **47**, 741-748, <https://doi.org/10.1134/S1068162021030158>.
21. Dubos, R. J. (1955) The micro-environment of inflammation or Metchnikoff revisited, *Lancet*, **266**, 1-5, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(55\)93374-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(55)93374-2).
22. Lardner, A. (2001) The effects of extracellular pH on immune function, *J. Leukoc. Biol.*, **69**, 522-530, <https://doi.org/10.1189/jlb.69.4.522>.
23. Milanino, R., Marrella, M., Gasperini, R., Pasqualicchio, M., and Velo, G. (1993) Copper and zinc body levels in inflammation: an overview of the data obtained from animal and human studies, *Agents Actions*, **39**, 195-209, <https://doi.org/10.1007/bf01998974>.
24. Sugarman, B. (1983) Zinc and infection, *Rev. Infect. Dis.*, **5**, 137-147, <https://doi.org/10.1093/clinids/5.1.137>.
25. Eijkelpamp, B. A., Morey, J. R., Neville, S. L., Tan, A., Pederick, V. G., Cole, N., Singh, P. P., Ong, C. Y., Gonzalez de Vega, R., Clases, D., Cunningham, B. A., Hughes, C. E., Comerford, I., Brazel, E. B., Whittall, J. J., Plumptre, C. D., McColl, S. R., Paton, J. C., McEwan, A. G., Doble, P. A., and McDevitt, C. A. (2019) Dietary zinc and the control of *Streptococcus pneumoniae* infection, *PLoS Pathog.*, **15**, e1007957, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007957>.
26. Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., and Hancock, R. E. W. (2005) A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **6**, 35-51, <https://doi.org/10.2174/1389203053027494>.
27. Malik, E., Dennison, S. R., Harris, F., and Phoenix, D. A. (2016) pH dependent antimicrobial peptides and proteins, their mechanisms of action and potential as therapeutic agents, *Pharmaceuticals*, **9**, 67, <https://doi.org/10.3390/ph9040067>.

28. Li, S., and Hong, M. (2011) Protonation, tautomerization, and rotameric structure of histidine: a comprehensive study by magic-angle-spinning solid-state NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 1534-1544, <https://doi.org/10.1021/ja108943n>.
29. Xu, T., Levitz, S. M., Diamond, R. D., and Oppenheim, F. G. (1991) Anticandidal activity of major human salivary histatins, *Infect. Immun.*, **59**, 2549-2554, <https://doi.org/10.1128/iai.59.8.2549-2554.1991>.
30. Mochon, A. B., and Liu, H. (2008) The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm, *PLoS Pathog.*, **4**, e1000190, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000190>.
31. Maisetta, G., Petruzzelli, R., Brancatisano, F. L., Esin, S., Vitali, A., Campa, M., and Batoni, G. (2010) Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: Effect of copper and acidic pH, *Peptides*, **31**, 1995-2002, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.08.007>.
32. Holdbrook, D. A., Singh, S., Choong, Y. K., Petrlova, J., Malmsten, M., Bond, P. J., Verma, N. K., Schmidtchen, A., and Saravanan, R. (2018) Influence of pH on the activity of thrombin-derived antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1860**, 2374-2384, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.06.002>.
33. McDonald, M., Mannion, M., Pike, D., Lewis, K., Flynn, A., Brannan, A. M., Browne, M. J., Jackman, D., Madera, L., Power Coombs, M. R., Hoskin, D. W., Rise, M. L., and Booth, V. (2015) Structure-function relationships in histidine-rich antimicrobial peptides from Atlantic cod, *Biochim. Biophys. Acta*, **1848**, 1451-1461, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.030>.
34. Shang, D., Sun, Y., Wang, C., Wei, S., Ma, L., and Sun, L. (2012) Membrane interaction and antibacterial properties of chensinin-1, an antimicrobial peptide with atypical structural features from the skin of *Rana chensinensis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **96**, 1551-1560, <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4148-3>.
35. Alexander, J. L., Thompson, Z., and Cowan, J. A. (2018) Antimicrobial metallopeptides, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 844-853, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00989>.
36. Donaghy, C., Javellana, J. G., Hong, Y. J., Djoko, K., and Angeles-Boza, A. M. (2023) The synergy between zinc and antimicrobial peptides: an insight into unique bioinorganic interactions, *Molecules*, **28**, 2156, <https://doi.org/10.3390/molecules28052156>.
37. Miller, A., Matera-Witkiewicz, A., Mikołajczyk, A., Wieczorek, R., and Rowińska-Żyrek, M. (2021) Chemical “butterfly effect” explaining the coordination chemistry and antimicrobial properties of clavanin complexes, *Inorg. Chem.*, **60**, 12730-12734, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c02101>.
38. McCaslin, T. G., Pagba, C. V., Yohannan, J., and Barry, B. A. (2019) Specific metallo-protein interactions and antimicrobial activity in Histatin-5, an intrinsically disordered salivary peptide, *Sci. Rep.*, **9**, 17303, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52676-7>.
39. Rydengård, V., Andersson, E. N., and Schmidtchen, A. (2006) Zinc potentiates the antibacterial effects of histidine-rich peptides against *Enterococcus faecalis*, *FEBS J.*, **273**, 2399-2406, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05246.x>.
40. Edström, A. M., Malm, J., Frohm, B., Martellini, J. A., Giwercman, A., Mörgelin, M., Cole, A. M., and Sørensen, O. E. (2008) The major bactericidal activity of human seminal plasma is zinc-dependent and derived from fragmentation of the semenogelins, *J. Immunol.*, **181**, 3413-3421, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3413>.
41. Juliano, S. A., Pierce, S., deMayo, J. A., Balunas, M. J., and Angeles-Boza, A. M. (2017) Exploration of the innate immune system of *Styela clava*: Zn<sup>2+</sup> binding enhances the antimicrobial activity of the tunicate peptide clavanin A, *Biochemistry*, **56**, 1403-1414, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01046>.
42. Fields, G. B., and Noble, R. L. (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 161-214, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x>.
43. Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y. H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. (2018) BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W315-W322, <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>.
44. Berlov, M. N., Korableva, E. S., Andreeva, Yu. V., Ovchinnikova, T. V., and Kokryakov, V. N. (2007) Lactoferrin from canine neutrophils: isolation and physicochemical and antimicrobial properties, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 445-451, <https://doi.org/10.1134/S0006297907040128>.
45. Gant, V. A., Warnes, G., Phillips, I., and Savidge, G. F. (1993) The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics, *J. Med. Microbiol.*, **39**, 147-154, <https://doi.org/10.1099/00222615-39-2-147>.
46. Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., and Ren, Q. (2015) Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide, *BMC Microbiol.*, **15**, 36, <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>.
47. Osorio, D., Rondón-Villarreal, P., and Torres, R. (2015) Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides, *RJ*, **7**, 4-14, <https://doi.org/10.32614/rj-2015-001>.

48. Janssen, B. J., Huizinga, E. G., Raaijmakers, H. C., Roos, A., Daha, M. R., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., and Gros, P. (2005) Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity, *Nature*, **437**, 505-511, <https://doi.org/10.1038/nature04005>.
49. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulter, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38, [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
50. Petersen, B., Lundsgaard, C., and Petersen, T. N. (2010) NetTurnP – neural network prediction of beta-turns by use of evolutionary information and predicted protein sequence features, *PLoS One*, **5**, e15079, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015079>.
51. Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers*, **55**, 4-30, [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M).
52. Nagaoka, I., Hirota, S., Yomogida, S., Ohwada, A., and Hirata, M. (2000) Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins, *Inflamm. Res.*, **49**, 73-79, <https://doi.org/10.1007/s00110050561>.
53. Vallee, B. L., and Auld, D. S. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins, *Biochemistry*, **29**, 5647-5659, <https://doi.org/10.1021/bi00476a001>.
54. Li, J., Ren, X., Fan, B., Huang, Z., Wang, W., Zhou, H., Lou, Z., Ding, H., Lyu, J., and Tan, G. (2019) Zinc toxicity and iron-sulfur cluster biogenesis in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e01967-18, <https://doi.org/10.1128/AEM.01967-18>.
55. Brocklehurst, K. R., and Morby, A. P. (2000) Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology, *Microbiology (Reading)*, **146**, 2277-2282, <https://doi.org/10.1099/00221287-146-9-2277>.
56. Park, J., Oh, J. H., Kang, H. K., Choi, M. C., Seo, C. H., and Park, Y. (2020) Scorpion-venom-derived antimicrobial peptide Css54 exerts potent antimicrobial activity by disrupting bacterial membrane of zoonotic bacteria, *Antibiotics (Basel)*, **9**, 831, <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110831>.
57. Dorey, A., Marinho, C., Piveteau, P., and O'Byrne, C. (2019) Role and regulation of the stress activated sigma factor sigma B ( $\sigma^B$ ) in the saprophytic and host-associated life stages of *Listeria monocytogenes*, *Adv. Appl. Microbiol.*, **106**, 1-48, <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.11.001>.
58. Gahan, C. G., O'Driscoll, B., and Hill, C. (1996) Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3128-3132, <https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3128-3132.1996>.
59. Van Schaik, W., Gahan, C. G., and Hill, C. (1999) Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lacticin 3147, *J. Food Prot.*, **62**, 536-539, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.5.536>.
60. Bonnet, M., and Montville, T. J. (2005) Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria, *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**, 237-242, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01661.x>.

## CHARACTERIZATION OF STRUCTURAL PROPERTIES AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMPLEMENT SYSTEM C3f PEPTIDE

**I. A. Krenev<sup>1</sup>, E. V. Egorova<sup>1,2</sup>, M. M. Khaydukova<sup>1,3</sup>, A. D. Mikushina<sup>1,4</sup>,  
Y. A. Zabrodskaya<sup>1,5,6</sup>, A. S. Komlev<sup>1</sup>, I. E. Eliseev<sup>1,4</sup>,  
O. V. Shamova<sup>1,2</sup>, and M. N. Berlov<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, 197022 Saint Petersburg, Russia; e-mail: berlov.mn@iemspb.ru

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University, 199034 Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology,  
192019 Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Alferov University, 194021 Saint Petersburg, Russia

<sup>5</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376 Saint Petersburg, Russia

<sup>6</sup> Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, 195251 Saint Petersburg, Russia

The C3f peptide is a by-product of the regulation of the activated complement system with no firmly established function of its own. We have previously shown that C3f exhibits moderate antimicrobial

activity against some Gram-positive bacteria *in vitro*. The occurrence of two histidine residues in the amino acid sequence of the peptide suggested an enhancement of its antimicrobial activity at lower pH and in the presence of metal cations, particularly zinc cations. Since such conditions can be realized in inflammatory foci, the study of the dependence of C3f activity on pH and the presence of metal cations provides an opportunity to assess the biological significance of the antimicrobial properties of the peptide. The peptide C3f and its analogs with histidine substitutions by lysines or serines, C3f[H/K] and C3f[H/S], were prepared by solid-phase synthesis. Using CD spectroscopy, we found that C3f contained a  $\beta$ -hairpin and unstructured regions; the presence of  $Zn^{2+}$  did not affect the conformation of the peptide. In the present work, it was shown that C3f can also exhibit antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, in particular, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583. The action of the peptide on *Ps. aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* EGD is accompanied by impairment of the barrier function of bacterial membranes.  $Zn^{2+}$  ions, unlike  $Cu^{2+}$  ions, enhanced the antimicrobial activity of C3f against *L. monocytogenes*, with 4- and 8-fold molar excess of  $Zn^{2+}$  being no more effective than a 20% excess. The activity of the C3f analogs was also enhanced to some extent by zinc ions. Thus, we hypothesize a histidine-independent formation of C3f-Zn $^{2+}$  complexes leading to an increase in the total charge and antimicrobial activity of the peptide. In the presence of 0.15 M NaCl, C3f lost its activity regardless of the presence of  $Zn^{2+}$ , indicating a minor role of C3f as an endogenous antimicrobial peptide. The presence of C3f abolished the bactericidal effect of  $Zn^{2+}$  against the zinc-sensitive *Escherichia coli* strain ESBL 521/17, indirectly confirming the interaction of the peptide with  $Zn^{2+}$ . The activity of C3f against *Micrococcus luteus* A270, but not against *L. monocytogenes*, increased with decreasing pH. In this work, we show the significance of factors such as pH and metal cations in realizing the activity of antimicrobial peptides based on the example of C3f.

**Keywords:** innate immunity, complement, antimicrobial peptides, C3f, circular dichroism,  $Zn^{2+}$ , pH-dependent activity