

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

# ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2024. Том 66

2024. Vol. 66

1



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 66, номер 1, 2024

---

---

|   |    |
|---|----|
| Роль малых ГТФаз семейства Rho в регуляции нормальных и патологических процессов<br><i>Д. Е. Бобков, А. В. Лукачева, А. И. Горб, Г. Г. Полянская</i>  | 3  |
| Роль аутофагии и поляризации макрофагов в процессах хронического воспаления и регенерации<br><i>С. Г. Зубова, А. В. Моршнева</i>  | 20 |
| Зависимая от альфа-актинаина-4 регуляция репарации разрывов ДНК не зависит от активности NF- $\kappa$ B<br><i>Д. В. Кригер, Г. В. Васильева, Е. В. Ломерт, Д. Г. Тентлер</i>  | 35 |
| Угнетение экспрессии транскрипционного фактора NRF2, опосредованное miR-155, вызывает снижение жизнеспособности клеток меланомы вне зависимости от редокс-статуса<br><i>В. А. Куценко, Д. А. Дашкова, Т. Г. Рукша</i> | 46 |
| Анализ медленной инактивации каналов $Na_v1.5$ в развитии наследственной патологии сердца<br><i>А. К. Зайцева, К. И. Перепелина, А. А. Костарева</i>  | 54 |
| Взаимодействие pRb и бета-катенина в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы человека<br><i>В. М. Рябов, Н. И. Тяпкин, А. П. Родимцев, О. Г. Люблинская, И. В. Гужова, Б. В. Попов</i>                    | 64 |
| Виментин в клетках Колмера у крыс линии SHR<br><i>Д. Э. Коржевский, В. А. Разенкова, О. В. Кирик</i>  | 77 |
| Исследование нейродегенеративных изменений в области CA1 дорсального гиппокампа у взрослых крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию<br><i>Н. Л. Туманова, Д. С. Васильев, Н. М. Дубровская</i>              | 85 |
| Иммунофлуоресцентное определение дистрофина, актина, легких и тяжелых цепей миозина в мышечных клетках соматической мускулатуры дождевого червя <i>Lumbricus terrestris</i><br><i>Л. Ф. Нуруллин, Е. М. Волков</i>    | 99 |

---

---

# CONTENTS

---

---

## Volume 66, No. 1, 2024

---

---

|   |    |
|---|----|
| The role of the Rho family small GTPases in regulation of normal and pathological processes<br><i>D. E. Bobkov, A. V. Lukacheva, A. I. Gorb, G. G. Poljanskaya</i>                              | 3  |
| The role of autophagy and macrophage polarization in the processes of chronic inflammation and regeneration<br><i>S. G. Zubova, A. V. Morshneva</i>   | 20 |
| ACTN4-dependent regulation of double-strand DNA break repair is independent of NF- $\kappa$ B activity<br><i>D. V. Kriger, G. V. Vasileva, E. V. Lomert, D. G. Tentler</i>                      | 35 |
| Inhibition of NRF2 transcription factor mediated by miR-155 diminishes melanoma cell viability independently of redox status<br><i>V. A. Kutsenko, D. A. Dashkova, T. G. Ruksha</i>             | 46 |
| Analysis of the role of Nav1.5 slow inactivation in the development of inherited cardiac pathology<br><i>K. Zaytseva, K. I. Perepelina, A. A. Kostareva</i>                                     | 54 |
| Interaction of pRb and $\beta$ -catenin in cancer and normal tissue in the human prostate<br><i>V. M. Ryabov, N. I. Tyapkin, A. P. Rodimzev, O. G. Lyublinskaya, I. V. Guzhova, B. V. Popov</i> | 64 |
| Vimentin in Kolmer cells of spontaneously hypertensive rats<br><i>D. E. Korzhevskii, V. A. Razenkova, O. V. Kirik</i>   | 77 |
| Study of neurodegenerative changes in the Ca1 area of the dorsal hippocampus in adult rats after prenatal hyperhomocysteinemia<br><i>N. L. Tumanova, D. S. Vasiliev, N. M. Dubrovskaya</i>      | 85 |
| Immunofluorescent identification of dystrophin, actin, myosin light and heavy chains in somatic muscle cells of earthworm <i>Lumbricus terrestris</i><br><i>L. F. Nurullin, E. M. Volkov</i>    | 99 |

---

---

УДК 576.5:615.2

## РОЛЬ МАЛЫХ ГТФаз СЕМЕЙСТВА Rho В РЕГУЛЯЦИИ НОРМАЛЬНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

© 2024 г. Д. Е. Бобков<sup>1, 2, 3, \*</sup>, А. В. Лукачева<sup>1</sup>, А. И. Горб<sup>4</sup>, Г. Г. Полянская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, 197341, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, 197376, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 194064, Россия

\* E-mail: bobkov@incras.ru

Поступила в редакцию 26.06.2023 г.

После доработки 11.08.2023 г.

Принята к публикации 17.08.2023 г.

Малые ГТФазы — это небольшие (около 21 кДа) белки, регулирующие множество биологических процессов, таких как транспорт везикул, цикл клеточного деления, клеточная миграция, инвазия, адгезия, пролиферация и репарация ДНК; они участвуют в канцерогенезе и нейродегенеративных заболеваниях. Некоторые из этих белков, такие как белки семейства Rho, являются ключевыми: регулируют актиновый цитоскелет, влияют на клеточную адгезию и подвижность. В настоящем обзоре рассмотрены нормальные и патологические процессы в клетках человека, в регуляцию которых вовлечены малые ГТФазы семейства Rho. Особое внимание уделено ингибиторам малых ГТФаз и их применению в терапии различных заболеваний.

**Ключевые слова:** цитоскелет, малые ГТФазы, Rho, ROCK, мезенхимные стволовые клетки, репликативное старение, канцерогенез, инвазия

**Принятые сокращения:** АФК — активные формы кислорода; ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МСК — мезенхимные стволовые клетки; РС — репликативное старение; GAP — белки, активирующие ГТФазную активность; GEF — фактор обмена гуанозина; ROCK — Rho-ассоциированная протеинкиназа; PAK — p21-активируемые киназы.

DOI: 10.31857/S0041377124010012, EDN: IHUEFW

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАЛЫХ ГТФаз СЕМЕЙСТВА Rho

Малые ГТФазы — небольшие (около 21 кДа) белки, продукты генов семейства Ras, которые участвуют в множестве клеточных процессов, включая регуляцию клеточного цикла, дифференцировку, апоптоз, клеточную подвижность и репарацию ДНК. Суперсемейство белков Ras включает в себя семейства Ras, Rho, Arf, Rab, Rap, Ran и другие; известно более 170 различных малых ГТФаз этого суперсемейства, каждый из которых играет уникальную роль в регуляции клеточных функций. Эти белки занимают различные функциональные места в клетке и регулируют множество биологических процессов, таких как транспорт везикул, цикл клеточного деления, клеточную миграцию, инвазию, адгезию и пролиферацию, репликацию ДНК, а также участвуют в нормальном развитии организма и проти-

водействии различным заболеваниям (Jaffe, Hall, 2005). У млекопитающих семейство Rho включает 20 членов, распределенных на основании выравнивания аминокислотных последовательностей по семи подсемействам: Rac, Cdc42, Rho, Rnd, RhoBTV, RhoDF и RhoUV (Narumiya, Thumkeo, 2018).

Типичные ГТФазы Rho, такие как RhoA, Rac1 и Cdc42, регулируются противоположным действием факторов обмена гуанозина (GEF) и белков, активирующих ГТФазную активность (GAP). GAP и GEF являются мультидоменными белками, способными связываться с другими белками и участками липидной мембраны, активируясь таким образом через аллостерические сайты в присутствии вторичных мессенджеров, таких как цАМФ, кальций или диацилглицерол (Bos et al., 2007). GEF активируют ГТФазы Rho, стимулируя обмен ГДФ на ГТФ, тогда как GAP катализируют гидролиз ГТФ, инактивируя эти белки.

Некоторые известные GEF для Rho — это белки p115-RhoGEF и GEF-H1; некоторые известные GAP — ARHGAP, ARAP3, p190RhoGAP (Van Buul et al., 2014). Многие GEF и GAP вносят вклад в опосредованную Rho регуляцию подвижности. Однако динамическая регуляция ГТФаз Rho требует не простого линейного взаимодействия (начала между GEF и Rho ГТФазой, затем между ГТФазой и ее эффекторной мишенью и, наконец, между Rho и GAP), но скоординированной и локализованной работы множества компонентов (Van Buul et al., 2014).

У атипичных членов семейства Rho преобладает ГТФ-связанная форма. Так, подсемейства Rnd и RhoH не способны гидролизовать ГТФ, а значит, являются конститутивно ГТФ-связанными белками. RhoU имеет высокую внутреннюю скорость нуклеотидного обмена, поэтому предполагается, что он также преимущественно связан с ГТФ (Lawson, Ridley, 2018).

Сигналинг с помощью этих ГТФаз контролируется другими механизмами, обычно посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование, убиквитинирование и сумоилирование. Посттрансляционные модификации также оказывают влияние на типичные ГТФазы, изменяя их локализацию в клетке, регулируя цикл ГТФ/ГДФ или взаимодействие ГТФаз с их эффекторами (Navarro-Lérida et al., 2021).

Белки семейства Rho важны по ряду причин: примерно 1% генома человека кодирует белки, которые либо регулируют Rho-белки, либо регулируются прямым взаимодействием с ними (Mosaddeghzadeh, Ahmadian, 2021); они контролируют почти все фундаментальные клеточные процессы у эукариот, включая морфогенез, поляризацию, подвижность, реорганизацию цитоскелета, цитокинез и экспрессию генов; их аномальная активация играет решающую роль в развитии рака, инфекционных и когнитивных расстройств, а также сердечно-сосудистых заболеваний (Ellenbroek, Collard, 2007).

Белки Rho состоят из консервативного G-домена, ответственного за связывание ГТФ (активация) и гидролиз связанного ГТФ до ГДФ (инактивация), а также C-концевой гипервариабельной области, оканчивающейся консенсусной последовательностью СААХ (где С — цистеин, А — любая алифатическая аминокислота, а Х — любая аминокислота).

Субклеточная локализация белков Rho регулируется за счет серии посттрансляционных модификаций остатка цистеина в мотиве СААХ,

включая изопренилирование, эндопротеолиз и карбоксиметилирование. G-домен состоит из пяти консервативных участков (G1–G5), два из которых, G2 и G3, претерпевают в цикле между неактивным и активным состояниями конформационные изменения и являются консенсусными сайтами связывания GEF, GAP, GDI и эффекторов (Mosaddeghzadeh, Ahmadian, 2021).

К настоящему времени известно более 70 потенциальных эффекторов, которые специфически взаимодействуют с ГТФ-связанной формой Rho-белков, обеспечивая таким образом передачу сигнала, к примеру, на пути Rho/ROCK, Rac/JNK или Cdc42/PAK (Vidal et al., 2002; Szczepanowska, 2009; Zhang et al., 2009; Amano et al., 2010).

Одни из наиболее изученных эффекторов RhoA — это Rho-ассоциированные серин-треониновые протеинкиназы I и II (ROCK I/II), модулирующие образование стресс-фибрилл и активность миозина и, следовательно, участвующие в регуляции клеточной адгезии, миграции и инвазии. Эти эффекторы также играют важную роль в регуляции сокращения гладких мышц и поддержании кровообращения. Кроме того, существуют данные о влиянии ROCK на регуляцию метаболизма глюкозы и липидов.

Для Rac1 и Cdc42 общими являются p21-активированные протеинкиназы (PAK1/2/3), также относящиеся к серин-треониновым протеинкиназам и влияющие на активацию киназ некоторых факторов транскрипции и стабилизацию актиновых филаментов (Mosaddeghzadeh, Ahmadian, 2021). Подсемейства белков семейства Rho, их GEF и GAP, а также пути активации и основные эффекторы представлены в табл. 1.

Необходимым условием функционирования многих ГТФаз Rho является ассоциация с мембраной, поэтому большинство Rho модифицированы на C-концах изопрениловыми липидами, что позволяет им локализоваться на мембране. Например, локализуясь на мембране, изопренилированный Rac1 может физически взаимодействовать с компонентами комплекса НАДФН-оксидазы, приводя к ее активации и образованию в клетке активных форм кислорода (АФК) (Ueyama et al., 2002).

Ингибиторы диссоциации гуанозина (GDI) регулируют RhoA, Rac1 и Cdc42, связываясь с изопренильными группами и тем самым предотвращая локализацию этих белков на мембране и создавая цитозольный пул инактивированных ГТФаз (Hodge, Ridley, 2016). Находясь на мембране, малые ГТФазы могут быть выявлены в липидных рафтах,

**Таблица 1.** Подсемейства белков семейства Rho, их GEF и GAP, пути активации и основные эффекторы

| Подсемейство (ПС) | Члены ПС                       | GEF   | GAP  | Активаторы              | Эффекторы   |
|-------------------|--------------------------------|---|--|-------------------------|---|
| Rho               | RhoA, RhoB, RhoC               | Dbl, Lbc, Lfc, Lsc, Vav, Trio, Ost, Bcr, Abr, p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF, LARG, Net1, Ect2 | p50, p190 RhoGAP, p122, Myr5, Graf, ARHGAP18 (MacGAP)                | LPA, bombesin           | Cit, Cnksr1, Diaph1, Diaph2, DgkQ, FlnA, KcnA2, Ktn1, Rtkn1, Rtkn2, Rhpn1, Rhpn2, Itpr1, PlcG1, PI-5-p5K, Pld1, Pkn1, Pkn2, Rock1, Rock2, PrkcA, Ppplr12A |
| Rac               | Rac1, Rac2, Rac3, RhoG, RhoH   | Tiam, Vav, Trio, Bcr, Abr   | p50, Bcr, Abr, N-chimerin, $\beta$ -chimerin, p190GAP, 3BP-1, RalBP1 | PDGF, insulin, bombesin | Sra1, IRSp53, PAK1, PAK2, PAK3  |
| Cdc42             | Cdc42, RhoQ (TC10), RhoJ (TCL) | Dbl, Vav, FGD1, Ost, Bcr, Abr   | P50, Bcr, Abr, p190GAP, 3BP-1, Myr5, RalBP1, Graf                    | Bradikinin              | WASp, N-WASP, IRSp53, Dia2, Dia3, ROCK1, ROCK2, PAK4  |
| Rnd               | Rnd1, Rnd2, Rnd3 (RhoE)        | Syx   | p190 RhoGAP  | –                       |   |
| RhoBTB            | RhoBTB1, RhoBTB2, RhoBTB3      | –   |  |                         | Cul3  |
| RhoUV             | RhoU (Wrch), RhoV (Chp)        | –   |  |                         |   |
| RhoF              | RhoD, RhoF (Rif)               |   |  |                         |   |

Источники: Van Aelst, D'Souza-Schorey, 1997; Berthold et al., 2008; Goh, Manser, 2012.

что придает им дополнительную степень регуляции за счет пространственного сближения с рафт-ассоциированными GEF (Moissoglu, Schwartz, 2014).

В экспериментах, выполненных на клетках аденокарциномы легкого CL1, было показано, что интегральный мембранный белок кавеолин стабилизирует структуру липидных рафтов и взаимодействует с интегрином  $\beta$ 1, вызывая инактивацию p190Rho-GAP и продлевая существование RhoA в активном состоянии (Yang et al., 2011). На МСК, полученных из костного мозга человека и обработанных метил- $\beta$ -циклодекстрином, было показано, что чувствительность клеток к действию постоянного тока (120 В/см), измеряемая по миграционной способности, опосредована изменениями структуры липидных рафтов: кавеолин олигомеризуется и ориентируется в магнитном поле, что приводит к запуску Rho и PI3-киназных сигнальных путей (Lin et al., 2017).

С одной стороны, малые ГТФазы управляют выпячиваниями и инвагинациями плазматической мембраны, контролируя состав белковых комплексов, содержащих актин и актин-связывающие белки и формирующих примембранный цитоскелет. С другой стороны, Arp- и Rab-зависимое слияние мембранных компартментов и экзоцитоз везикул,

содержащих малые ГТФазы, обеспечивает нацеливание ГТФаз Rho и их регуляторных компонентов на отдельные участки плазматической мембраны. Взаимодействие между мембранами и цитоскелетом может приводить к изменению площади поверхности плазматической мембраны и ее натяжения. Таким образом, процессы мембранного транспорта и динамического ремоделирования цитоскелета взаимосвязаны (de Curtis, Meldolesi, 2012).

Далее в обзоре будут рассмотрены участие малых ГТФаз семейства Rho в таких нормальных процессах, как организация цитоскелета, клеточная подвижность, репарация ДНК и репликативное старение, а также роль Rho ГТФаз в развитии различных патологических процессов и использование ингибиторов Rho ГТФаз в качестве фармакологических препаратов.

## РЕГУЛЯЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА И ПОДВИЖНОСТИ

ГТФазы семейства Rho регулируют актиновый цитоскелет и влияют на такие процессы, как изменение формы клетки, поляризация, клеточная адгезия и подвижность (Spiering, Hodgson, 2011; Hanna, El-Sibai, 2013). Подвижность необходима

клеткам для адаптации к изменениям в окружающей среде. Это сложный динамический процесс, охватывающий постоянное remodelирование клеточной архитектуры, находящейся во взаимодействии с внеклеточным матриксом.

Чтобы структуры актинового цитоскелета могли координированно работать и обеспечивать клеточную подвижность, необходимы быстро активируемые сигнальные сети с пространственно-временной регуляцией, которые позволяют клеткам реагировать на внешние сигналы. Малые ГТФазы семейства Rho являются ключевыми компонентами таких сигнальных сетей (Sadok, Marshall, 2014; Hervé, Bourmeyster, 2015). Например, провоспалительный медиатор лизофосфатидная кислота (LPA) может усиливать клеточную подвижность следующим образом: LPA взаимодействует на поверхности клеток со специфическими G-белок-связанными рецепторами (LPA<sub>R</sub>), в результате чего активируется RhoA, который взаимодействует со своим эффекторным белком ROCK, который впоследствии активирует киназу легкой цепи миозина, что в свою очередь приводит к активации миозина путем фосфорилирования, а следовательно, повышению сократимости и образованию стресс-фибрилл.

Кроме того, RhoA может стимулировать полимеризацию актина через свои эффекторы mDia1 и mDia2 (формины), которые катализируют сборку F-актина во внутриклеточные структуры, обеспечивающие подвижность — филоподии и ламеллоподии. Cdc42 и Rac1 регулируют организацию актина, воздействуя на комплекс Arp2/3, ответственный за нуклеацию актина и ветвление, через свои эффекторные белки N-WASP и WAVE соответственно, что приводит к полимеризации актина и формированию филоподий или ламеллоподий (Ridley, 2015).

Помимо участия в регуляции актинового цитоскелета, малые ГТФазы Rho также являются регуляторами микротрубочек. RhoA через mDia может способствовать формированию стабильных и выровненных микротрубочек. Rac1 и Cdc42 могут влиять на стабильность микротрубочек, передавая сигналы ПАК на белок статмин, дестабилизирующий микротрубочки. Кроме того, Rac1 и Cdc42 способны способствовать захвату микротрубочек, что необходимо для их стабилизации и поляризации (Ellenbroek, Collard, 2007).

Семейство киназ ПАК, активируемых Rac/Cdc42, играет ключевую роль в сборке/разборке фокальных контактов (Rane, Minden, 2014). RhoA принимает участие в регуляции адгезивных контактов, передавая через mDia сигналы, необходи-

мые для формирования и поддержания адгезивных контактов, а через ROCK — для разрушения адгезивных контактов. Rac1 и Cdc42 через комплекс Pak регулируют полярность передний—задний край и направленную миграцию в эпителиальных клетках. Rho также участвуют в процессах поляризации в других типах клеток (Ridley, 2015).

В подвижных фибробластоподобных клетках RhoA преимущественно активен в задней части клетки, где он индуцирует подтягивание отстающего конца клетки за счет сократительной способности миозина. Значительно меньшая часть активного RhoA присутствует на переднем крае клетки, причем активность RhoA в передней части клетки очень динамична и иногда индуцируется только на несколько секунд.

Интересно, что, с одной стороны, активность RhoA на переднем крае предшествует образованию выпячивания мембраны; с другой стороны, Rac1 почти исключительно активен на самом переднем крае мигрирующих клеток. Важно отметить, что активность RhoA в передней части достигает пика перед началом активности Rac1 в цикле выпячивание—подтягивание (Nguyen et al., 2018).

Активность обеих ГТФаз четко разделена либо в пространстве, либо во времени. Это связано с тем, что RhoA и Rac1 взаимно ингибируют друг друга. Было показано, что Rac1 снижает активность RhoA с помощью нескольких механизмов, некоторые из которых зависят от эффекторной киназы ПАК. RhoA, со своей стороны, способен снижать активность Rac1 за счет активации своих эффекторных белков ROCK1/2 (Comunale et al., 2007; Nguyen et al., 2018).

Было показано, что малые ГТФазы Rho играют важную роль в процессе митоза и цитокинеза. RhoA способствует округлению клеток, определению места деления и сборке/разборке сократительного кольца и остаточного тельца, а Cdc42 — ориентации веретена деления, а также целостности centrosомы и двунаправленному прикреплению хромосом к микротрубочкам. При этом Rac1 является негативным регулятором цитокинеза: его инактивация важна для правильного формирования и активности сократительного кольца (Chircop, 2014).

## РОЛЬ МАЛЫХ ГТФаз Rho В ЯДРЕ

Помимо описанных функций, реализуемых малыми ГТФазами семейства Rho в цитозоле и на мембране клетки, существуют также и ядерные

функции этих белков. Так, канонические сигналы ядерной локализации были обнаружены в С-концевых полиосновных участках таких белков, как RhoC, RhoG, Rac1, Cdc42 и Rnd1 (Williams, 2003; Sandrock et al., 2010).

Кроме самих малых ГТФаз, в ядре также могут находиться некоторые GEF, примером чему является Net1, активирующий внутриядерную RhoA (Dubash et al., 2011). В обзорной статье Magalhaes et al. (2021) представлены данные, свидетельствующие о том, что малые ГТФазы, такие как Rac1, RhoA, Cdc42, не только регулируют состояние цитоскелета в цитоплазме, но и активно участвуют в процессах репарации ДНК. Показано, что сигнальный путь Net1/RhoA в ядре клетки вовлечен в ответ на повреждение ДНК (Dubash et al., 2011; Kim et al., 2018); повреждение ДНК индуцирует транспорт активного мономерного Rac1 в ядро (Hinde et al., 2014).

В клетке существует двунаправленная передача механических сигналов между ядром и цитоскелетом. Показано, что приложение напряжения к поверхности клетки передается ядру через цитоскелет и вызывает искажение ядра. Различное положение ядра у разных типов клеток также опосредовано взаимодействием ядра с цитоскелетом. При этом удаление комплекса, связывающего ядро с цитоскелетом, или самого ядра значительно изменяет механотрансдукцию (перевод физических сил в биохимические сигнальные пути) клетки, причем большая часть изменений связана со снижением активности RhoA (Kristó et al., 2016).

Малые ГТФазы Rho влияют на транскрипцию и экспрессию генов путем регуляции ядерного актина и актин-связывающих белков, таких как кофилин, профилин, формины и др. Кофилин и профилин участвуют в транспорте актина между ядром и цитоплазмой, формины — в репарации повреждений ДНК; эти белки также играют роль в транскрипции генов (Rajakylä et al., 2014; Kristó et al. 2016).

Было показано, что путь RhoA/ROCK вовлечен в опосредованную транскрипционным фактором SRF регуляцию экспрессии мышечных и гладкомышечных генов (Liu et al., 2003). Кроме того, RhoA, Rac1 и Cdc42 через управление транскрипционными факторами специфических генов, например циклина D1, который стимулирует переход из фазы G<sub>1</sub> клеточного цикла в фазу S, регулируют клеточный цикл и рост, а также апоптоз (Rajakylä et al., 2014).

Ядерная локализация Rac1 зависит от клеточного цикла: она повышается в конце фазы G<sub>2</sub>

и снижается в начале G<sub>1</sub>. Кроме того, установлено, что Rac1 локализуется на центросомах в фазе G<sub>2</sub>, профазе и ранней прометафазе митоза, где он регулирует отделение центросом и начало митоза (Payapilly, Malliri, 2018).

Ранее было показано, что за ядерную локализацию Rac1 отвечает полиосновный участок PBR, содержащий канонический сигнал ядерной локализации, в то время как PBR в RhoA не способствует ядерной локализации этого белка (Lanning et al., 2004). Известно также, что фосфорилирование киназой ERK вызывает ядерную локализацию Rac1, но не RhoA (Tong et al., 2016).

RhoA не имеет сигнала ядерной локализации, но является регулятором транскрипционных факторов, таких как SRF, AP-1, NF- $\kappa$ B, YAP/TAZ,  $\beta$ -катенин и HIF-1 $\alpha$  (Kim et al., 2018). Ядерная локализация RhoA в нескольких линиях МСК человека была продемонстрирована с помощью конфокальной микроскопии. Было обнаружено, что в процессе репликативного старения (РС) присутствие этого белка в ядре уменьшается (Bobkov et al., 2020, 2022).

На клетках рака кишечника с помощью коиммунопреципитации было показано, что RhoA формирует мультимолекулярные белковые комплексы с импортином  $\alpha$  и субъединицей p50 транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B; авторы предполагают, что ядерную транслокацию RhoA обеспечивает механизм активного транспорта через ядерные поры (Xu et al., 2013). Обобщая такие исследования, можно сказать, что к настоящему времени механизмы ядерной локализации RhoA изучены не до конца, и этот вопрос подлежит дальнейшему исследованию.

## МСК И РЕПЛИКАТИВНОЕ СТАРЕНИЕ

Механхимные стволовые клетки человека в настоящее время используются для фармакологических и биомедицинских исследований, связанных с широким спектром заболеваний, таких как сахарный диабет 1 типа, пневмония, ишемия конечностей, травмы головного или спинного мозга, периодонтит, рак и нейродегенеративные заболевания (Hezan et al., 2022; Jayasinghe et al., 2022; Navarro et al., 2022; Pischiutta et al., 2022; Chen et al., 2023; Mou et al., 2023; Sousa et al., 2023; Turano et al., 2023), поэтому изучение малых ГТФаз в МСК человека может помочь разработке новых методов лечения этих заболеваний.

Согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК, полученных

из любых источников, определяется рядом обязательных характеристик: адгезивностью к культуральному пластику, активной пролиферацией, экспрессией определенной панели поверхностных антигенов, нормальным кариотипом человека и способностью к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях (Dominici et al., 2006).

Сравнительный анализ линий МСК, выделенных из разных источников, свидетельствует о разной степени выраженности в них статусных характеристик. Причинами различий могут быть следующие эпигенетические факторы: условия культивирования; различия состава секрета клеток линий, полученных от одного донора, но из разных органов или частей одного органа; микроокружение, в котором находились клетки до помещения их в условия *in vitro*. Причинами различий могут быть также генетические факторы, связанные с разными донорами (Полянская, 2018; Semenova et al., 2021; Shin et al., 2021; Poljanskaya et al., 2022).

МСК человека относятся к неиммортизованным клеточным линиям. С увеличением числа клеточных удвоений в процессе культивирования МСК пролиферация клеток постепенно замедляется, и клеточная популяция входит в активную стадию РС. Процесс РС обусловлен укорочением теломера, происходящим при каждом цикле репликации ДНК и, соответственно, при каждом клеточном делении, как правило вследствие прекращения синтеза фермента теломеразы (Прайс, 1997; Хейфлик, 1997; Vodnar et al., 1998).

РС, происходящее в процессе длительного культивирования клеточных популяций МСК человека, представляет собой комплексный динамический процесс, индуцированный генетическими и эпигенетическими нарушениями, вызывающими многочисленные функциональные изменения в клетках, включая и статусные характеристики МСК (снижение пролиферативной активности, дифференцировочного потенциала, а также возможное усиление цитогенетической нестабильности). РС начинается на ранних пассажах и постепенно усиливается в процессе культивирования, входя в активную стадию (Turinetti et al., 2016; Poljanskaya et al., 2022).

Процесс РС постепенно способствует ухудшению и, в конечном счете, остановке клеточных процессов, характерных для МСК на ранних и средних пассажах. Его нельзя считать патологическим процессом, связанным с болезнями, а следу-

ет считать завершением генетической программы онтогенеза данных клеток (Matsumura et al., 1979; Хейфлик, 1997).

Изменения клеточных характеристик МСК в процессе РС обусловлены ключевыми микроРНК, которые являются мультипотентными факторами и участвуют в системе регуляции экспрессии генов, в частности путем взаимодействия с мРНК, корректируя функции разных транскрипционных факторов (Al-Azab et al., 2022; Poljanskaya et al., 2022; Yang et al., 2023).

Большую роль в изменении характеристик МСК играет состав секрета, который представляет собой кондиционированную среду, содержащую продукты секреции МСК: цитокины; факторы, ремодулирующие внеклеточный матрикс; ферменты; ростовые факторы, способствующие активации генетического аппарата клетки; паракринные факторы и др.

В результате изменения в процессе РС факторов, составляющих секретом, образуется секреторный фенотип, связанный со старением — SASP. (Özcan et al., 2016; Ratushnyy et al., 2020; Al-Azab et al., 2022; Liu et al., 2022). Недавно проведенный протеомный и биоинформатический анализ МСК, выделенных из костного мозга человека, позволил определить 95 белков, ассоциированных с РС. В процессе анализа функциональных взаимосвязей, выполненного с помощью инструмента STRING, среди этих белков были выявлены несколько ключевых: MYL6, MAP2K1, PAK2 и малая ГТФаза Cdc42 (Samsonraj et al., 2023).

Существуют и другие исследования, которые показывают, что малые ГТФазы могут играть роль в регуляции старения МСК. Так, на МСК, полученных из жировой ткани состарившихся крыс, было показано, что повышенная активность Cdc42 в них приводит к клеточному старению (Zhang et al., 2021).

В сравнительном исследовании, выполненном на различных линиях МСК человека, полученных от здоровых доноров, была показана отрицательная корреляция между степенью РС и ядерной локализацией RhoA (Bobkov et al., 2022). Ген, кодирующий RhoB, был выявлен среди генов, повышенная экспрессия которых является постоянным и селективным признаком устойчивой способности к самообновлению гемопоэтических стволовых клеток (Kent et al., 2009). Малые ГТФазы также могут принимать участие в регуляции дифференцировки МСК; например, было показано, что МСК дифференцируются в мио-

фибробласты при включении пути RhoA/ROCK и в эндотелиальные клетки — при его выключении (Li et al., 2016).

Роль Rac1 в регуляции стабильности генома и РС была исследована в экспериментах, выполненных на первичных эмбриональных фибробластах мышц. Индукция старения за счет потери или увеличения активности Rac1 была обусловлена, по крайней мере частично, увеличением клеточных АФК. Делеция гена *rac1* вызывала компенсаторную активацию близкородственного члена семейства — Rac3, который индуцирует путем связывания с НАДФН-оксидазой продукцию АФК независимо от Rac1. Генетическая делеция p53 в этих клетках способствует (по результатам окраски на SA-β-галактозидазу) снижению в популяции количества старых клеток.

Авторы приходят к выводу, что в совокупности эти результаты показывают, что активность Rac1 служит регулятором РС посредством модуляции образования АФК в клетке, стабильности генома и активности p53 (Debidia et al., 2006).

Кроме того, существуют исследования, которые показывают, что малые ГТФазы могут играть важную роль в регуляции старения организма человека. Интересно, что в раннем исследовании (Kerber et al., 2009), в котором изучали связь профилей экспрессии генов со старением и смертностью в семьях в течение трех поколений, самая сильная связь с негативными результатами была обнаружена для гена *Cdc42*.

Недавно опубликованы данные, показывающие, что уровни белка *Cdc42*, измеренные в периферической крови 196 доноров, коррелировали с хронологическим возрастом участника, установленным с помощью анализа профиля метилирования ДНК. Была также обнаружена сильная положительная корреляция с сердечно-сосудистыми заболеваниями (Florian et al., 2017; Leins et al., 2018). Роль белка *Cdc42* в старении организма и связанных со старением заболеваниях широко обсуждается в настоящее время (Pawelec, 2018; Umbayev, 2023).

### МАЛЫЕ ГТФазы СЕМЕЙСТВА Rho В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Как будет видно из представленных далее примеров, малые ГТФазы семейства Rho вовлечены в развитие ряда патологических процессов, включая рак, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания.

Чаще всего развитие патологического процесса обусловлено избыточной активностью какой-либо ГТФазы и ассоциированного с ней сигнального пути, поэтому в настоящее время ведется поиск фармакологических средств, нацеленных на ингибирование как самих малых ГТФаз, так и ассоциированных с ними киназ. Некоторые такие ингибиторы, разной степени специфичности, представлены в табл. 2 и 3.

**Таблица 2.** Ингибиторы малых ГТФаз семейства Rho

| Ингибитор малых ГТФаз | Целевой белок           | IC <sub>50</sub> *  | Источник литературы                                     |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|---|
| C3 Exoenzyme          | RhoA, RhoB, RhoC        | —                   | Barth et al., 2015                                      |
| TAT-C3                |                         |                     | Sahai, Olson, 2006                                      |
| Rhosin                | RhoA                    | 0.4 мкМ             | Shang et al., 2012                                      |
| Ibuprofen             |                         | —                   | Dill et al., 2010                                       |
| Y16                   | RhoGEF                  |                     | Shang et al., 2013                                      |
| ЕНТ 1864              | Rac1, Rac1b, Rac2, Rac3 | Onesto et al., 2008 |   |
| ЕНор-016              | Rac1, Rac3              | 1.1 мкМ             | Dharmawardhane et al., 2013                             |
| NSC 23766             | Rac1                    | 50–100 мкМ          | Mizukawa et al., 2011;<br>Prieto-Dominguez et al., 2019 |
| ZINC69391             |                         | 41–54 мкМ           | Cardama et al., 2014                                    |
| 1A-116                |                         | 4–21 мкМ            | Cabrera et al., 2017                                    |
| BART                  |                         | —                   | Taniuchi et al., 2012                                   |
| YM1B                  |                         |                     | Jim Leu et al., 2013                                    |
| Migrastatin           |                         |                     | Shan et al., 2005                                       |
| AZA1                  | Zins et al., 2013       |                     |   |
| R-ketorolac           | Rac1, Cdc42             | Guo et al., 2015    |   |
| MBQ-167               |                         | 0.08–0.1 мкМ        | Humphries-Bickley et al., 2017                          |

| Ингибитор малых ГТФаз | Целевой белок | IC <sub>50</sub> * | Источник литературы                        |
|-----------------------|---------------|--------------------|--|
| CID-2950007 (ML141)   | Cdc42         | 200 нМ             | Surviladze et al., 2010; Hong et al., 2013 |
| CID44216842           |               | 1 мкМ              | Hong et al., 2013                          |
| MLS000532223          |               | 16–120 мкМ         | Surviladze et al., 2010                    |
| MLS-573151            |               | 2 мкМ              | Wang et al., 2017                          |
| ZCL278                |               | 11.4 мкМ           | Aguilar et al., 2019                       |
| ZCL367                |               | –                  | Aguilar et al., 2019                       |
| CASIN                 |               | 2 мкМ              | Florian et al., 2012                       |
| Secramine A           |               | –                  | Pelish et al., 2006                        |

\*IC<sub>50</sub> — концентрация полумаксимального ингибирования.

**Таблица 3.** Некоторые ингибиторы ассоциированных с малыми ГТФазами семейства Rho- киназ, используемые в качестве фармакологических препаратов

| Ингибитор                     | Целевой белок                          | IC <sub>50</sub> *                    | Применение в медицине                                       | Источник литературы                                 |
|-------------------------------|--|---------------------------------------|---|---|
| HA-1077 (Fasudil)             | ROCK1<br>ROCK2                         | 0.33 мкМ<br>0.158 мкМ                 | Острый инсульт, стенокардия, легочная гипертензия           | Shi, Wei, 2013                                      |
| FSD-C10                       |  | –                                     | Аутоиммунные заболевания ЦНС                                | Xin et al., 2015                                    |
| Y27632                        |  | 220 нМ<br>300 нМ                      | Реперфузионное повреждение, гипертония, инсульт, астма, рак | Narumiya et al., 2000                               |
| AR-12286 (Verosudil)          |  | 2 нМ                                  | ПВГ**, глаукома   | Ren et al., 2023                                    |
| TC-S 7001 (Azaindole-1)       |  | 0.6 нМ<br>1.1 нМ                      | Гипертония, рак   | Kast et al., 2007                                   |
| RKI-1447                      |  | 14.5 нМ<br>6.2 нМ                     | ПВГ, рак  | Patel et al., 2012                                  |
| Y-39983                       |  | 3.6 нМ                                | Глаукома  | Ramachandran et al., 2011                           |
| K-115 (Ripasudil)             |  | 51 нМ<br>19 нМ                        | ПВГ, глаукома   | Kaneko et al., 2016                                 |
| AMA0076                       |  | 3.7 нМ<br>2.3 нМ                      | Глаукома  | Abbhi, Piplani, 2020                                |
| SR-3677                       | ROCK2                                  | 3 нМ                                  | Сердечный фиброз  | Santos et al., 2019                                 |
| SAR407899                     |  | 135 нМ                                | Гипертония, эректильная дисфункция                          | Löhn et al., 2009                                   |
| H-1152                        |  | 0.012 мкМ                             | Глаукома  | Liao, et al., 2007                                  |
| KD025 (Belumosudil, SLx-2119) |  | 60 нМ                                 | Атеросклероз, фиброз, солидные опухоли                      | Diep et al., 2018                                   |
| Thiazovivin                   | ROCK1                                  | 0.5 мкМ                               | Получение iPSCs   | Park et al., 2017                                   |
| GSK429286A                    |  | 14 нМ                                 | Гипертония, воспаления                                      | Goodman et al., 2007                                |
| DJ4                           | ROCK1<br>ROCK2<br>MRCK                 | –                                     | Рак   | Kale et al., 2014                                   |
| AT13148                       | ROCK1<br>ROCK2<br>АКТ<br>p70S6K<br>PKA | 6 нМ<br>4 нМ<br>50 нМ<br>8 нМ<br>3 нМ |   | McLeod et al., 2020                                 |
| BDP8900                       | MRCK                                   | 43 нМ                                 |   | Unbekandt et al., 2014                              |
| BDP9066                       |  | 64 нМ                                 |   | East, Asquith, 2021                                 |
| KPT-9274                      | PAK4                                   | –                                     |   | Cordova et al., 2019;<br>Crosas-Molist et al., 2022 |

\*IC<sub>50</sub> — концентрация полумаксимального ингибирования соответствующей киназы; \*\*ПВГ —повышенное внутриглазное давление.

Молекулярный механизм ингибирования малых ГТФаз такими специфическими ингибиторами, как малые молекулы и пептиды, заключается в том, что ингибиторы связываются с GEF-связывающим участком G-домена и либо стерически блокируют взаимодействие GEF с ГТФазой, либо запирают ГТФазу в конформационном состоянии, неспособном к связыванию с GEF (Gray et al., 2020).

Механизмы ингибирования активности ГТФаз Rho неспецифическими ингибиторами типа нестероидных противовоспалительных препаратов (ибупрофена) до сих пор не ясны (Dill et al., 2010).

Существует связь малых ГТФаз семейства Rho с различными формами нейродегенерации — болезнью Альцгеймера, боковым амиотрофическим склерозом и болезнью Паркинсона. Показано, что активация пути RhoA/ROCK усиливает продукцию  $\beta$ -амилоида в нейронах, а кроме того, может способствовать реакциям нейровоспаления путем активации клеток микроглии и астроцитов, которые высвобождают воспалительные цитокины (Cai et al., 2021).

В обзоре Schmidt et al., (2022) описывается множество исследований, посвященных роли RhoA в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. RhoA оказывает влияние на актиновый цитоскелет, транспорт нейротрансмиттеров и синаптическую пластичность, поэтому возможны механизмы, по которым RhoA может участвовать в регуляции патологий, сопряженных с переключением когнитивных механизмов, эксайтотоксичностью и оксидативным стрессом. В этой связи обсуждают перспективы терапевтических подходов для лечения нейродегенеративных заболеваний, в которых будут использовать ингибиторы RhoA (Guiler et al., 2021; Linseman, Lu, 2023).

Аномальную активацию пути RhoA/ROCK наблюдали при основных сердечно-сосудистых заболеваниях, таких как атеросклероз, рестеноз, гипертензия, легочная гипертензия и гипертрофия сердца (Loirand et al., 2006). Существуют и клинические исследования, в которых применяют комбинации из ингибиторов малых ГТФаз.

Комбинации нескольких препаратов позволяют достичь синергетического эффекта и повысить эффективность лечения. Например, в клиническом исследовании NCT00914277 изучается комбинация ROCK2 ингибитора SAR407899 (Löhn et al., 2009) и силденафила для лечения эректильной дисфункции. Это клиническое исследование сейчас находится в фазе 2.

Трудно переоценить ту роль, которую малые ГТФазы семейства Rho играют в канцерогенезе (Humphries et al., 2020). Одной из наиболее опасных особенностей опухолей является способность их клеток к инвазии, то есть проникновению в окружающую ткань, а также образованию метастазов в других органах (Al-Koussa et al., 2020). Поскольку малые ГТФазы семейства Rho играют ключевую роль в регуляции подвижности, их гиперактивация в раковых клетках позволяет последним усиленно мигрировать, инвазировать в окружающие ткани и образовывать метастазы (Qadir et al., 2015; Haga, Ridley, 2016; Porter et al., 2016; Maldonado, 2018, 2020; Prieto-Dominguez et al., 2019; Ma et al., 2023; Santos et al., 2023).

Например, гиперактивация LPA/Rho/ROCK сигнального пути ассоциирована с метастазированием и инвазией рака яичников (Yung et al., 2014). В этой связи использование ингибиторов малых ГТФаз семейства Rho и ассоциированных с ними киназ является одним из направлений развития новых методов терапии рака (Liao et al., 2007).

В обзоре Crosas-Molist et al. (2022) подчеркивается роль Rho на каждом этапе прогрессирования рака, поэтому изучение функциональной роли малых ГТФаз на этих этапах может помочь в идентификации новых молекулярных маркеров рака, которые могут использоваться для диагностики и прогнозирования заболевания.

Роль Rac в регуляции инвазии клеток глиобластомы связана с тем, что этот белок активно участвует в механизмах регуляции клеточной адгезии и подвижности, обеспечивая изменение цитоскелета и поддержание связи клетки с внеклеточным матриксом. Например, было показано, что Rac2, но не Rac1, имеет решающее значение для инициации острого миелоидного лейкоза в модели ретровирусной экспрессии в клетках MLL-AF9. Однако потери Rac1 или Rac2 достаточно, чтобы ухудшить выживаемость и рост трансформированных клеток. Rac2 положительно регулирует экспрессию белков семейства Bcl-2 что приводит к подавлению апоптоза (Mizukawa et al., 2011).

Мембранная локализация белков Rho-семейства является ключом к их активации и регулируется пренилированием. Стадины ингибируют пренилирование ГТФаз Rho и таким образом предлагают интересные терапевтические возможности.

В настоящее время более 70 клинических испытаний проводят для того, чтобы показать, что стадины обладают противоопухолевым действием при солидных и гематологических злокачественных

опухолях. Статины увеличивают выживаемость больных раком головы и шеи (Barbalata et al., 2020).

В других исследованиях было показано, что ингибирование пренилирования Rho статинами повышает иммуногенность клеток меланомы и стимулирует противоопухолевый иммунитет (Sarrabayrouse et al., 2017), а также ингибирует инфицирование клеток респираторно-синцитиальным вирусом (Malhi et al., 2021). Однако на клетках эндотелия сосудов линии HUVEC недавно были выявлены нарушения барьерной функции как следствие длительного ингибирования пренилирования Rho с помощью статинов (Aslam et al., 2019).

В настоящее время проводится значительное количество клинических испытаний ингибиторов малых ГТФаз семейства Rho в лечении различных типов рака. Исследования показывают, что ингибирование Cdc42-связывающей киназы (MRCK) нарушает рост и диссеминацию рака кожи (Unbekandt et al., 2014). Селективные ингибиторы MRCK показали стойкие антипролиферативные эффекты и в других экспериментах, однако нужны дальнейшие доклинические исследования для изучения биодоступности и токсичности (Cordover et al., 2019).

Существуют клинические исследования, в которых ингибитор киназ ROCK1 и ROCK2 фасудил применяется для лечения атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний (Shi, Wei, 2013). Фасудил и рипасудил, тоже ингибитор ROCK, используются в клинической практике для лечения церебрального вазоспазма и глаукомы в Азии.

В первое исследование фазы I на людях с использованием AT13148, сильнодействующего двойного ингибитора ROCK–АКТ, были включены пациенты с солидными опухолями, в основном с колоректальным раком. В этой работе не сообщалось о клинических ответах из-за узкого терапевтического индекса и фармакокинетического профиля ингибитора (McLeod et al., 2020).

Одним из способов изучения роли RhoA в инвазии опухолей является использование ингибиторов RhoA для блокировки его активности. Например, одним из таких ингибиторов является токсин С3 бактерии *Clostridium botulinum*, который специфически инактивирует RhoA путем ковалентного присоединения АДФ-рибозы (Barth et al., 2015).

Было показано, что факторы, индуцируемые гипоксией (HIF), активируют транскрипцию генов и вызывают экспрессию RhoA и ROCK1, что

приводит к реорганизации цитоскелета, которая лежит в основе фенотипа инвазивных раковых клеток. Согласованно повышенные уровни мРНК RhoA и ROCK1 при раке молочной железы человека предсказывают смертность пациентов.

Эти результаты демонстрируют, что такой стимул микроокружения, как гипоксия, может активировать Rho-ассоциированный путь передачи сигнала и таким образом стимулировать прогрессирование рака (Gilkes et al., 2014). Для глиобластомы было показано, что белок Netrin-1 способствует ангиогенезу и инвазии опухоли, включая пути RhoA, CREB и катепсина В (Shimizu et al., 2013).

Стоит также упомянуть исследование, опубликованное в журнале *Oncotarget* в 2016 г., где было показано, что Cdc42 имеет повышенную активность в глиобластомах низкой и высокой степени злокачественности. Авторы предположили, что эти малые ГТФазы могут играть критичную роль в миграции и инвазии клеток глиобластомы, и поэтому они могут быть потенциальными мишенями для новых лекарственных препаратов (Okura et al., 2016).

Синтетические аналоги мигростатина являются мощными ингибиторами метастазирования в мышиной модели опухоли молочной железы. Введение этих соединений почти полностью ингибирует метастазирование в легкие высокометастатических клеток карциномы молочной железы.

Обработка опухолевых клеток аналогами мигростатина блокирует активацию Ras, образование ламеллиподий и миграцию клеток. Эти соединения также ингибируют миграцию клеток метастатического рака молочной железы, клеток рака предстательной железы и рака толстой кишки, но не нормальных эпителиальных клеток молочной железы, фибробластов и лейкоцитов, т.е. являются специфическими низкомолекулярными ингибиторами метастазирования опухоли (Shan et al., 2005).

Вещество Y27632 является широко исследуемым ингибитором ROCK, который предлагают применять для лечения таких различных заболеваний, как реперфузионное повреждение, гипертония, инсульт, астма и рак (Narumiya et al., 2000). Ингибитор ROCK2 белумосудил является участником более десятка клинических исследований, посвященных различным заболеваниям, включая псориаз, склероз и реакцию “трансплантат против хозяина” (Diep et al., 2018).

Интересно, что одним из применений ингибиторов ROCK является получение ИПСК с помо-

шью тиазовивина. Он представляет собой малую селективную молекулу, которая непосредственно воздействует на ROCK и увеличивает экспрессию факторов плюрипотентности. Процесс получения ИПСК с использованием тиазовивина может быть проще, быстрее и дешевле, чем без него (Hwang et al., 2008; Mohseni et al., 2015).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в обзоре данные демонстрируют разнообразие функций малых ГТФаз семейства Rho в различных клеточных процессах. В целом изучение малых ГТФаз остается активной областью исследований и в будущем может привести к созданию новых методов диагностики и лечения различных заболеваний, включая рак, нейродегенеративные, аутоиммунные и сердечно-сосудистые.

Поскольку малые ГТФазы семейства Rho регулируют клеточную подвижность, они являются потенциальными мишенями для разработки новых методов эффективного подавления способности опухолевых клеток к инвазии и метастазированию; методов, основанных на применении ингибиторов как самих малых ГТФаз семейства Rho, так и ассоциированных с ними киназ.

Кроме того, такие ингибиторы могут оказывать дополнительный эффект путем блокирования ангиогенеза, сокращая поставку питательных веществ и кислорода в опухоль и тем самым замедляя ее рост.

Однако в настоящее время ингибиторы малых ГТФаз имеют ограниченную эффективность и могут вызывать нежелательные побочные эффекты, поэтому для разработки новых лекарственных препаратов необходимо более глубокое исследование механизмов регуляции малых ГТФаз семейства Rho в различных условиях и клетках разных типов.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А19-119020-190093-9) Института цитологии РАН и поддержана Министерством науки и высшего образования РФ по проекту 15.БРК.21.0011 (соглашение № 075-15-2021-1063).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Полянская Г.Г.* 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Клеточные культуры, вып. 34. С. 3. (*Poljanskaya G.G.* 2018. Comparative analysis of the lines of human mesenchymal stem cells derived in the collection of cell cultures of vertebrates (review). Collection "Cell cultures". No. 34. P. 3).
- Прайс К.М.* 1997. Синтез теломерной С-цепи. Биохимия. Т. 62. № 11. С. 1423. (*Price C.M.* 1997. Synthesis of telomeric C-strand. Biochemistry (Moscow). V. 62. P. 1423).
- Хейфлик Л.* 1997. Смертность и бессмертие на клеточном уровне. Биохимия. Т. 62. № 11. С. 1380. (*Hayflick L.* 1997. Mortality and immortality at the cellular level. Biochemistry (Moscow). V. 62. P. 1380).
- Abbi V., Piplani P.* 2020. Rho-kinase (ROCK) inhibitors—a neuroprotective therapeutic paradigm with a focus on ocular utility. Curr. Med. Chem. V. 27. P. 2222. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181031102829>
- Aguilar B. J., Zhao Y., Zhou H., Huo S., Chen Y.H., Lu Q.* 2019. Inhibition of Cdc42—intersectin interaction by small molecule ZCL367 impedes cancer cell cycle progression, proliferation, migration, and tumor growth. Cancer Biol. Ther. V. 20 P. 740. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1564559>
- Al-Azab M., Safi M., Idiattullina E., Al-Shaebi F., Zaky M.* 2022. Aging of mesenchymal stem cell: machinery, markers, and strategies of fighting. Cell. Mol. Biol. Lett. V. 27. P. 69. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00366-0>
- Al-Koussa H., Atat O.E., Jaafar L., Tashjian H., El-Sibai M.* 2020. The role of Rho GTPases in motility and invasion of glioblastoma cells. Anal. Cell. Pathol. V. 2020. P. 9274016. <https://doi.org/10.1155/2020/9274016>
- Amano M., Nakayama M., Kaibuchi K.* 2010. Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. Cytoskeleton, V. 67 P. 545. <https://doi.org/10.1002/cm.20472>
- Aslam M., Troidl C., Tanislav C., Rohrbach S., Gündüz D., Hamm, C.W.* 2019. Inhibition of protein prenylation of GTPases alters endothelial barrier function. Int. J. Mol. Sci. V. 21. P. 2. <https://doi.org/10.3390/ijms21010002>
- Barbalata C.I., Tefas L.R., Achim M., Tomuta I., Porfire, A.S.* 2020. Statins in risk-reduction and treatment of cancer. J. Clin. Oncol. V. 11. P. 573. <https://doi.org/10.5306/wjco.v11.i8.573>
- Barth H., Fischer S., Möglich A., Förtsch, C.* 2015. Clostridial C3 toxins target monocytes/macrophages and modulate their functions. Front. Immunol. V. 6. P. 339. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00339>
- Berthold J., Schenková K., Ramos S., Miura Y., Furukawa M., Aspenström P., Rivero F.* 2008. Characterization of

- RhoBTP-dependent Cul3 ubiquitin ligase complexes — evidence for an autoregulatory mechanism. *Exp. Cell Res.* V. 314. P. 3453. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.005>
- Bobkov D., Polyanskaya A., Musorina A., Poljanskaya G.* 2022. The RhoA nuclear localization changes in replicative senescence: new evidence from in vitro human mesenchymal stem cells studies. *Biocell.* V. 46. P. 2053. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.019469>
- Bobkov D., Polyanskaya A., Musorina A., Lomert E., Shabelnikov S.* 2020. Replicative senescence in MSCWJ-1 human umbilical cord mesenchymal stem cells is marked by characteristic changes in motility, cytoskeletal organization, and RhoA localization. *Mol. Biol. Rep.* V. 47. P. 3867. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05476-6>
- Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E.* 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* V. 279. P. 349. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>
- Bolick S.C.E., Landowski T.H., Boulware D., Oshiro M.M., Ohkanda J., Hamilton A.D., Sebt S.M., Dalton W.S.* 2003. The farnesyl transferase inhibitor, FTI-277, inhibits growth and induces apoptosis in drug-resistant myeloma tumor cells. *Leukemia.* V. 17. P. 451.
- Bos J.L., Rehmann H., Wittinghofer A.* 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* V. 129. P. 865. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>
- Cabrera M., Echeverria E., Lenicov F.R., Cardama G., Gonzalez N., Davio C., Fernández N., Menna P.L.* 2017. Pharmacological Rac1 inhibitors with selective apoptotic activity in human acute leukemic cell lines. *Oncotarget.* V. 8: 98509. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21533>
- Cai R., Wang Y., Huang Z., Zou Q., Pu Y., Yu C., Cai Z.* 2021. Role of RhoA/ROCK signaling in Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* V. 414: 113481. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113481>
- Cardama G.A., Gonzalez N., Ciarlantini M., Gandolfi Donadio, L., Comin M.J., Alonso D.F., Menna P.L., Gomez D.E.* 2014. Proapoptotic and antiinvasive activity of Rac1 small molecule inhibitors on malignant glioma cells. *Onco Targets Ther.* V. 2021-2033. <https://doi.org/10.2147/OTT.S67998>
- Chen Y., Wang X., Wu Z., Jia S., Wan M.* 2023. Epigenetic regulation of dental-derived stem cells and their application in pulp and periodontal regeneration. *Peer J.* V. 11: 14550. <https://doi.org/10.7717/peerj14550>
- Chircop M.* 2014. Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases.* V. 5: e29770. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29770>
- Comunale F., Causeret M., Favard C., Cau J., Taulet N., Charrasse S., Gauthier-Rouvière C.* 2007. Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biol. Cell.* V. 99. P. 503. <https://doi.org/10.1042/BC20070011>
- Cordover E., Wei, J., Patel C., Shan N. L., Gionco J., Sargsyan D., Wu R., Cai L., Kong A., Jacinto E., Minden A.* 2019. KPT-9274, an inhibitor of PAK4 and NAMPT, leads to downregulation of mTORC2 in triple negative breast cancer cells. *Chem. Res. Toxicol.* V. 33. P. 482.
- Crosas-Molist E., Samain R., Kohlhammer L., Orgaz J. L., George S. L., Maiques O., Barcelo J., Sanz-Moreno V.* 2022. Rho GTPase signaling in cancer progression and dissemination. *Physiol. Rev.* V. 102. P. 455.
- De Curtis I., Meldolesi J.* 2012. Cell surface dynamics-how Rho GTPases orchestrate the interplay between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* V. 125. P. 4435. <https://doi.org/10.1242/jcs.108266>
- Debidda M., Williams D. A., Zheng Y.* 2006. Rac1 GTPase regulates cell genomic stability and senescence. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 38519.
- Dharmawardhane S., Hernandez E., Vlaar C.* 2013. Development of EHop-016: a small molecule inhibitor of Rac. *The Enzymes.* V. 33. P.117.
- Diep D.T.V., Hong K., Khun T., Zheng M., Ul-Haq A., Jun H.S., Kim Y.B., Chun K. H.* 2018. Anti-adipogenic effects of KD025 (SLx-2119), a ROCK2-specific inhibitor, in 3T3-L1 cells. *Sci. Rep.* V. 8. P. 2477. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20821-3>
- Dill J., Patel, A. R., Yang X. L., Bachoo R., Powell C. M., Li S.* 2010. A molecular mechanism for ibuprofen-mediated RhoA inhibition in neurons. *J. Neurosci.* V. 30. P. 963.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int. Soc. Cell. Ther. Position Statement.* *Cytother.* V. 8. P. 315.
- Dubash A. D., Guilluy C., Srougi M. C., Boulter E., Burrige K., Garcia-Mata R.* 2011. The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PloS One.* V. 6: 7380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017380>
- East M. P., Asquith C. R.* 2021. CDC42BPA/MRCK [alpha]: a kinase target for brain, ovarian and skin cancers. *Nat. Rev. Drug Discov.* V. 20. P. 167. <https://doi.org/10.1038/d41573-021-00023-9>
- Ellenbroek S. I., Collard J. G.* 2007. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin. Exp. Metastasis.* V. 24. P. 657.
- Florian M. C., Dörr K., Niebel A., Daria D., Schrezenmeier H., Rojewski M., Filippi M.D., Hasenberg A., Gunzer M., Scharffetter-Kochanek K., Zheng Y., Geiger H.* 2012. Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell.* V. 10. P. 520. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.007>
- Florian M. C., Klenk J., Marka G., Soller K., Kiryakos H., Peter R., Herbolsheimer F., Rothenbacher D., Denking M., Geiger H.* 2017. Expression and activity of the small RhoGTPase Cdc42 in blood cells of older adults are associated with age and cardiovascular disease. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* V. 72. P. 1196. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx091>
- Gilkes D. M., Xiang L., Lee S.J., Chaturvedi P., Hubbi M. E., Wirtz D., Semenza G. L.* 2014. Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 111. P. 384.

- Goh L.L., Manser E. 2012. The GTPase-deficient Rnd proteins are stabilized by their effectors. *J. Biol. Chem.* V. 287. P. 31311.
- Goodman K.B., Cui H., Dowdell S.E., Gaitanopoulos D.E., Ivy R.L., Sehon C.A., Stavenger R.A., Wang G.Z., Viet A.Q., Xu W., Ye G., Semus S.F., Evans C., Fries H.E., Jolivet L.J., et al. 2007. Development of dihydropyridone indazole amides as selective Rho-kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* V. 50. P. 6.
- Gray J.L., von Delft F., Brennan P.E. 2020. Targeting the small GTPase superfamily through their regulatory proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* V. 59. P. 6342. <https://doi.org/10.1002/anie.201900585>
- Guiler W., Koehler A., Boykin C., Lu Q. 2021. Pharmacological modulators of small GTPases of rho family in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* V. 15. P. 661612. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.661612>
- Guo Y., Kenney S.R., Muller C.Y., Adams S., Rutledge T., Romero E., Murray-Krezan C., Prekeris R., Sklar L.A., Hudson L.G., Wandinger-Ness A. 2015. R-Ketorolac targets Cdc42 and Rac1 and alters ovarian cancer cell behaviors critical for invasion and metastasis. *Mol. Cancer Ther.* 2015. V. 14. P. 2215. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0419>
- Haga R. B., Ridley A. J. 2016. Rho GTPases: regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases.* V. 7. P. 207. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>
- Hanna S., El-Sibai M. 2013. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell. Signal.* V. 25. P. 1955. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.009>
- Hervé J.C., Bourmeyster N. 2015. Rho GTPases at the crossroad of signaling networks in mammals. *Small GTPases.* V. 6. P. 43. <https://doi.org/10.1080/21541248.2015.1044811>
- Hezan K., Mo R., Wang C., Yue L., Zongjin L. 2022. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells and their secretomes in Pneumonia. *Curr. Pharm. Biotechnol.* V. 23. P. 1153. <https://doi.org/10.2174/1389201022666210907115126>
- Hinde E., Yokomori K., Gaus K., Hahn K.M., Gratton E., 2014. Fluctuation-based imaging of nuclear Rac1 activation by protein oligomerisation. *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4219. <https://doi.org/10.1038/srep04219>
- Ho A.L., Brana I., Haddad R., Bauman J., Bible K., Oosting S., Wong D.J., Ahn M., Boni V., Even C., Fayette J., MD, Flor M.J., Harrington K., Hong D.S., Kim S.B., et al. 2021. Tipifarnib in head and neck squamous cell carcinoma with HRAS mutations. *J. Clin. Oncol.* V. 39. P. 1856. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02903>
- Hodge R.G., Ridley A.J. 2016. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016. V. 17. P. 496. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>
- Hong L., Kenney S.R., Phillips G.K., Simpson G., Schroeder C.E., Nöth J., Romero E., Swanson S., Waller A., Strouse J.J., Carter M., Chigaev A., Ursu O., Oprea T., Hjelle B. 2013. Characterization of a Cdc42 protein inhibitor and its use as a molecular probe. *J. Biol. Chem.* V. 288. P. 8531.
- Humphries-Bickley T., Castillo-Pichardo L., Hernandez-O'Farrill E., Borrero-Garcia L.D., Forestier-Roman I., Gerena Y., Blanco M., Rivera-Robles M., Rodriguez-Medina J.R., Cubano L.A., Vlaar C.P., Dharmawardhane S. 2017. Characterization of a Dual Rac/Cdc42 Inhibitor MBQ-167 in Metastatic Cancer MBQ-167, a Rac/Cdc42 inhibitor in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* V. 16. P. 805. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0442>
- Humphries B., Wang Z., Yang C. 2020. Rho GTPases: big players in breast cancer initiation, metastasis and therapeutic responses. *Cells.* V. 9. P. 2167. <https://doi.org/10.3390/cells9102167>
- Hwang K.C., Kim J.Y., Chang W., Kim D.S., Lim S., Kang S.M., Kim D.W. 2008. Chemicals that modulate stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 105. P. 7467.
- Jaffe A.B., Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005. V. 21. P. 247.
- Jayasinghe M., Prathiraja O., Prashan B., Jena R., Silva M., Weerawarna P., Singhal M., Kayani A., Karnakoti S., Jain S. 2022. The role of mesenchymal stem cells in the treatment of type 1 diabetes. *Cureus.* V. 14. P. e27337. <https://doi.org/10.7759/cureus.27337>
- Jim Leu S.J., Sung J.S., Huang M.L., Chen M.Y., Tsai T.W. 2013. A novel anti-CCN1 monoclonal antibody suppresses Rac-dependent cytoskeletal reorganization and migratory activities in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 434. P. 885.
- Yung Y.C., Stoddard N.C., Chun J. 2014. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.* V. 55. P. 1192.
- Kale V.P., Hengst J.A., Desai D.H., Dick T.E., Choe K.N., Colledge A.L., Takahashi Y., Sung S.S., Amin S.G., Yun G.K. 2014. A novel selective multikinase inhibitor of ROCK and MRCK effectively blocks cancer cell migration and invasion. *Cancer Letters.* V. 354. P. 299.
- Kaneko Y., Ohta M., Inoue T., Mizuno K., Isobe T., Tanabe S., Tanihara H. 2016. Effects of K-115 (Ripasudil), a novel ROCK inhibitor, on trabecular meshwork and Schlemm's canal endothelial cells. *Sci. Rep.* V. 6. P. 1. <https://doi.org/10.1038/srep19640>
- Kast R., Schirok H., Figueroa-Pérez S., Mittendorf J., Gnoth M.J., Apeler H., Lenz J., Franz J. K., Knorr A., Hütter J., Lobell M., Zimmermann K., Münter K., Augstein H., Ehmke H., Staschet J.P. 2007. Cardiovascular effects of a novel potent and highly selective azaindole-based inhibitor of Rho-kinase. *Br. J. Pharmacol.* V. 152. P. 1070.
- Kent D.G., Copley M.R., Benz C., Wöhrer S., Dykstra B.J., Ma E., Eaves C.J. 2009. Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. *Blood.* V. 113. P. 6342.
- Kerber R.A., O'Brien E., Cawthon R.M. 2009. Gene expression profiles associated with aging and mortality in humans. *Aging Cell.* 2009. V. 8. P. 239. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00467.x>
- Kim J., Islam R., Cho J.Y., Jeong H., Cap K.C., Park Y., Hossain A.J., Park J.B. 2018. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway. *J. Cell. Physiol.* V. 233 P. 6381.
- Kristó I., Bajusz I., Bajusz C., Borkúti P., Vilmos P. 2016. Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus. *Histochem. Cell Biol.* V. 145. P. 373.

- Lanning C.C., Daddona J.L., Ruiz-Velasco R., Shafer S.H., Williams C.L. 2004. The Rac1 C-terminal polybasic region regulates the nuclear localization and protein degradation of Rac1. *J. Biol. Chem.* V. 279. P. 44197.
- Lawson C.D., Ridley A.J. 2018. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J. Cell Biol.* V. 217. P. 447.
- Lee K.H., Koh M., Moon A. 2016. Farnesyl transferase inhibitor FTI-277 inhibits breast cell invasion and migration by blocking H-Ras activation. *Oncol. Lett.* V. 12. P. 2222. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4837>
- Leins H., Mulaw M., Eiwien K., Sakk V., Liang Y., Denkin-ger M., Geiger H., Schirmbeck R. 2018. Aged murine hematopoietic stem cells drive aging-associated immune remodeling. *Blood.* V. 132. P. 565.
- Li C., Zhen G., Chai Y., Xie L., Crane J. L., Farber E., Wan M. 2016. RhoA determines lineage fate of mesenchymal stem cells by modulating CTGF-VEGF complex in extracellular matrix. *Nat. Commun.* V. 7. P. 11455. <https://doi.org/10.1038/ncomms11455>
- Liao J. K., Seto M., Noma K. 2007. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* V. 50. P. 17.
- Lin B. J., Tsao S. H., Chen A., Hu S. K., Chao L., Chao P. H. G. 2017. Lipid rafts sense and direct electric field-induced migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 114. P. 8568.
- Lin T., Ambasadhan R., Yuan X., Li W., Hilcove S., Abuja-rour R., Ding S. 2009. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat. Methods.* V. 6. P. 805. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1393>
- Linseman D. A., Lu Q. 2023. Rho family GTPases and their effectors in neuronal survival and neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* V. 17. P. 67.
- Liu Y., Schwam J., Chen Q. 2022. Senescence-associated cell transition and internation (SACTAI): a proposed mechanism for tissue aging, repair and degeneration. *Cells.* V. 11. P. 1089. <https://doi.org/10.3390/cells11071089>
- Liu H. W., Halayko A. J., Fernandes D. J., Harmon G. S., McCauley J. A., Kocieniewski P., Solway J. 2003. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* V. 29. P. 39.
- Löhn M., Plettenburg O., Ivashchenko Y., Kannt A., Hofmeis-ter A., Kadereit D., Ruetten H. 2009. Pharmacological characterization of SAR407899, a novel rho-kinase inhibitor. *Hypertension.* V. 54. P. 676. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134353>
- Loirand G., Guérin P., Pacaud P. 2006. Rho kinases in car-diovascular physiology and pathophysiology. *Circ. Res.* V. 98. P. 322.
- Ma N., Xu E., Luo Q., Song G. 2023. Rac1: A regulator of cell migration and a potential target for cancer therapy. *Molecules.* V. 28. P. 2976. <https://doi.org/10.3390/mol-ecules28072976>
- Magalhaes Y. T., Farias J. O., Silva L. E., Forti F. L. 2021. GTPases, genome, actin: a hidden story in DNA damage response and repair mechanisms. *DNA repair.* V. 100: 103070. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103070>
- Maldonado M. D. M., Dharmawardhane S. 2018. Targeting rac and Cdc42 GTPases in cancer. *Cancer Res.* V. 78. P. 3101.
- Maldonado M. D. M., Medina J. I., Velazquez L., Dharmawardhane S. 2020. Targeting Rac and Cdc42 GEFs in metastatic cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. P. 201. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00201>
- Malhi M., Norris M. J., Duan W., Moraes T. J., Maynes J. T. 2021. Statin-mediated disruption of Rho GTPase prenylation and activity inhibits respiratory syncytial virus infection. *Commun. Biol.* V. 4. P. 1239. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02754-2>
- Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol.* V. 34. P. 328.
- McLeod R., Kumar R., Papadatos-Pastos D., Mateo J., Brown J. S., Garces A. H. I., Banerji U. 2020. First-in-human study of AT13148, a dual ROCK-AKT inhibitor in patients with solid tumors. *Clin. Cancer Res.* V. 26. P. 4777. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0700>
- Mizukawa B., Wei J., Shrestha M., Wunderlich M., Chou F. S., Griesinger A., Mulloy J. C. 2011. Inhibition of Rac GTPase signaling and downstream prosurvival Bcl-2 proteins as combination targeted therapy in MLL-AF9 leukemia. *Blood.* V. 118. P. 5235.
- Mohseni R., Shoaee-Hassani A., Verdi J. 2015. Reprogramming of endometrial adult stromal cells in the presence of a ROCK inhibitor, thiazovivin, could obtain more efficient iPSCs. *Int. J. Cell Biol.* V. 39. P. 515. <https://doi.org/10.1002/cbin.10411>
- Moissoglu K., Schwartz M.A. 2014. Spatial and temporal control of Rho GTPase functions. *Cell. Logist.* V. 4: e943618. <https://doi.org/10.4161/21592780.2014.943618>
- Mosaddeghzadeh N., Ahmadian M.R. 2021 The Rho family GTPases: mechanisms of regulation and signaling. *Cells.* 2021. V. 10. P. 1831. <https://doi.org/10.3390/cells10071831>
- Mou C., Wang X., Li W., Li Z., Liu N., Xu Y. 2023. Efficacy of mesenchymal stromal cells intraspinal transplantation for patients with different degrees of spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Cytotherapy.* V. 25. P. 530. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.01.012>
- Narumiya S., Ishizaki T., Ufhata M. 2000. Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Meth. Enzymol.* V. 325. P. 273.
- Narumiya S., Thumkeo D. 2018. Rho signaling research: history, current status and future directions. *FEBS Lett.* V. 592. P. 1763.
- Navarro L., Chen X., Viviecas L.T., Ardila-Roa A., Luna-Gonzalez M., Sossa C., Arango-Rodriguez M. 2022. Mesenchymal stem cells for critical limb ischemia: their function, mechanism, and therapeutic potential. *Stem Cell Res. Ther.* V. 13. P. 345. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03043-3>
- Navarro-Lérida I., Sánchez-Álvarez M., del Pozo M.Á., 2021. Post-translational modification and subcellular compartmentalization: emerging concepts on the regulation and physiopathological relevance of RhoGTPases. *Cells.* 2021. V. 10. P. 1990. <https://doi.org/10.3390/cells10081990>

- Nguyen L. K., Kholodenko B. N., Von Kriegsheim A. 2018. Rac1 and RhoA: networks, loops and bistability. *Small GTPases*. V. 9. P. 316. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1224399>
- Okura H., Golbourn B. J., Shahzad U., Agnihotri S., Sabha N., Krieger J. R., Rutka J. T. 2016. A role for activated Cdc42 in glioblastoma multiforme invasion. *Oncotarget*. V. 7. P. 56958. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10925>
- Onesto C., Shutes A., Picard V., Schweighoffer F., Der C. J. 2008. Characterization of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *Meth. Enzymol*. V. 439. P. 111.
- Özcan S., Alessio N., Acar M.B., Mert E., Omerli F., Peluso G., Galderisi U. 2016. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging (Albany NY)*. V. 8. P. 1316. <https://doi.org/10.18632/aging.100971>
- Park S., Kim D., Jung Y. G., Roh S. 2015. Thiazovivin, a Rho kinase inhibitor, improves stemness maintenance of embryo-derived stem-like cells under chemically defined culture conditions in cattle. *Anim. Reprod. Sci*. V. 161. P. 47. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.003>
- Patel R. A., Forinash K. D., Pireddu R., Sun Y., Sun N., Martin M. P., Sebt S. M. 2012. RKI-1447 is a potent inhibitor of the Rho-associated ROCK kinases with anti-invasive and antitumor activities in breast cancer RKI-1447, a potent ROCK inhibitor with antitumor activity. *Cancer Res*. V. 72. P. 5025. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0954>
- Pawelec G. P. 2018. CASIN the joint: immune aging at the stem cell level. *Blood. The J. Am. Soc. Hematol*. V. 132. P. 553.
- Payapilly A., Malliri A. 2018. Compartmentalisation of RAC1 signalling. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2018. V. 54. P. 50. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2018.04.009>
- Pelish H. E., Peterson J. R., Salvarezza S. B., Rodriguez-Boulan E., Chen J. L., Stamnes M., Kirchhausen T. 2006. Secramine inhibits Cdc42-dependent functions in cells and Cdc42 activation *in vitro*. *Nat. Chem. Biol*. V. 2. P. 39. <https://doi.org/10.1038/nchembio751>
- Pischiutta F., Caruso E., Cavaleiro H., Salgado A., Loane D., Zanier E. 2022. Mesenchymal stromal cell secretome for traumatic brain injury: Focus on immunomodulatory action. *Exp. Neurol*. V. 357: 114199. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114199>
- Poljanskaya G.G., Bobkov D.E., Koltsova A.M., Musorina A.S., Mikhailova N.A. 2022. Creation, working principles, development of applied and scientific activities of the Collection of cell cultures of vertebrate. (review). *Bio. Comm*. V. 67. P. 312. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2022.406>
- Porter A. P., Papaioannou A., Malliri A. 2016. Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases*. V. 7. P. 123. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1173767>
- Prieto-Dominguez N., Parnell C., Teng Y. 2019. Drugging the small GTPase pathways in cancer treatment: promises and challenges. *Cells*. V. 8. P. 255. <https://doi.org/10.3390/cells8030255>
- Qadir M. I., Parveen A., Ali M. 2015. Cdc42: role in cancer management. *Chem. Biol. Drug Des*. V. 86. P. 432.
- Rajakylä E.K., Vartiainen M.K. 2011. Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Small GTPases*. 2014. V. 5. P. e27539. <https://doi.org/10.4161/sgtp.27539>
- Ramachandran C., Patil R.V., Combrink K., Sharif N.A., Srinivas S.P. 2011. Rho-Rho kinase pathway in the actomyosin contraction and cell-matrix adhesion in immortalized human trabecular meshwork cells. *Mol. Vision*. V. 17. P. 1877. <https://doi.org/PMC3144732>
- Rane C.K., Minden A. 2014. P21 activated kinases. *Small GTPases*. 2014. V. 5. P. e28003. <https://doi.org/10.4161/sgtp.28003>
- Ratushnyy A., Ezdakova M., Buravkova L. 2020. Secretome of senescent adipose-derived mesenchymal stem cells negatively regulates angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci*. V. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21051802>
- Ren R., Humphrey A. A., Koczyński C., Gong H. 2023. Rho kinase inhibitor AR-12286 reverses steroid-induced changes in intraocular pressure, effective filtration areas, and morphology in mouse eyes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. V. 64. P. 7. <https://doi.org/10.1167/iovs.64.2.7>
- Ridley A.J. 2015. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2015. V. 36. P. 103. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2015.08.005>
- Rotblat B., Ehrlich M., Haklai R., Kloog, Y. 2008. The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid (Salirasib) disrupts the spatiotemporal localization of active Ras: a potential treatment for cancer. *Meth. Enzymol*. V. 439. P. 467–489. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00432-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00432-6)
- Sadok A., Marshall C.J. 2014. Rho GTPases: Masters of cell migration. *Small GTPases*. V. 5. P. e983878. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29710>
- Sahai E., Olson M.F. 2006. Purification of TAT-C3 exoenzyme. *Meth. Enzymol*. V. 406. P. 128.
- Samsonraj R., Law S., Chandra A., Pignolo R. 2023. An unbiased proteomics approach to identify the senescence-associated secretory phenotype of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Rep. V*. 18. P. 101674. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2023.101674>
- Sandrock K., Bielek H., Schradi K., Schmidt G., Klugbauer N. 2010. The nuclear import of the small GTPase Rac1 is mediated by the direct interaction with karyopherin  $\alpha 2$ . *Traffic*. V. 11. P. 198. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01015.x>
- Santos G. L., Hartmann S., Zimmermann W. H., Ridley A., Lutz S. 2019. Inhibition of Rho-associated kinases suppresses cardiac myofibroblast function in engineered connective and heart muscle tissues. *J. Mol. Cell. Cardiol*. V. 134. P. 13. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.06.015>
- Santos J. C., Profitós-Pelejà N., Sánchez-Vinces S., Roué G. 2023. RHOA therapeutic targeting in hematological cancers. *Cells*. V. 12. P. 433. <https://doi.org/10.3390/cells12030433>
- Sarrabayrouse G., Pich C., Teiti I., Tilkin-Mariame A.F. 2017. Regulatory properties of statins and Rho GTPases prenylation inhibitors to stimulate melanoma immunogenicity and promote anti-melanoma immune

- response. *Int. J. Cancer*. V. 140. P. 747. <https://doi.org/10.1002/ijc.30422>
- Schmidt S. I., Blaabjerg M., Freude K., Meyer M. 2022. RhoA signaling in neurodegenerative diseases. *Cells*. V. 11. P. 1520. <https://doi.org/10.3390/cells11091520>
- Semenova E., Grudniak M. P., Machaj E.K., Bocian K., Chroscinska-Krawczyk M., Trochonowicz M., Stepaniec I.M., Murzyn M., Zagorska K.E., Boruczowski D., Kolanowski T.J., Oldak T., Rozwadowska N. 2021. Mesenchymal stromal cells from different parts of umbilical cord: approach to comparison and characteristics. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 17. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10157-3>
- Shan D., Chen L., Njardarson J.T., Gaul C., Ma X., Danishefsky S.J., Huang X.Y. 2005. Synthetic analogues of migrastatin that inhibit mammary tumor metastasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 3772.
- Shang X., Marchioni F., Evelyn C.R., Sipes N., Zhou X., Seibel W., Wortman M., Zheng Y., 2013. Small-molecule inhibitors targeting G-protein-coupled Rho guanine nucleotide exchange factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 3155.
- Shang X., Marchioni F., Sipes N., Evelyn C. R., Jerabek-Willemsen M., Duhr S., Seibel W., Wortman M., Zheng Y. 2012. Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chem. Biol.* V. 19. P. 699. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.05.009>
- Shi J., Wei L. 2013. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology: the effect of fasudil. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* V. 62. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3182a3718f>
- Shimizu A., Nakayama H., Wang P., König C., Akino T., Sandlund J., Klagsbrun M. 2013. Netrin-1 promotes glioblastoma cell invasiveness and angiogenesis by multiple pathways including activation of RhoA, cathepsin B, and cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* V. 288. P. 2210.
- Shin S., Lee J., Kwon Y., Park K-S., Jeong J-H., Choi S-J., Bang S., Chang J., Lee C. 2021. Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's jelly. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 845. <https://doi.org/10.3390/ijms22020845>
- Sousa A. Coelho P., Leite F., Teixeira C., Rocha A., Santos I., Baylina P., Fernandes R., Soares R., Costa R, Gomes A. 2023. Impact of umbilical cord mesenchymal stromal/stem cell secretome and cord blood serum in prostate cancer progression. *Hum. Cell*. V. 36. P. 1160.
- Spiering D., Hodgson L. 2011. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh. Migr.* V. 5. P. 170. <https://doi.org/10.4161/cam.5.2.14403>
- Surviladze Z., Waller A., Wu Y., Romero E., Edwards B.S., Wandinger-Ness A., Sklar L.A. 2010. Identification of a small GTPase inhibitor using a high-throughput flow cytometry bead-based multiplex assay. *J. Biomol. Screen.* V. 15. P. 10. <https://doi.org/10.1177/1087057109352240>
- Szczepanowska J. 2009. Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. *Acta Biochimica Polonica*. V. 56. P. 225.
- Taniuchi K., Yokotani K., Saibara T. 2012. BART inhibits pancreatic cancer cell invasion by Rac1 inactivation through direct binding to active Rac1. *Neoplasia*. V. 14. P. 440. <https://doi.org/10.1593/neo.12352>
- Tong J., Li L., Ballermann B., Wang Z. 2016. Phosphorylation and activation of RhoA by ERK in response to epidermal growth factor stimulation. *PLoS One*. V. 11. P. e0147103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147103>
- Turano E., Scambi I., Virla F., Bonetti B., Mariotti R. 2023. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells: towards novel therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 2917. <https://doi.org/10.3390/ijms24032917>
- Turinetto V., Vitale E., Giachino C. 2016. Senescence in human mesenchymal stem cells: Functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int. J. Mol. Sci.* V. 17. P. 1164. <https://doi.org/10.3390/ijms17071164>
- Ueyama T., Geiszt M., Leto T.L. 2006. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol. Cell. Biol.* V. 26. P. 2160. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2160-2174.2006>
- Umbayev B., Yermekova A., Nessipbekova A., Syzdykova A., Askarova S. 2023. Role of a small GTPase Cdc42 in aging and age-related diseases. *Biogerontology*. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s10522-022-10008-9>
- Unbekandt M., Croft D. R., Crighton D., Mezna M., McArthur D., McConnell P., Olson M. F. 2014. A novel small-molecule MRCK inhibitor blocks cancer cell invasion. *Cell Commun. Signal.* V. 12. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12964-014-0054-x>
- Unsal-Kacmaz K., Ragunathan S., Rosfjord E., Dann S., Upeklacis E., Grillo M., Hernandez R., Mack F., Klippel A. 2012. The interaction of PKN3 with RhoC promotes malignant growth. *Mol. Oncol.* V. 6. P. 284. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.12.001>
- Van Aelst L., D'Souza-Schorey C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* V. 18. P. 2295. <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2295>
- Van Buul J. D., Geerts D., Huvencers S. 2014. Rho GAPs and GEFs: controlling switches in endothelial cell adhesion. *Cell Adh. Migr.* V. 8. P. 108. <https://doi.org/10.4161/cam.27599>
- Vidal C., Geny B., Melle J., Jandrot-Perrus M., Fontenay-Roupie M. 2002. Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood*. V. 100. P. 4462.
- Wang L., Yang L., Tian L., Mai P., Jia S., Yang L., Li L. 2017. Cannabinoid receptor 1 mediates homing of bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggered by chronic liver injury. *J. Cell. Physiol.* V. 232. P. 110.
- Williams C.L. 2003. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell. Signal.* V. 15. P. 1071. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(03\)00098-6](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(03)00098-6)
- Xin Y.L., Yu J.Z., Yang X.W., Liu C.Y., Li Y.H., Feng L., Chai Z., Wan-Fang Yang W.F., Qing Wang Q., Jiang W.J., Zhang G.X., Xiao B.G., Ma C.G. 2015. FSD-C10: A more promising novel ROCK inhibitor than Fasudil for

- treatment of CNS autoimmunity. *Bioscience Rep.* V. 35. <https://doi.org/10.1042/BSR20150032>
- Xu J., Li Y., Yang X., Chen Y., Chen M. 2013. Nuclear translocation of small G protein RhoA via active transportation in gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* V. 30. P. 1878. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2638>
- Yang B., Radel C., Hughes D., Kelemen S., Rizzo V. 2011. p190 RhoGTPase-activating protein links the  $\beta$ 1 integrin/caveolin-1 mechanosignaling complex to RhoA and actin remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 31. P. 376. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.217794>
- Yang Y., Zhang W., Wang X., Yang J., Cui Y., Song H., Li W., Li W., Wu L., Du Y., He Z., Shi J., Zhang J. 2023. A passage-dependent network for estimating the in vitro senescence of mesenchymal stromal/stem cells using microarray, bulk and single cell RNA sequencing. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 11: 998666. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.998666>
- Zhang Q. G., Wang R., Han D., Dong Y., Brann D. W. 2009. Role of Rac1 GTPase in JNK signaling and delayed neuronal cell death following global cerebral ischemia. *Brain Res.* V. 1265. P. 138.
- Zhang Z., Liu M., Zheng Y. 2021. Role of Rho GTPases in stem cell regulation. *Biochem. Soc. Trans.* V. 49. P. 2941. <https://doi.org/10.1042/BST20211071>
- Zins K., Lucas T., Reichl P., Abraham D., Aharinejad S. 2013. A Rac1/Cdc42 GTPase-specific small molecule inhibitor suppresses growth of primary human prostate cancer xenografts and prolongs survival in mice. *PloS one.* V. 8. P. 74924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074924>

## THE ROLE OF THE Rho FAMILY SMALL GTPases IN REGULATION OF NORMAL AND PATHOLOGICAL PROCESSES

D. E. Bobkov<sup>a, b, c, \*</sup>, A. V. Lukacheva<sup>a</sup>, A. I. Gorb<sup>d</sup>, G. G. Poljanskaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Russia

<sup>b</sup> Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341, Russia

<sup>c</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russia

<sup>d</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 194064, Russia

\*E-mail: bobkov@incras.ru

Small GTPases are small (about 21 kDa) proteins that regulate many biological processes, such as vesicle transport, cell division cycle, cell migration, invasion, adhesion, proliferation and DNA repair, they are involved in carcinogenesis and neurodegenerative diseases. Some of these proteins, like those in the Rho family, are important regulators of the actin cytoskeleton, which has an impact on cell adhesion and motility. The review considers normal and pathological processes in human cells, which are regulated by the Rho family small GTPases. Particular attention is paid to inhibitors of small GTPases and their use in the treatment of various diseases.

**Keywords:** cytoskeleton, small GTPases, Rho, ROCK, mesenchymal stem cells, replicative senescence, carcinogenesis, invasion

УДК 576.7:571.27:612.112.5

## РОЛЬ АУТОФАГИИ И ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ В ПРОЦЕССАХ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ

© 2024 г. С. Г. Зубова<sup>1, \*</sup>, А. В. Моршнева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

\* E-mail: egretta\_julia@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2023 г.

После доработки 04.09.2023 г.

Принята к публикации 21.09.2023 г.

Причиной многих тяжелых недугов, в том числе диабета, ожирения, остеопороза и нейродегенеративных заболеваний является хроническое воспаление, которое развивается в жировой ткани, костях или головном мозге. Такое воспаление возникает из-за смещения поляризации макрофагов (микроглии) в сторону провоспалительного фенотипа M1. В настоящее время доказано, что поляризацию макрофагов определяет внутриклеточный уровень аутофагии в макрофаге. Модулируя аутофагию, можно вызвать переключение активностей макрофагов в сторону M1 или M2. Обобщив накопленный в литературе материал, мы полагаем, что активация аутофагии репрограммирует макрофаг в сторону M2, заменяя его белковое содержимое, рецепторный аппарат и включая иной тип метаболизма. Термин “репрограммирование” наиболее подходит для этого процесса, поскольку за ним следует смена функциональной активности макрофага, а именно переключение от цитотоксической провоспалительной активности на противовоспалительную (регенеративную). Модуляция аутофагии может быть подходом к терапии онкозаболеваний, нейродегенеративных расстройств, остеопороза, диабета и других тяжелых заболеваний.

**Ключевые слова:** макрофаг, микроглия, фенотип M1/M2, аутофагия, репрограммирование

**DOI:** 10.31857/S0041377124010023, **EDN:** IGVMRG

Раневой процесс, в котором ключевой клеткой является макрофаг, состоит из двух фаз – провоспалительной и регенеративной. В первой фазе процесса из раны удаляются патогенные, мертвые и поврежденные клетки. Во второй фазе стимулируется ранозаживление за счет ростовых и ангиогенных факторов.

В литературе была сформулирована парадигма, описывающая два полярных фенотипа макрофагов, соответствующих фазам раневого процесса – провоспалительных M1 и противовоспалительных M2, способных переходить друг в друга (Hesketh et al., 2017). Эти полярные состояния макрофагов имеют ключевое значение для терапии онкозаболеваний и нейродегенеративных процессов. Если для терапии опухолей целью является активация макрофагального статуса M1, то для нейродегенеративных процессов терапия нацелена на переход микроглии/макрофагов в статус M2. В течение нескольких лет было установлено, что катаболический процесс аутофагии направляет поляризацию макрофагов в тот или иной фенотип.

Цель настоящего обзора заключается в том, чтобы на основе литературных данных показать,

что за счет включения аутофагии в макрофагах активируется иная программа, связанная с замещением белкового содержания клетки, переходом на иной тип метаболизма, то есть происходит репрограммирование клетки. Кроме того, мы обобщаем данные, свидетельствующие о том, что за счет модуляции аутофагии можно влиять на процессы хронического воспаления и регенерации, протекающие в различных тканях, в том числе жировой, мышечной, костной, и головном мозге.

### ФЕНОТИПЫ МАКРОФАГОВ В СВЕТЕ ПАРАДИГМЫ M1/M2

Макрофаг является ключевой клеткой воспаления, он участвует в противовирусной, противомикробной и противоопухолевой защите организма, в регенерации и репарации тканей.

Согласно парадигме M1/M2, макрофаги могут обладать полярными функциями – провоспалительными и противовоспалительными (регенеративными). Эти функции сменяют друг друга в соответствии с фазами раневого процесса.

Каждому фенотипу макрофагов соответствует свой набор продуцируемых цитокинов. Активированные провоспалительные макрофаги M1 продуцируют факторы воспаления, среди которых интерлейкины IL-6, IL-1, IL-8, интерферон IFN $\gamma$ , фактор некроза опухолей TNF $\alpha$  и другие. Противовоспалительные макрофаги M2 продуцируют ростовые факторы, факторы, способствующие регенерации, среди которых TGF $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13 и многие другие.

Для нормального тканевого гомеостаза должен поддерживаться оптимальный баланс между макрофагами с фенотипом M1 и M2 (Hesketh et al., 2017). Макрофаги M2 обладают проопухолевым действием, стимулируют ангиогенез и метастазы и подразделяются на несколько подтипов. Выделяют подтипы M2a, M2b, M2c и M2d. Эти разновидности макрофагов M2 хорошо описаны (см. обзор: Zang, Siond, 2023).

Говоря кратко, необходимо отметить, что подтип M2a поляризуется под действием IL4 и продуцирует цитокины IL10, TGF $\beta$ , IGF, IL4 и другие. Макрофаги M2b поляризуются под действием LPS и среди прочих цитокинов (IL10, SPHK1, CCL1, IL6, IL1) продуцируют TNF- $\alpha$ , который способен ускорять клеточную миграцию и метастазирование, как было показано на клетках опухоли груди.

Образование макрофагов M2c стимулируется IL10b и TGF $\beta$ , или глюкокортикоидами. Активность этих макрофагов связана с активацией противовоспалительных генов, ремоделированием матрикса, ангиогенезом и фагоцитозом. Они продуцируют IL10, TGF $\beta$ , CCL18, CCL13. Дифференцировка макрофагов в фенотип M2d происходит под действием IL6. Эти макрофаги продуцируют IL10, IL6, CCL18, M-CSF (Zang, Siond, 2023). Все эти M2-макрофаги обладают мощным действием, стимулирующим рост, и играют роль в реализации цитокинового шторма после активации.

Макрофаги отвечают за тканевый гомеостаз и поддерживают ткань в функциональном состоянии. То есть помогают ткани противостоять изменениям и сохранять динамическое относительное постоянство состава и свойств. Они удаляют клеточный дебрис, апоптотизирующие клетки, играют роль в переработке железа, запускают воспалительные реакции и ограничивают их.

Одной из основных функций макрофагов является удаление апоптотических клеток и апоптотических телец, а парадигма M1/M2 возникает для

макрофагов при активации (в том числе при патологическом процессе).

Необходимо отметить, что в зависимости от органа, в котором макрофаги располагаются, они выполняют тканеспецифичные функции. Например, в кости остеокласты разрушают минерализованный костный матрикс, моноциты крови удаляют отмершие эндотелиальные клетки, микроглиальные клетки обеспечивают жизнеспособность нейронов, Купферские клетки печени очищают кровь от старых эритроцитов, альвеолярные макрофаги осуществляют надзор за проникшими патогенами.

Функции макрофагов по поддержанию гомеостаза не ограничиваются участием в иммунном ответе и реакцией на проникновение инфекции. Макрофаги обеспечивают трофические функции в различных тканях за счет синтеза органоспецифических белков и мРНК (Davies et al., 2013).

В 1892 году Илья Мечников описал фагоцитарную активность макрофагов и, по сути, первый заявил о существовании макрофагальной системы (Metchnikoff, 1892). В наше время показано, что макрофаги происходят из различных источников — из желточного мешка и эмбриональной печени во время формирования эмбриона, или из костного мозга после рождения. Так, моноциты крови имеют костномозговое происхождение, а тканевые макрофаги часто возникают пренатально.

Моноциты из крови могут проникать в тканеспецифичные ниши, где находятся макрофаги эмбрионального происхождения, что часто происходит в случае воспаления. Таким образом, моноциты крови, имеющие костномозговое происхождение, отличаются от тканеспецифичных резидентных макрофагов, образующихся в эмбриогенезе, тем, что это клетки циркулирующие и подвижные, но общим у них является то, что все они часть мононуклеарной иммунной системы (Davies et al., 2013).

В тканеспецифичных нишах находится целый коктейль цитокинов и ростовых факторов, поэтому мы понимаем, что парадигма M1/M2 часто не описывает всего многообразия макрофагальных фенотипов. Но наличие макрофагов с полярной активностью позволяет им не только запустить иммунную реакцию, но и завершить ее.

Как уже говорилось, различные фенотипы макрофагов соответствуют фазам раневого процесса. Поэтому, несмотря на несовершенство, парадигма имеет право на существование.

## АУТОФАГИЯ КАК СИСТЕМА ДЛЯ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МАКРОФАГОВ

Несколько лет назад было показано, что, модулируя макроаутофагию, можно менять поляризацию макрофагов (Guo et al., 2019). Макроаутофагия (в дальнейшем просто аутофагия) представляет собой внутриклеточный катаболический процесс, при помощи которого клетка избавляется от долгоживущих белков и поврежденных органелл. В начале этого процесса образуется аутофагосома, содержащая материал, предназначенный к деградации, а затем она сливается с лизосомой и содержимое аутофаголизосомы переваривается за счет лизосомных ферментов (Klionsky et al., 2021).

Было установлено, что применение хлорохина, блокирующего слияние аутофагосомы с лизосомой и ингибирующего аутофагию, переводит макрофаги, ассоциированные с опухолью, в фенотип M1 (Mauthe et al., 2018; Guo et al., 2019). Авторы показали, что хлорохин увеличивает чувствительность раковых клеток гортани к цисплатину и ингибирует их рост (Guo et al., 2019). По всей видимости, включение аутофагии, переводящей макрофаги в статус M2, меняет профиль секретруемых ими белков, заменяя старый белковый состав новым, то есть приводит к репрограммированию макрофагов (Zubova et al., 2022).

Стимуляция аутофагии может вызывать поляризацию макроглии в фенотип M2 и подавлять процесс воспаления. Фармакологические активаторы аутофагии рапамицин и ресвератрол стимулируют поляризацию макроглии к фенотипу M2, подавляя гены, ответственные за фенотип M1 (Jin et al., 2018).

Мы рассматриваем репрограммирование как смену профиля экспрессии генов и синтеза белков, а не только как переход от дифференцированных клеток к стволовым, как это было принято ранее. При репрограммировании меняется также паттерн секретруемых белков (Zubova et al., 2022).

Как заметил в своей работе Tin Su, “that which does not kill us, well, makes us different” (Su, 2018, p. 1). Существует какой-то не критический уровень аутофагии, который не убивает клетку, а меняет ее программу, убирая старый набор белков, включая новые профили экспрессии генов и иные транскрипционные факторы.

Известно, что аутофагия тесно связана с процессами регенерации, и, возможно, репрограммирование макрофагов играет в этом процессе не последнюю роль. Так, известно, что в макроглии,

стимулированной IFN $\gamma$  или LPS, играют роль такие транскрипционные факторы, такие как NF- $\kappa$ B и Stat1 (Orihuela et al., 2015).

При стимуляции макроглии IL-4 или IL-10, которые активируют аутофагию, включаются иные транскрипционные факторы, такие как Stat6 и Stat3 соответственно (Orihuela et al., 2015). Кроме того, смена функционального состояния макроглии сопровождается сменой метаболизма. Поляризация макроглии в M1 фенотип сопровождается сдвигом в энергетическом балансе от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу. Таким образом, классически активированная макроглия получает энергию за счет гликолиза, а альтернативно активированная использует оксидативный метаболизм (Orihuela et al., 2015).

По всей видимости, аутофагия может менять клеточный метаболизм в сторону, как гликолиза, так и окислительного фосфорилирования. Значит, изменение статуса дифференцировки макрофагов является частным случаем репрограммирования. Включение или подавление аутофагии служит переключателем функционального состояния макрофага, иными словами, его дифференцировки.

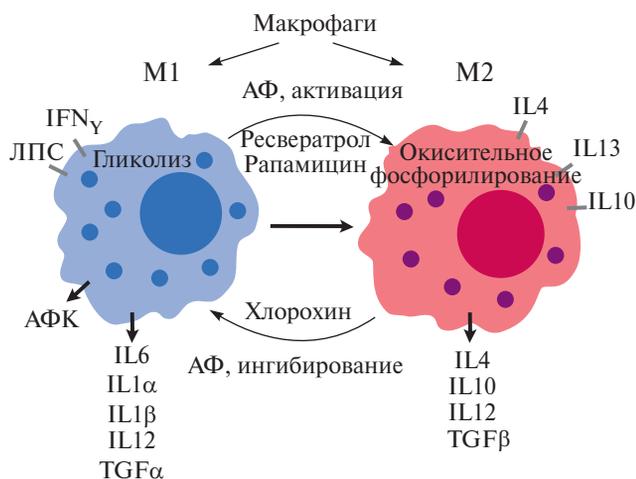
При переходе макрофагов в фенотип M2 старый белковый состав заменяется новым, меняется рецепторный аппарат клетки, включаются иные транскрипционные факторы, работают иные гены, что свидетельствует о полном репрограммировании клетки (Orihuela et al., 2015; Stone et al., 2019).

Как уже говорилось, в соответствии с фазами раневой реакции макрофаг переключается с поляризации M1 на M2 (рис.1). Мы считаем, что это и есть репрограммирование макрофага, в котором не последнюю роль может играть аутофагия.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ АУТОФАГИИ

В начале процесса аутофагии формируется двумембранная структура, окружающая предназначенный для деградации груз — поврежденные органеллы или долгоживущие белки (рис. 2).

Этому процессу предшествует целый ряд молекулярно-генетических событий. Гены, контролирующие аутофагию, изначально были описаны на модели дрожжей. Это семейство генов получило название “autophagy-related genes” (Atg) (Kametaka, 1998). Позже аналоги таких генов были описаны у млекопитающих (Kametaka, 1998). Эти гены осуществляют инициацию аутофагии, формирование и созревание аутофагосом. Киназный комплекс mTORC1 — главный регулятор аутофагии контро-



**Рис. 1.** Иллюстрация классической M1 (провоспалительной) и альтернативной M2 (антивоспалительной) активации макрофагов. Рапамицин – иммунодепрессант, полученный из *Streptomyces hygroscopicus*, активатор аутофагии (АФ), его мишенью является киназный белковый комплекс mTORC1; ресвератрол – природный фитоалексин, активатор аутофагии: хлорохин – препарат из группы 4-аминохинолина, ингибитор аутофагии, блокирует связывание аутофагосомы с лизосомой. Для провоспалительного фенотипа макрофагов характерен гликолиз, а для антивоспалительного фенотипа – окислительное фосфорилирование. Классически активированные макрофаги секретируют провоспалительные цитокины (IL6, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL12, TNF $\alpha$ ) при активации рецепторов, в частности к липополисахариду (ЛПС) и IFN $\gamma$ . Классически активированные макрофаги синтезируют активные формы кислорода (АФК). Альтернативно активированные макрофаги секретируют противовоспалительные цитокины (IL4, IL10, IL12, TGF $\beta$ ) при активации рецепторов, например, к IL4, IL13, IL10.

лирует серин-треониновую киназу ULK1. Процесс аутофагии состоит из нескольких стадий: инициации, нуклеации, элонгации, матурации, слияния и деградации (Kawamata, 2008).

Инициация начинается с образования фагофоры. Это двухмембранная структура, источником мембраны для которой может служить эндоплазматический ретикулум, наружная мембрана митохондрий, аппарат Гольджи и плазматическая мембрана. При достаточном количестве питательных веществ активный mTORC1 гиперфосфорилирует Atg13 и блокирует связывание Atg13, ULK1 и FIP200 (Green, Llambi, 2015).

mTORC1 фосфорилирует ULK1 по сайту Ser757, одновременно она фосфорилирует Atg13, что приводит к подавлению процесса аутофагии. Фосфорилирование ULK1 осуществляет также AMPK, но в данном случае оно играет активирующую аутофагию роль и осуществляется по сайту Ser555 (Lee, 2010).

При недостатке питательных веществ mTORC1 диссоциирует от комплекса ULK1, тот активируется и фосфорилирует FIP200, что служит причиной образования фагофоры. Иными словами, ингибирование ULK1 и Atg13 при помощи mTORC1 отменяется. Тогда образуется преинициаторный комплекс, состоящий из ULK1, FIP200 и Atg13. Сборка этого комплекса необходима для активации комплекса инициации (Beclin 1, VPS15 и VPS34, который генерирует PI3P и рекрутирует Atg7 на поверхность фагофоры). Так протекает стадия нуклеации.

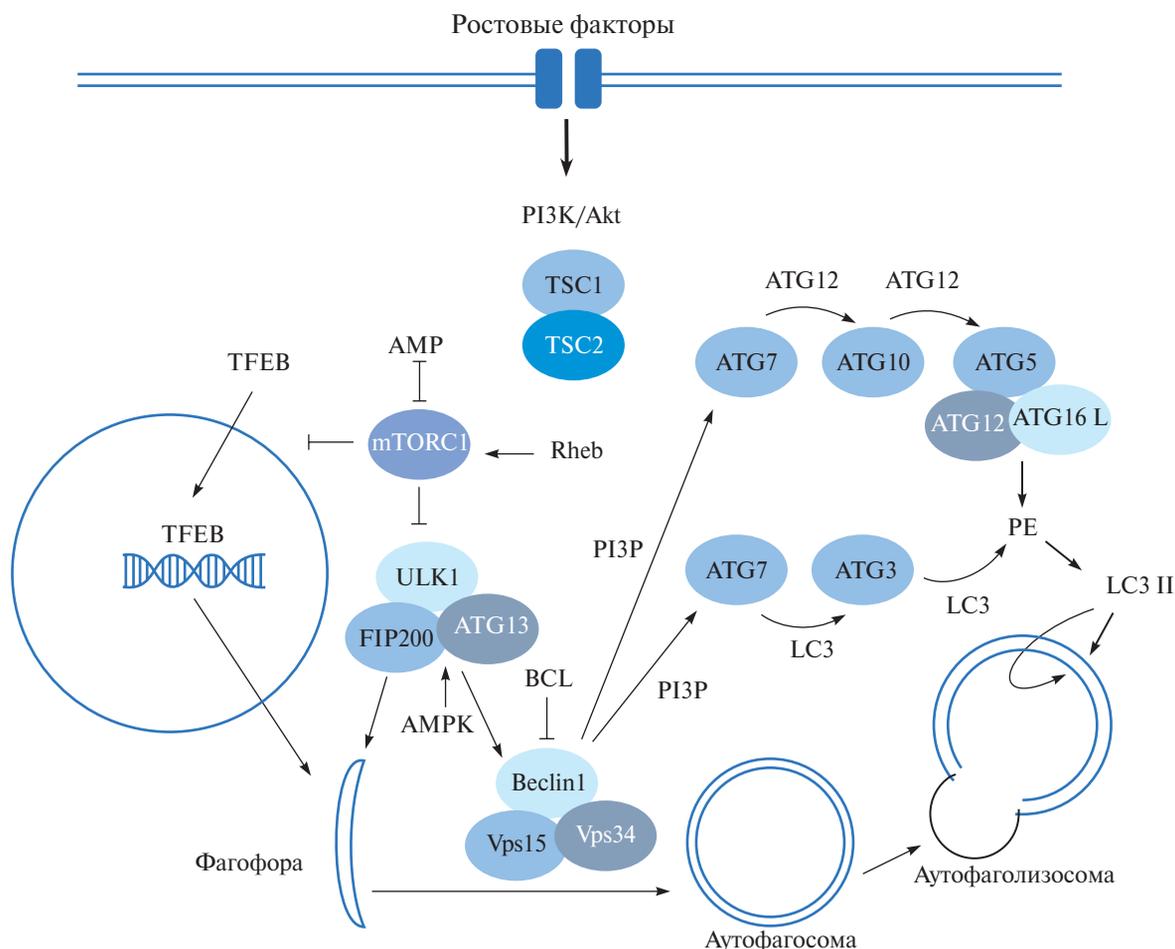
Активность Beclin1 в аутофагии ингибируется взаимодействием с Bcl-2, который нарушает связывание Beclin1 с VPS34. Далее следует стадия элонгации, на которой происходит удлинение мембраны фагофоры. Для этой стадии также важно образование комплекса из белков семейства Atg (autophagy-related genes). Atg7 активирует два пути конъюгации, которые необходимы для удлинения мембраны и закрытия аутофагосомы. На первом пути конъюгации Atg5 конъюгирует с Atg12, а Atg12 последовательно переносится на Atg7 и Atg10. Конъюгат Atg5-Atg12-Atg16L необходим для стабилизации фагофоры и связан с растущей мембраной фагофоры (Green, Llambi, 2015). Связь этих белков важна для образования комплекса LC3-I с фосфатидилэтаноламином и карбоксильной группой глицина, чтобы генерировать мембрано-ассоциированную процессированную форму LC3-II (Glick, 2010).

На втором пути конъюгации LC3 последовательно конъюгирует с Atg7 и Atg3. Образование LC3-II необходимо для созревания (матурации) и замыкания мембраны аутофагосомы (Kabeya, 2000; Suzuki, 2013). LC3-II обнаруживается как на внутренней, так и на внешней мембранах аутофагосомы, где он участвует в выборе груза для деградации.

Транспорт груза в аутофагосому – это селективный процесс, который, с одной стороны, регулируется специальными белками-адапторами, среди которых известен белок p62/SQSTM1; с другой стороны, протеин LC3-II может действовать как рецептор, взаимодействующий с белковыми агрегатами или органеллами.

Процесс аутофагии завершается слиянием аутофагосомы с лизосомой, в результате чего образуется аутофаголизосома, внутри которой содержимое деградирует. В том числе деградирует p62/SQSTM1 (Glick, 2010).

В регуляцию катаболических и анаболических процессов вовлечен транскрипционный фактор



**Рис. 2.** Регуляторные пути аутофагии. Аутофагия (АФ) активируется в отсутствие ростовых факторов, например в условиях голодания. АФ ингибируется усилением передачи сигналов фактора роста через группу PI3-киназ класса I и Akt, чтобы стимулировать активность mTORC1 посредством ингибирования комплекса TSC1/TSC2 и повышения активности ГТФазы Rheb. Процесс АФ начинается с образования фагофоры. Его негативно регулирует протеинкиназа mTORC1 серин-треониновой специфичности. При недостатке питательных веществ mTORC1 диссоциирует от комплекса ULK1, и ULK1 активируется и фосфорилирует FIP200, что служит причиной образования фагофоры; образуется преинициаторный комплекс, состоящий из ULK1, FIP200 и Atg13. Сборка этого комплекса необходима для активации комплекса инициации (Beclin 1, VPS15 и VPS34, который генерирует PI3P и рекрутирует Atg7 на поверхность фагофоры). В результате активируются две системы конъюгации с участием белков семейства Atg (Atg5, Atg7, Atg10, Atg12 и др.) Эти белковые взаимодействия необходимы для замыкания и созревания аутофagosомы. Затем белок LC3-I образует комплекс с фосфатидилэтаноламином (PE) и генерирует форму LC3-II, которая связана с внешней и внутренней мембраной аутофagosомы. Это необходимо для слияния с лизосомой образованной аутофagosомы. Затем содержание аутофаголизосома деградирует. В присутствии питательных веществ киназа mTORC1 может фосфорилировать транскрипционный фактор TFEB и ингибировать его активность, но TFEB становится гипофосфорилированным и локализуется в ядре, когда уровень питательных веществ и энергии низок. Будучи в ядре, TFEB активирует лизосомные и аутофагические гены.

TFEB. Этот фактор регулируется уровнем протеинов и энергетическим статусом клетки. В присутствии питательных веществ киназа mTORC1 может фосфорилировать TFEB и ингибировать его активность, но TFEB становится гипофосфорилированным и локализуется в ядре, когда уровень питательных веществ и энергии низок. Будучи в ядре, TFEB активирует лизосомные и аутофагические гены (Carroll, Dunlop, 2017).

Можно предположить, что при избыточной аутофагии TFEB особенно активен (рис. 2). При

избыточной аутофагии может быть активирована программируемая клеточная смерть II типа, когда деградации подвергаются необходимые клетке элементы.

Аутофагия ингибируется усилением передачи сигналов фактора роста через группу PI3-киназ класса I и Akt, чтобы стимулировать активность mTOR посредством ингибирования TSC1/TSC2 и повышения активности ГТФазы Rheb (Glick, 2010).

О молекулярных механизмах смены поляризации макрофагов под действием аутофагии из-

вестно относительно немного. Рецептор CD206 считается идеальным маркером поляризации макрофагов M2. Известно, что ингибиторы аутофагии подавляют фосфорилирование p38MAPK и экспрессию CD206 в клетках U937, обработанных докозагексаеновой кислотой (DHA).

Кроме того, в клетках U937, обработанных DHA, повышена экспрессия белка LC3II, который ассоциирован с микротрубочками и участвует в образовании аутофагосом. Эти результаты свидетельствуют о том, что DHA регулирует поляризацию макрофагов, сдвигает ее в сторону M2 через сигнальный путь p38MAPK и аутофагию (Kawano et al., 2019).

Известно, что цитокины, вызывающие M2-дифференцировку, а именно IL4 и IL13, вызывают активацию транскрипционного фактора STAT6 (Kawano et al., 2019).

Совсем недавно было показано, что аутофагия репрограммирует макрофаги костного мозга, переводя их в фенотип M2, через индукцию CD38, Atg16L1-1, Atg16L1-3 и аргиназы 1 (Mazher et al., 2023).

Известно, что мезенхимные стволовые клетки способствуют поляризации макрофагов M2 в мышечной модели, что связывают с активацией фактора транскрипции EB (TFEB) и последующим восстановлением лизосомной функции и активности аутофагии в макрофагах мышцы, в которых наблюдали дисбаланс поляризации в связи с нефропатией (Yuan et al., 2020).

Как уже говорилось, в регуляции поляризации макрофагов под действием аутофагии принимает участие транскрипционный фактор NF-κB. Он состоит из гомо- или гетеродимеров белков семейства Rel (p65, p50, p52, c-Rel и RelB). Активированный гетеродимер p50/p65 отвечает за активацию провоспалительных генов, но с ним конкурирует гомодимер p50/p50 за сайт связывания промоторов провоспалительных генов. Если этот гомодимер все же связывается с такими промоторами, это приводит к блокаде транскрипции провоспалительных генов.

Включение аутофагии подавляет NF-κB через субъединицу p65 и, таким образом, генерирует M2-поляризацию макрофагов. NF-κB деградирует путем селективной аутофагии после убиквитинирования (Kuo et al., 2022). По всей видимости, регуляторный путь поляризации макрофагов при помощи аутофагии состоит из различных структурных модулей, которые могут взаимодействовать друг с другом и менять поляризацию макрофагов.

## ДИНАМИЧЕСКИЙ ХАРАКТЕР МАКРОФАГАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

И.И. Мечников не только открыл макрофагальную систему, он установил, что эти клетки фагоцитируют не только патогены, но и мертвые клетки организма, которому они принадлежат (Metchnikoff, 1892). Этим исследованием было положено начало работ, описывающих роль макрофагов в поддержании гомеостаза организма, а также участие макрофагов в процессах ранозаживления и регенерации.

Удаление апоптотических клеток необходимо в эмбриогенезе, поэтому макрофаги играют незаметную роль, фагоцитируя апоптотические клетки, поскольку при формировании органов одни клетки возникают, другие отмирают, а мертвые клетки необходимо удалять, чтобы они не вызвали воспаления.

Помимо фагоцитоза макрофаги выполняют множество других функций, например: метаболизм железа, аминокислот, липидов и билирубина; ответственность за чувствительность организма к инсулину, резорбцию кости и регенерацию различных тканей. Кроме того, макрофаги регулируют накопление и реорганизацию межклеточного матрикса (Davies et al., 2013).

Ткани в организме находятся в состоянии динамического равновесия. Примером является процесс поддержания костной массы. В костной ткани поддерживается баланс между образованием и резорбцией кости. За формирование кости отвечают остеобласты, а за резорбцию — остеокласты. Функции этих клеток поддерживают гомеостаз кальция в кости. Неограниченная резорбция кости приводит к остеопорозу, а недостаточная функция этих клеток служит причиной остеопетроза. При этом заболевании образуется более плотная, но хрупкая кость. Поэтому в норме работа остеокластов должна поддерживать равновесие (Schlundt 2021).

Еще одним примером динамического баланса является модель атеросклероза. При нем в стенке артерии накапливаются макрофаги, насыщенные холестерином и вызывающие хроническое воспаление. Это происходит в результате дисбаланса липидного обмена и неадекватного иммунного ответа (Peled, Fisher, 2014; Rojas et al., 2015).

На судьбу холестериновой бляшки влияют воспалительный фенотип макрофагов и их количество. Макрофаги бляшки одновременно получают про- и противовоспалительные сигналы, поэтому образование бляшки — процесс динамический. Однако в модели *in vitro* было показано, что макрофаги M1 стимулируют воспалительный

процесс в бляшке, а макрофаги M2 его подавляют (Peled, Fisher, 2014; Rojas et al., 2015).

Новейшие исследования показывают, что головной мозг также является динамическим органом (Jha et al., 2016). Прогрессирование нейродегенеративных заболеваний и процесс репарации черепно-мозговой травмы зависят от баланса между классически и альтернативно активированной микроглией.

Классически активированная микроглия вызывает нейровоспалительную реакцию и может приводить к гибели нейронов, а состояние M2 микроглии оказывает благоприятное воздействие на нейроны (Jha et al., 2016). По этой причине макрофагально/микроглиальная система очень пластична и определяет динамический баланс различных тканей. Поэтому в конкретный момент в тканях могут присутствовать одновременно макрофаги с дифференцировкой M1 и M2.

Именно баланс макрофагальной системы может определять динамический характер разнообразных тканей и проходящих в них процессов. Тканевые макрофаги очень гетерогенны, их фенотип часто определяет та ниша, в которой они находятся в организме.

Макрофаги в ткане-специфических нишах способны к самоподдержанию. Локальные факторы определяют размер популяции макрофагов и продолжительность ее жизни. Плотность популяции макрофагов контролируется трофическими и ростовыми факторами, доступными в нише (Davies et al., 2013).

Аутофагия в норме поддерживает гомеостаз, но может быть и причиной патологии. При избытке аутофагии может тормозиться рост клеток, а также иметь место клеточная гибель, недаром аутофагия считается клеточной смертью II типа.

Усиленная аутофагия отрицательно влияет на процесс заживления кожи и связана с хроническими ранами. Об этом свидетельствует повышенный уровень LC3 в коже мышей с диабетом или в хронических ранах пациентов. Считается, что за этот процесс отвечают макрофаги, и при избыточной аутофагии поляризация макрофагов сдвигается к M1, что сопровождается экспрессией генов провоспалительных цитокинов (Guo et al., 2016).

### РОЛЬ АУТОФАГИИ И ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Жировая ткань является во многом эндокринным органом, определяющим устойчивость к инсулину, кроме того, жировая ткань участвует

в терморегуляции и функционирует как энергосберегающая структура. Она регулирует системный метаболизм, выделяя гормоны адипокины.

Жировая ткань состоит из преадипоцитов, эндотелиальных клеток, адипоцитов, а также из макрофагов. В жировой ткани макрофаги очень чувствительны к нарушениям гомеостаза и могут приводить к воспалению в отсутствии инфекции (Fujisaka et al., 2016).

Резистентность к инсулину и ожирение сопровождаются хроническим воспалением в жировой ткани. При диабете I типа имеет место недостаток выработки инсулина в результате дисфункции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, а при диабете II типа развивается инсулинорезистентность вследствие нарушения клеточного инсулинового сигналинга.

Макрофаги с фенотипом M1 способствуют возникновению резистентности к инсулину, в то время как макрофаги M2 поддерживают тканевой гомеостаз, участвуя в удалении умирающих адипоцитов и накоплении предшественников адипоцитов (Chylikova et al., 2018; Nawaz, Tobe, 2019). Даже слабо выраженное воспаление нарушает сигнальные пути инсулина и способствует развитию системной дисрегуляции.

Инсулин должен связаться с рецептором на поверхности клетки, чтобы позволить глюкозе попасть внутрь клетки. Если этого не происходит и возникает резистентность к инсулину, глюкоза не проникает в цитоплазму клетки, и ее уровень в крови повышается, что имеет место при диабете 2 типа (Ahmed et al., 2021).

В этом случае нарушается энергетический баланс внутри клетки, процессы синтеза жирных кислот и протеинов. В поджелудочной железе  $\beta$ -клетки начинают вырабатывать избыток инсулина, чтобы компенсировать перегрузку глюкозой. Это картина характерна для диабета 1 типа, она приводит к изнашиванию  $\beta$ -клеток в результате интенсивной работы. Такой системный дисбаланс является следствием хронического воспаления и часто сопровождается ожирением (Ahmed et al., 2021). Таким образом, второй тип диабета может переходить в первый.

При оценке популяций макрофагов при ожирении было показано, что макрофаги жировой ткани меняют свою поляризацию, переключаясь с M2 фенотипа на M1. В жировой ткани содержится примерно 10% макрофагов, при ожирении их количество увеличивается до 40% (Eijk et al., 2021). Эти макрофаги имеют пенистый фенотип. Эти клетки могут поглощать липидный груз, с ко-

торым не справляются адипоциты, они содержат лизосомы для деградации, а также липидные капли для хранения липидов и демонстрируют воспалительный фенотип (Eijk et al., 2021).

При прогрессировании ожирения адипоциты увеличиваются в размере из-за избыточных энергетических условий, а классически активированные макрофаги M1 накапливаются и вызывают воспаление, негативно влияя на резистентность к инсулину. В то же время альтернативно активированные макрофаги поддерживают функции жировой ткани при недостатке энергетических ресурсов; играют роль в адаптации к условиям избыточной энергии.

Недавно были получены данные о том, что чрезмерное количество липидов может снижать клеточные уровни аутофагии и именно она регулирует иммунный ответ. Это позволяет предположить, что нарушения аутофагии в макрофагах могут способствовать усилению активации иммунного ответа, лежащего в основе ожирения (Liu et al., 2015). Первичные макрофаги костного мозга и перитонеальные макрофаги мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, имеют сниженную активность аутофагии, что говорит о нарушении аутофагического потока в макрофагах у мышей с ожирением.

С возрастом ткани и органы хуже выполняют свои функции, кроме того, падает активность аутофагии, а количество макрофагов в жировой ткани увеличивается, что сопровождается увеличением воспалительных процессов и старением иммунной системы.

Когда практически все макрофаги жировой ткани трансформируются из M2 в M1, они окружают умирающие адипоциты и формируют коронообразную структуру, которая служит маркером резистентности к инсулину и свидетельствует о воспалении (Lu et al., 2021).

В юном возрасте в жировой ткани преобладают макрофаги с фенотипом M2. Они выполняют трофические функции, но с годами их популяция истощается. Начинают преобладать провоспалительные цитокины, такие как TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  (Lu et al., 2021). В макрофагах M1 происходит сдвиг метаболизма от окислительного фосфорилирования к гликолизу и снижается уровень аутофагии (Ghosh et al., 2016). Это способствует увеличению воспаления.

Делеция гена *Atg7*, ответственного за релизацию аутофагии, сдвигает фенотип макрофагов в сторону M1 (Kang et al., 2016). Мыши

с таким нокаутом имеют более высокую степень инфильтрации макрофагами M1 белой жировой ткани по сравнению с мышами дикого типа. Такие мыши имеют сниженную чувствительность к инсулину (Kang et al., 2016).

Оценивая картину, которая наблюдается при развитии хронического воспаления в жировой ткани, можно вспомнить тезис о том, что старение — это хроническое воспаление, которое развивается практически во всех тканях организма, и в жировой в частности.

## РЕГЕНЕРАЦИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И ПАРАДИГМА M1/M2

Определенный баланс между фенотипами макрофагов M1 и M2 необходим при регенерации скелетных мышц. При хроническом воспалении регенерация нарушается. В процессах регенерации мышц макрофаги играют основную роль, поскольку они связаны с функционированием стволовых клеток скелетных мышц, так называемых сателлитных клеток, а также важны для выживания фибро-адипогенных клеток-предшественников.

Дисбаланс может приводить к накоплению клеток-предшественников с аномально выраженными профиброзными факторами и увеличивать количество компонентов внеклеточного матрикса. Увеличение количества макрофагов M1 снижает или отменяет пролиферацию миобластов, а также нарушает пролиферацию и активацию клеток-сателлитов (Perandini et al., 2018). Повышение уровня макрофагов с фенотипом M2 приводит к накоплению внеклеточного матрикса и фиброзу в скелетных мышцах, что также нарушает регенеративные процессы.

Хроническое воспаление, в том числе старение и ожирение, а также миопатия вызывают одновременное увеличение числа как про-, так и противовоспалительных макрофагов. Это нарушает активацию сателлитных клеток и вызывает накопление фиброзо-жировых отложений с последующим снижением способности ткани к регенерации (Perandini et al., 2018).

Что касается аутофагии, то известно, что она регулирует иммунное окружение клеток-сателлитов, влияя на поляризацию и рекрутирование макрофагов (Chen et al., 2022). Старение мышечных стволовых клеток связывают с подавлением аутофагии во время ключевых фаз регенеративного процесса (Lee et al., 2019). Было показано, что фармакологическая активация аутофагии восстанавливает мышечную

функцию при миопатиях и способствует регенерации мышц (Chen et al., 2022).

### АУТОФАГИЯ И ГОМЕОСТАЗ КОСТНОЙ ТКАНИ

Макрофаги осуществляют взаимосвязь между различными системами организма, например между жировой тканью и иммунной системой, а также между скелетной и иммунной системами (Yang et al., 2021). Такая взаимосвязь жизненно необходима для регенерации и гомеостаза.

В кости содержится множество субпопуляций макрофагов, некоторые из них, а именно остеокласты, осуществляют резорбцию кости. Эти клетки участвуют в каскаде заживления кости. Фенотипы макрофагов при этом могут быть гораздо сложнее, чем их описывает парадигма M1/M2.

Чтобы не образовывался рубец, фенотип M1 макрофагов должен вовремя смениться на M2. Известно, что ингибирование аутофагии приводит к воспалению в костном мозге. Нокаут по гену *Atg5* в клетках костного мозга приводит к поляризации макрофагов в M1. Эти результаты демонстрируют, что аутофагия подавляет воспаление и выполняет регулируемую функцию. При формировании кости *in vivo* осуществляется переход от фенотипа M1 к M2 (Yang et al., 2021). И тот, и другой фенотип активно участвуют в остеогенезе.

Активация аутофагии в стромальных клетках костного мозга, частью которых являются макрофаги, улучшает остеогенез. Нарушение аутофагии прерывает остеогенную дифференцировку и миграцию стромальных клеток костного мозга (Yang et al., 2021).

Снижение способности к аутофагии и хроническое воспаление снижают способность клеток кости противостоять окислительному стрессу, что сопровождается нарушением гомеостаза костномозговой ткани; такая картина наблюдается при старении. Этот дисбаланс приводит к потере костной массы и остеопорозу. Это происходит, поскольку угнетение аутофагии влечет за собой ингибирование образования кости остеобластами и апоптоз остеоцитов.

Увеличение оксидативного стресса активирует резорбцию кости, апоптоз остеоцитов и снижение активности остеобластов. Аутофагия повышается во время дифференцировки и минерализации остеобластов. А ингибирование аутофагии угнетает минерализацию костей и снижает костную массу в моделях *in vivo* (Montaseri et al., 2020). Нарушение

гомеостаза костной ткани за счет гиперактивации остеокластов вызывает деструктивные заболевания, в частности остеопороз, часто встречающиеся у пожилых людей (Florencio-Silva et al., 2017).

Как это ни странно, имеются сведения о том, что аутофагия усиливается и во время созревания и дифференцировки остеокластов (Aoki et al., 2020). Аутофагия поддерживает митохондриальную функцию остеокластов и положительно коррелирует с их активностью и выживаемостью (Aokis et al., 2020).

Таким образом, аутофагия играет важную роль в резорбции кости и ее формировании. При этом само заболевание остеопороз напоминает хроническое воспаление, при котором резорбтивные функции остеокластов не ограничены.

Модулятор аутофагии рапамицин уменьшает остеопороз у старых крыс, активируя аутофагию в остеоцитах. А фармакологическое ингибирование аутофагии хлорохином или делеция гена *Atg7* снижает остеокластогенез и потерю костной массы (Florencio-Silva et al., 2017). Несмотря на некоторое противоречие экспериментальных данных, можно заключить, что для здорового метаболизма кости важен баланс резорбции и образования кости, и за этот баланс во многом отвечает аутофагия.

### ЗНАЧЕНИЕ АУТОФАГИИ И АКТИВНОСТИ МИКРОГЛИИ ДЛЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Микроглия, в отличие от костномозговых макрофагов, имеет эмбриональное происхождение из желточного мешка и образуется у мыши на седьмые сутки эмбриогенеза. Благодаря своим функциям микроглия имеет транскриптомы и эпигеномы, которые отличаются от других тканевых макрофагов.

Микроглия образуется примерно в то же время, что и нейроны, и отвечает за архитектуру нейрональной ткани мозга. Она играет роль в созревании синапсов мозга, удаляет излишки медиаторов, незрелые или дефектные нейрональные синапсы и проводит так называемую обрезку синапсов; микроглия определяет судьбу и число нейронов (Noyak et al., 2014). Кроме нейронов, микроглия поддерживает олигодендроциты и необходима для нормального миелиногенеза, она также контролирует подрастание сосудов.

Микроглия головного мозга запускает воспалительные процессы, которые возможны в отсутствие патогенов. Хроническое воспаление сопровождается старением не только в жировой и костной

ткани, нейровоспаление может стать причиной старения непосредственно в головном мозге.

Снижение уровня аутофагии наблюдается в стареющем мозге человека. В процессе старения падает активность генов аутофагии *Atg5*, *Atg7* и *Beclin1* (Azam et al., 2021). Одновременно усиливается активность комплекса mTORC1, который ингибирует аутофагию. Такая активность охватывает анаболические процессы, стимулирует метаболические нарушения и агрегацию протеинов (Blagosklonny, 2011).

Можно предположить, что в головном мозге с возрастом увеличивается доля микроглии с поляризацией M1, как это происходит в других органах. Увеличенный уровень воспаления нарушает синаптическую передачу, баланс свободных радикалов и вообще может приводить к гибели нейронов.

Действительно, многие исследования подтверждают, что с возрастом микроглия становится более провоспалительной и отвечает на иммунные вызовы, несмотря на гематоэнцефалический барьер. Показано, что IL-4 *ex vivo* индуцирует профиль M2 в активированной микроглии взрослых мышей, при этом активированная микроглия старых мышей сохраняет заметный профиль M1. Эти данные показывают, что активированная микроглия старых мышей менее чувствительна к противовоспалительному, M2-стимулирующему, действию IL-4 (Fenn et al., 2012).

У пожилых грызунов после стимуляции периферического или центрального иммунитета наблюдается длительное аномальное поведение, когнитивные нарушения и депрессивные расстройства (Fenn et al., 2012). Эти нарушения связывают с провоспалительной активацией микроглии в головном мозге.

Показано нарушение экспрессии рецептора к IL-4 на мембране микроглии старых мышей. Нарушения регуляции микроглии приводит к усиленной и продолжительной активации микроглии.

При старении снижается уровень самого IL-4 в головном мозге старых крыс, что соответствует усилению нейровоспаления. Пониженная чувствительность к IL-4 может быть вовлечена не только в процесс старения, но и в нейрологические заболевания. Например, продукция IL-4 в мозге при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите и множественном склерозе позитивно коррелирует с ремиссией заболевания (Fenn et al., 2012).

Таким образом, активация перехода от фенотипа макрофагов и микроглии M1 к фенотипу M2 является принципиальной терапевтической стра-

тегией. Это актуально не только для широкого спектра нейродегенеративных заболеваний, но и для замедления старения и предотвращения связанных с ним патологий.

Одно из часто встречающихся нейродегенеративных заболеваний – болезнь Альцгеймера. Она характеризуется аномальным процессингом двух белков –  $\beta$ -амилоида и Тау. Накопление в тканях этих белков приводит к патологическому образованию экстраклеточных сенильных бляшек и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков.  $\beta$ -амилоид является фрагментом более крупного белка – предшественника APP.

Этот трансмембранный белок играет важную роль в росте нейрона, его выживании и восстановлении после повреждений. Протеин APP в норме должен расщепляться  $\alpha$ -секретазой, но если такое расщепление отсутствует, этот протеин расщепляется  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретазами. В этом случае как раз и образуется  $\beta$ -амилоид, из которого состоят сенильные бляшки (Sery et al., 2013).

При болезни Альцгеймера  $\beta$ -амилоид является активатором микроглии, что имитирует ситуацию хронического воспаления. Дисфункция M2 при этом заболевании и чрезмерная активность микроглии M1 способствуют патологическому повреждению нейронов при воспалении. Изменяя поляризацию на M2, можно добиться восстановления тканей и активации фагоцитоза для снижения уровня  $\beta$ -амилоида и облегчить последствия заболевания (Хуе et al., 2021).

При болезни Альцгеймера также нарушается функционирование аутофагии, а именно митофагии. От правильного функционирования митохондрий зависит своевременное удаление  $\beta$ -амилоида. Было установлено, что эффективность микроглии по удалению бляшек  $\beta$ -амилоида уменьшает хроническое воспаление и митохондриальную дисфункцию.

Восстановление нормального функционирования митохондрий и митофагии в микроглии уменьшает нейровоспаление и оказывает нейропротекторное действие (Agrawal, Jha, 2020). Было показано, что аутофагия в микроглии нарушается при долгом контакте с  $\beta$ -амилоидом, что имеет место при прогрессировании болезни Альцгеймера.

На мышинной модели показано накопление субстрата аутофагии p62 и агрегатов убиквитина в клетках микроглии рядом с отложением  $\beta$ -амилоида в гиппокампе (Pomilio et al., 2020). Это значит, что аутофагический поток не реализуется и  $\beta$ -амилоид не удаляется.

Разработка подходов к репрограммированию макрофагов очень важна для терапии болезни Альцгеймера. Поэтому модуляция аутофагии представляется перспективным инструментом для направленной поляризации микроглии, что может иметь важное клиническое значение в будущем.

Направленная регуляция поляризации макрофагов необходима и при опухолегенезе. Но в этом случае необходимо индуцировать поляризацию макрофагов M1 для успешной терапии. Это актуально практически для всех солидных опухолей человека, в частности для опухолей головного мозга.

Глиобластома является наиболее опасной первичной опухолью головного мозга человека. В трехмерной модели было показано, что опухоли, подобные глиобластоме, как и многие другие опухоли человека, направляют поляризацию макрофагов в сторону фенотипа M2 для построения иммуносупрессивной и проангиогенной ниши.

Было показано, что противовоспалительные макрофаги M2 способствуют ангиогенезу, в то время как M1-подобные провоспалительные макрофаги подавляют ангиогенез, который авторы (Cui et al., 2018) назвали ангиогенезом, обусловленным воспалением: растворимые иммуносупрессивные цитокины, продуцируемые M2-подобными макрофагами, например TGF- $\beta$  и интегрин  $\alpha\beta 3$  на их поверхности, взаимодействующие с эндотелием, необходимы для ангиогенеза, обусловленного воспалением. В этом случае возможно, что подавление аутофагии в опухоли-ассоциированных макрофагах было бы актуально для успешной терапии заболевания.

Для лечения нейродегенеративных заболеваний, напротив, перспективной представляется активация аутофагии в микроглиальных клетках. Накапливается все больше данных о том, что с возрастом микроглия претерпевает морфологические и физиологические изменения, которые могут привести к хроническому воспалению. Микроглия с такой активностью приводит к нейродегенеративным расстройствам или усугубляет текущую патологию центральной нервной системы.

Действительно, время является стрессовым фактором и фактором риска для нейродегенеративных заболеваний (Nikodemova et al., 2016). Необходимо понимать роль микроглии обоих фенотипов в регенеративном процессе ремиелинизации, который может следовать за демиелинизацией в головном мозге.

Было показано, что происходит переключение фенотипа микроглии с M1 на M2, когда начинается ремиелинизация. Дифференцировка

олигодендроцитов усиливается *in vitro* в среде, кондиционированной микроглиальными клетками с фенотипом M2, и нарушается *in vivo* после истощения клеток M2 внутри очага поражения. Блокирование активина A, характерного для клеток M2, ингибирует дифференцировку олигодендроцитов во время ремиелинизации в культурах клеток мозжечка. Таким образом, эти результаты показывают, что поляризация клеток микроглии M2 необходима для эффективной ремиелинизации (Miron et al., 2013).

Особенно механизмы демиелинизации актуальны для рассеянного склероза – хронического аутоиммунного воспалительного заболевания, характеризующегося не только демиелинизацией, но и повреждением аксонов, деструкцией гематоэнцефалического барьера.

Многие нейротоксические молекулы присутствуют в очагах рассеянного склероза. Это радикалы NO, активные формы кислорода, глутамат, активированные компоненты комплемента и провоспалительные цитокины, характерные для микроглии с поляризацией M1. M1-микроглия, активированная LPS или IFN $\gamma$ , токсична для зрелых олигодендроцитов. Обработка микроглии IL-4, который является индуктором дифференцировки микроглии в M2, стимулирует олигоденрогенез, повышая продукцию IGF-1. Такая обработка снижает продукцию токсичных факторов M1 микроглии и увеличивает выживаемость и дифференцировку предшественников олигодендроцитов (Cao, He, 2013).

Еще одним заболеванием, характеризующимся хроническим воспалением и нейродегенерацией, является болезнь Паркинсона. Она характеризуется потерей дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции и отложением  $\alpha$ -синуклеина в тельцах Леви, нейритах Леви и некоторых нейронах. Маркеры воспаления отмечаются вокруг и внутри черной субстанции при болезни Паркинсона.

При этом заболевании наблюдается повышенная активация микроглии, инфильтрация T- и B-клетками, отложения иммуноглобулинов в черной субстанции и других областях мозга, связанных с агрегацией  $\alpha$ -синуклеина (Moehle, West, 2015). На течение болезни может оказывать влияние баланс между поляризацией микроглии M1/M2.

Как уже говорилось, процесс аутофагии может во многом определять этот баланс. Недавно было показано, что удаление микроглиального *Atg5* вызывало симптомы, подобные болезни Паркинсона, у мышей, характеризующиеся нарушением

координации движений, когнитивного обучения, усилением нейровоспаления и снижением уровня дофамина в полосатом теле (Cheng et al., 2020).

Активация аутофагии увеличивает M2-маркеры микроглии, но снижает маркеры M1. В то же время ингибирование аутофагии увеличивает M1, но редуцирует M2-маркеры микроглии. Нокдаун *Atg5* достаточен, чтобы перевести микроглию в статус M1. TNF- $\alpha$  нарушает аутофагический поток.

Полиморфизм гена человека, кодирующего TNF- $\alpha$ , увеличивает риск развития болезни Паркинсона. В дофаминергических клетках, обработанных TNF- $\alpha$ , выявляется дефицит аутофагии. Ученые пришли к заключению, что хроническое воспаление, опосредованное микроглией, служит патогенным фактором болезни Паркинсона.

Нарушение аутофагического потока может приводить к накоплению  $\alpha$ -синуклеина в нейронах головного мозга. TNF- $\alpha$  ингибирует аутофагический поток, активируя сигнальный путь Akt/mTOR (Jin et al., 2018). IL-10, вызывающий M2-дифференцировку в микроглии, усиливает аутофагию в макрофагах (Agrawal, Jha, 2020).

Кроме того, на мышинной модели было показано, что с возрастом активируется поляризация микроглии M1 и подавляется M2, что оказывается критично для такого нейродегенеративного заболевания, как болезнь Паркинсона. Старение значительно усугубляет двигательную дисфункцию и утрату дофаминергических нейронов в нервной системе. Кроме того, увеличивается экспрессия белков воспаления TLR2 и pNF- $\kappa$ B в группе пожилых мышей. Таким образом, при старении усугубляется воспалительная реакция за счет перехода фенотипа микроглии из M2 в M1 и падения активности аутофагии (Yao, Zhao, 2018).

Известно, что рапамицин замедляет старение и способствует долголетию (Blagosklonny, 2018). Возможно, геропротекторные эффекты рапамицина связаны со способностью активировать аутофагию в микроглии и переводить ее в фенотип M2. В результате этого сохраняется жизнеспособность нейронов и нивелируется воспаление.

Митохондриальные компоненты при высвобождении в цитоплазму распознаются как молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (damage-associated molecular patterns) с помощью NOD-подобных рецепторов и инфламماسомы NLRP3. Эта инфламмазома превращает неактивную прокаспазу 1 в активную форму, которая расщепляет провоспалительный IL1 $\beta$  до зрелого IL1 $\beta$ , вызывая воспаление и преждевре-

менную гибель клеток, например клеток сетчатки. Чтобы противостоять повреждающему действию DAMPS, необходимо удаление поврежденных митохондрий при помощи аутофагии, а именно митофагии (Singh et al., 2018). Накопление DAMPS с возрастом считается “тикающей бомбой старения” (Kerpetanovic et al., 2015).

DAMPS накапливаются также при хроническом воспалении, и несвоевременное удаление митохондрий и инфламмасом при помощи аутофагии может способствовать не только хроническому воспалению, но даже развитию лейкозов (Urwansch et al., 2021). Было показано, что низкомолекулярный флавоноид кемпферол (разновидность флавоноидов) защищает мышей от нейродегенерации, вызванной ЛПС. Кемпферол способствует макроаутофагии и дезактивирует инфламмасому NLRP3 (Han et al., 2019).

Избыточная аутофагия все же может способствовать клеточной гибели, и эта роль порой дуалистична. Рецептор конечных продуктов усиленного гликозилирования (RAGE), известный как индуктор воспаления через NF- $\kappa$ B, также промотирует аутофагию (Yamate et al., 2023)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Парадигма макрофагов M1/M2 остается предметом исследований, поскольку направленная дифференцировка фенотипа макрофагов в M1 или M2 может служить перспективным подходом к терапии многих заболеваний – от опухолей до нейродегенеративных процессов.

Относительно недавно была описана роль аутофагии в направленной дифференцировке макрофагов. Мы утверждаем, что дифференцировка макрофагов в M2 под действием аутофагии является частным случаем репрограммирования клетки, поскольку сопровождается сменой белкового контента и паттерна экспрессии генов. Кроме того, репрограммирование макрофагов в сторону M2 сопровождается метаболическим сдвигом в сторону окислительного фосфорилирования.

Свежие данные говорят о том, что в смене поляризации макрофага играют роль также рецепторы, запускающие аутофагию. Таким образом, можно говорить о том, что аутофагия способна менять весь принцип поддержания гомеостаза клетки, затрагивая экспрессию генов, синтез белка и тип метаболизма. Аутофагия активирует транскрипционные факторы, регулирует численность митохондрий и изменяет количество рецепторов.

В связи с широким спектром эффектов аутофагии следует считать ее одним из важных ключей, регулирующих биологические функции клетки. Вследствие этого аутофагия может стать предпочтительной целью при разработке терапевтических подходов.

На основании новейших литературных данных можно заключить, что подавление аутофагии активизирует провоспалительные функции макрофагов и может стать перспективной основой подхода к терапии онкозаболеваний. Напротив, активация аутофагии, переводящая микроглию в фенотип M2, может применяться для терапии нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера, Паркинсона и рассеянного склероза.

Основное ограничение парадигмы M1/M2 заключается в том, что процесс образования подтипов M1 и M2 более вероятен для моноцитарных макрофагов, чем для макрофагов резидентных, которые могут не иметь выраженной склонности к поляризации M1/M2. Несмотря на это, исследование парадигмы, актуальной для макрофагов и микроглии, открывает широкие горизонты для дальнейшего изучения фагоцитирующих клеток, появившихся на ранних этапах эволюции жизненных форм и выполняющих фундаментальные биологические функции у млекопитающих.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-20229, <https://rscf.ru/project/22-25-20229/>) и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 13 апреля 2022 г. № 05/2022.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Agrawal I., Jha S.* 2020. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of microglia. *Front. Aging Neurosci.* V. 12. P. 252.
- Ahmed B., Sultana R., Greene M.W.* 2021. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed. Pharmacother.* V. 137. P. 111315. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315>
- Aoki S., Shimizu K., Ito K.* 2020. Autophagy-dependent mitochondrial function regulates osteoclast differentiation and maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 527. P. 874.
- Azam S., Haque M.E., Kim I.S., Choi D.K.* 2021. Microglial turnover in ageing-related neurodegeneration: therapeutic avenue to intervene in disease progression. *Cells.* V. 10. P. 150.
- Blagosklonny M.V.* 2011. Progeria, rapamycin and normal aging: recent breakthrough. *Aging.* V. 3. P. 685.
- Blagosklonny M.V.* 2018. Does rapamycin slow down time? *Oncotarget.* V. 9. P. 30210. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25788>
- Cao L., He C.* 2013. Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination. *Neurosci. Bull.* V. 29. P. 189.
- Carroll B., Dunlop E.A.* 2017. The lysosome: a crucial hub for AMPK and mTORC1 signalling. *Biochem. J.* V. 474. P. 1453.
- Chen W., Chen Y., Liu Y., Wang X.J.* 2022. Autophagy in muscle regeneration: potential therapies for myopathies. *Cachexia Sarcopenia Muscle.* V. 13. P. 1673.
- Cheng J., Liao Y., Dong Y., Hu H., Yang N., Kong X., Li S., Li X., Guo J., Qin L., Yu J., Ma C., Li J., Li M., Tang B., Yuan Z.* 2020. Microglial autophagy defect causes parkinson disease-like symptoms by accelerating inflammasome activation in mice. *Autophagy.* V. 16. P. 2193–2205. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1719723>
- Chylikova J., Dvorackova J., Tauber Z., Kamarad V.* 2018. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* V. 162. P. 79.
- Cui X., Morales R.T., Qian W., Wang H., Gagner J.P., Dolgalev I., Placantonakis D., Zagzag D., Cimmino L., Snuderl M., Lam R.H.W., Chen W.* 2018. Hacking macrophage-associated immunosuppression for regulating glioblastoma angiogenesis. *Biomaterials.* V. 161. P. 164.
- Davies L.C., Jenkins S.J., Allen J.E., Taylor P.R.* 2013. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* V. 14. P. 986.
- Fenn A.M., Henry C.J., Huang Y., Dugan A., Godbout J.P.* 2012. Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor- $\alpha$  expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. *Brain Behav. Immunol.* V. 26. P. 7667.
- Florencio-Silva R., Sasso G.R., Simões M.J., Simões R.S., Baracat M.C., Sasso-Cerri E., Cerri P.S.* 2017. Osteoporosis and autophagy: what is the relationship? *Rev. Assoc. Med. Bras.* V. 63. P. 173.
- Fujisaka S., Usui I., Nawaz A., Takikawa A., Kado T., Igarashi Y., Tobe K.* 2016. M2 macrophages in metabolism. *Diabetol. Int.* V. 7. P. 342.
- Ghosh A.K., Mau T., O'Brien M., Garg S., Yung R.* 2016. Impaired autophagy activity is linked to elevated ER-stress and inflammation in aging adipose tissue. *Aging (Albany NY).* V. 8. P. 2525.
- Glick D., Barth S., Macleod K.* 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* V. 221. P. 3.
- Green D.R., Llambi F.* 2015. Cell death signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 7. P. a006080. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Guo Y., Lin C., Xu P., Wu S., Fu X., Xia W., Yao M.* 2016. AGEs induced autophagy impairs cutaneous wound healing via stimulating macrophage polarization to M1 in diabetes. *Sci. Rep.* V. 6. P. 36416. <https://doi.org/10.1038/srep36416>
- Guo Y., Feng Y., Cui X., Wang Q., Pan X.* 2019. Autophagy inhibition induces the repolarisation of tumour-associated macrophages and enhances chemosensitivity of laryngeal cancer cells to cisplatin in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* V. 68. P. 1909.
- Han X., Sun S., Sun Y., Song Q., Zhu J., Song N., Chen M., Sun T., Xia M., Ding J., Lu M., Yao H., Hu G.* 2019. Small molecule-driven NLRP3 inflammation inhibition

- via interplay between ubiquitination and autophagy: implications for Parkinson disease. *Autophagy*. V. 15. P. 1860.
- Hesketh M., Sahin K.B., West Z.E., Murray R.Z. 2017. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int. J. Mol. Sci.* V. 18. P. 1545. <https://doi.org/10.3390/ijms18071545>
- Jha M.K., Lee W.H. 2016. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Suk. K. Biochem. Pharmacol.* V. 103. P. 1.
- Jin M.M., Wang F., Qi D., Liu W.W., Gu C., Mao C.J., Yang Y.P., Zhao Z., Hu L.F., Liu C.F. 2018. A critical role of autophagy in regulating microglia polarization in neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* V. 10. P. 378.
- Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* V. 19. P. 5720.
- Kametaka S., Okano T., Ohsumi M., Ohsumi Y. 1998. Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* V. 273. P. 22284.
- Kang Y.H., Cho M.H., Kim J.Y., Kwon M.S., Peak J.J., Kang S.W., Yoon S.Y., Song Y. 2016. Impaired macrophage autophagy induces systemic insulin resistance in obesity. *Oncotarget*. V. 7. P. 35577.
- Kapetanovic R., Bokil N.J., Sweet M.J. 2015. Innate immune perturbations, accumulating DAMPs and inflammasome dysregulation: A ticking time bomb in ageing. *Ageing Res. Rev.* V. 24. Pt A. P. 40.
- Kapoor N., Niu J., Saad Y., Kumar S., Sirakova T., Becerra E., Li X., Kolattukudy P.E. 2015. Transcription factors STAT6 and KLF4 implement macrophage polarization via the dual catalytic powers of MCPIP. *J. Immunol.* V. 194. P. 6011.
- Kawamata T., Kamada Y., Kabeya Y., Sekito T., Ohsumi Y. 2008. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell.* V. 19. P. 2039.
- Kawano A., Ariyoshi W., Yoshioka Y., Hikiji H., Nishihara T., Okinaga T. 2019. Docosahexaenoic acid enhances M2 macrophage polarization via the p38 signaling pathway and autophagy. *J. Cell Biochem.* V. 120. P. 12604–12617.
- Klionsky D.J., Abdel-Aziz A.K., Abdelfatah S., Abdellatif M., Abdoli A., Abel S., Abeliovich H., Abildgaard M.H., Abudu Y.P., Acevedo-Arozena A., Adamopoulos I.E., Adeli K., Adolph T.E., Adornetto A., Aflaki E., et al. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*. V. 17. P. 1.
- Kuo W.T., Chang J.M., Chen C.C., Tsao N., Chang C.P. 2022. Autophagy drives plasticity and functional polarization of tumor-associated macrophages. *IUBMB Life.* V. 74. P. 157.
- Lee D.E., Bareja A., Bartlett D.B., White J.P. 2019. Autophagy as a therapeutic target to enhance aged muscle regeneration. *Cells*. V. 8. P. 183.
- Lee J.W., Park S., Takahashi Y., Wang H.G. 2010. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS. One.* V. 5. P. e15394.
- Liu K., Zhao E., Ilyas G., Lalazar G., Lin Y., Haseeb M., Tanaka K.E., Czaja M.J. 2015. Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization. *Autophagy*. V. 11. P. 271.
- Liu R., Cui J., Sun Y., Xu W., Wang Z., Wu M., Dong H., Yang C., Hong S., Yin S., Wang H. 2021. Autophagy deficiency promotes M1 macrophage polarization to exacerbate acute liver injury via Atg5 repression during aging. *Cell Death Discov.* V. 7. P. 397.
- Lu B., Huang L., Cao J., Li L., Wu W., Chen X., Ding C. 2021. Adipose tissue macrophages in aging-associated adipose tissue function. *J. Physiol. Sci.* V. 71. P. 38.
- Mauthe M., Orhon I., Rocchi C., Zhou X., Luhr M., Hijlkema K.J., Coppes R.P., Engedal N., Mari M., Reggiori F. 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. V. 14. P. 1435.
- Mazher M., Moqidem Y.A., Zidan M., Sayed A.A., Abdellatif A. 2023. Autophagic reprogramming of bone marrow-derived macrophages. *Immunol. Res.* V. 71. P. 229.
- Metchnikoff E. 1892. *Lecons sur la pathologie comparee de L'inflammation*. Masson: Paris.
- Miron V.E., Boyd A., Zhao J.W., Yuen T.J., Ruckh J.M., Shadrach J.L., van Wijngaarden P., Wagers A.J., Williams A., Franklin R.J.M., Ffrench-Constant C. 2013. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat. Neurosci.* V. 16. P. 1211.
- Moehle M.S., West A.B. 2015. M1 and M2 immune activation in Parkinson's disease: foe and ally? *Neurosci.* V. 302. P. 59.
- Montaseri A., Giampietri C., Rossi M., Riccioli A., Del Fatore A., Filippini A. 2020. The role of autophagy in osteoclast differentiation and bone resorption function. *Biomolecules*. V. 10. P. 1398.
- Nawaz A., Tobe K. 2019. M2-like macrophages serve as a niche for adipocyte progenitors in adipose tissue. *J. Diabetes Investig.* V. 10. P. 1394.
- Nikodemova M., Small A.L., Kimyon R.S., Watters J.J. 2016. Age-dependent differences in microglial responses to systemic inflammation are evident as early as middle age. *Physiol. Genomics*. V. 48. P. 336.
- Nayak D., Roth T.L., McGavern D.B. 2014. Microglia development and function. *Annu. Rev. Immunol.* V. 32. P. 367.
- Orihuela R., McPherson C.A., Harry G.J. 2016. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* V. 73. P. 649.
- Peled M., Fisher E.A. 2014. Dynamic aspects of macrophage polarization during atherosclerosis progression and regression. *Front. Immunol.* V. 5. P. 579.
- Perandini L.A., Chimin P., Lutkemeyer D.D.S., Câmara N.O.S. 2018. Chronic inflammation in skeletal muscle impairs satellite cells function during regeneration: can physical exercise restore the satellite cell niche? *FEBS J.* V. 285. P. 1973.
- Pomilio C., Gorjod R.M., Riudavets M., Vinuesa A., Presa J., Gregosa A., Bentivegna M., Alaimo A., Alcon S.P.,

- Sevlever G., Kotler M.L., Beauquis J., Saravia F. 2020. Microglial autophagy is impaired by prolonged exposure to  $\beta$ -amyloid peptides: evidence from experimental models and Alzheimer's disease patients. *Geroscience*. V. 42. P. 613.
- Rojas J., Salazar J., Martínez M.S., Palmar J., Bautista J., Chávez-Castillo M., Gómez A., Bermúdez V. 2015. Macrophage heterogeneity and plasticity: impact of macrophage biomarkers on atherosclerosis. *Hindawi Publ. Corporation Scientifica*. P. 851252. <https://doi.org/10.1155/2015/851252>
- Schlundt C., Fischer H., Bucher C.H., Rendenbach C., Duda G.N., Schmidt-Bleek K. 2021. The multifaceted roles of macrophages in bone regeneration: A story of polarization, activation and time. *Acta Biomater.* V. 133. P. 46.
- Serý O., Povářová J., Míšek I., Pešák L., Janout V. 2013. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol.* V. 51. P. 1.
- Singh L.P., Yumnamcha T., Swornalata Devi T. 2018. Mitophagic flux deregulation, lysosomal destabilization and NLRP3 inflammasome activation in diabetic retinopathy: potentials of gene therapy targeting TXNIP and the redox system. *Ophthalmol. Res. Rep.* V. 3. P. ORRT-126.
- Stone A.E.L., Green R., Wilkins C., Hemann E.A., Gale M. 2019. RIG-I-like receptors direct inflammatory macrophage polarization against West Nile virus infection. *Jr. Nat. Commun.* V. 10. P. 3649.
- Su T.T. 2018. Cellular plasticity, caspases and autophagy; that which does not kill us, well, makes us different. *Open Biol.* 2018. V. 8. P. 180157. <https://doi.org/10.1098/rsob.180157>
- Suzuki K., Akioka M., Kondo-Kakuta C., Yamamoto H., Ohsu-mi Y. 2013. Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* V. 126. P. 2534.
- Urwanisch L., Luciano M., Horejs-Hoeck J. 2021. The NLRP3 inflammasome and its role in the pathogenicity of leukemia. *Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 1271.* <https://doi.org/10.3390/ijms22031271>
- Van Eijk M., Aerts J.M.F.G. 2021. The unique phenotype of lipid-laden macrophages. *Int. J. Mol. Sci. V. 22: P. 4039.* <https://doi.org/10.3390/ijms22084039>
- Xue Y., Nie D., Wang L.J., Qiu H.C., Ma L., Dong M.X., Tu W.J., Zhao J. 2021. Microglial polarization: novel therapeutic strategy against ischemic stroke. *Aging Dis.* V. 12. P. 466.
- Yamate J, Izawa T, Kuwamura M. J 2023. Macrophage pathology in hepatotoxicity. *Toxicol. Pathol.* V. 36. P. 51. <https://doi.org/10.1293/tox.2022-0112>
- Yang L., Xiao L., Gao W., Huang X., Wei F., Zhang Q., Xiao Y. 2021. Macrophages at low-inflammatory status improved osteogenesis via autophagy regulation. *Tiss. Eng. Part. A.* P. 021.
- Yao K., Zhao Y.F. 2018. Aging modulates microglia phenotypes in neuroinflammation of MPTP-PD mice. *Exp. Gerontol.* V. 111. P. 86.
- Yuan Y., Li L., Zhu L., Liu F., Tang X., Liao G., Liu J., Cheng J., Chen Y., Lu Y. 2020. Mesenchymal stem cells elicit macrophages into M2 phenotype via improving transcription factor EB-mediated autophagy to alleviate diabetic nephropathy. *Stem Cells.* V. 38. P. 639.
- Zhang Q., Sioud M. 2023. Tumor-associated macrophage subsets: shaping polarization and targeting. *Int. J. Mol. Sci. V. 24: 7493.* doi: 10.3390/ijms24087493
- Zubova S.G., Suvorova I.I., Karpenko M.N. 2022. Macrophage and microglia polarization: focus on autophagy-dependent reprogramming. *Front Biosci. (Schol Ed).* V. 14: 3. doi: 10.31083/j.fbs1401003

## THE ROLE OF AUTOPHAGY AND MACROPHAGE POLARIZATION IN THE PROCESSES OF CHRONIC INFLAMMATION AND REGENERATION

S. G. Zubova<sup>a, \*</sup>, A. V. Morshneva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

\* E-mail: [egretta\\_julia@mail.ru](mailto:egretta_julia@mail.ru)

The cause of many serious illnesses, including diabetes, obesity, osteoporosis and neurodegenerative diseases is chronic inflammation that develops in adipose tissue, bones or the brain. This inflammation occurs due to a shift in the polarization of macrophages/microglia towards the pro-inflammatory phenotype M1. It has now been proven that the polarization of macrophages is determined by the intracellular level of autophagy in the macrophage. By modulating autophagy, it is possible to cause switching of macrophage activities towards M1 or M2. Summarizing the material accumulated in the literature, we believe that the activation of autophagy reprograms the macrophage towards M2, replacing its protein content, receptor apparatus and including a different type of metabolism. The term reprogramming is most suitable for this process, since it is followed by a change in the functional activity of the macrophage, namely, switching from cytotoxic pro-inflammatory activity to anti-inflammatory (regenerative). Modulation of autophagy can be an approach to the treatment of oncological diseases, neurodegenerative disorders, osteoporosis, diabetes and other serious diseases.

**Keywords:** macrophage, microglia, M1/M2 phenotype, autophagy, reprogramming

УДК 576.385

## ЗАВИСИМАЯ ОТ альфа-АКТИНИНА-4 РЕГУЛЯЦИЯ РЕПАРАЦИИ РАЗРЫВОВ ДНК НЕ ЗАВИСИТ ОТ АКТИВНОСТИ NF-κB

© 2024 г. Д. В. Кригер<sup>1, \*</sup>, Г. В. Васильева<sup>1</sup>, Е. В. Ломерт<sup>1</sup>, Д. Г. Тентлер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

\*E-mail: daryamalikova@gmail.com

Поступила в редакцию 25.07.2023 г.

После доработки 24.08.2023 г.

Принята к публикации 25.08.2023 г.

α-Актинин-4 — это актин-связывающий белок, который вовлечен в широкий спектр клеточных процессов. Наряду с актином и другими белками актинового цитоскелета, α-актинин-4 обнаружен не только в цитоплазме, но и в ядре клеток различных типов. В качестве ядерного белка он принимает участие в регуляции активности некоторых транскрипционных факторов. В частности, он может регулировать активность фактора NF-κB, который во многом определяет устойчивость раковых клеток к апоптозу и противораковой терапии. В ходе наших предыдущих исследований было обнаружено, что α-актинин-4 может влиять на устойчивость раковых клеток к ингибиторам топоизомеразы II и определять эффективность репарации двухцепочечных разрывов ДНК, регулируя сборку комплексов белков HRR и NHEJ. В настоящей работе мы попытались ответить на вопрос, каким образом α-актинин-4 участвует в регуляции репарации двухцепочечных разрывов ДНК при генотоксическом стрессе. Наши результаты указывают на то, что влияние α-актинина-4 на прохождение репарации в клетках немелкоклеточного рака легкого линии H1299 не зависит от активности транскрипционного фактора NF-κB. Мы обнаружили, что в ядре клеток H1299 α-актинин-4 не только локализуется в нуклеоплазме, но и обнаруживает тесную связь с хроматином.

**Ключевые слова:** α-актинин-4, NF-κB, репарация ДНК, немелкоклеточный рак легкого

**Принятые сокращения:** НМКРЛ — немелкоклеточный рак легкого; ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ); ACTN4 — α-актинин-4; HRR — репарация ДНК путем гомологичной рекомбинации (homologous recombination repair); NHEJ — репарация ДНК в результате негомологичного воссоединения концов (non-homologous end joining); ТОРОII — топоизомераза II.

**DOI:** 10.31857/S0041377124010033, **EDN:** IESWHN

Актин-связывающий белок α-актинин-4 (ACTN4) принадлежит к спектриновому суперсемейству, которое включает в себя разнообразную группу белков цитоскелета, среди которых альфа/бета-спектрины и дистрофины (Baron et al., 1987). ACTN4 обнаружен практически в клетках всех типов организма человека и участвует в организации актинового цитоскелета. При этом ACTN4 не входит в состав сократительных элементов клеток мышечной ткани (Dixon et al., 2003).

ACTN4 первоначально был описан как белок, ассоциированный с подвижностью раковых клеток (Honda et al., 1998). С тех пор ему был присвоен целый ряд различных функций, начиная от цитоплазматической структурной организации цитоскелета (Honda et al., 1998; Agarwal et al., 2013) и заканчивая регуляцией активности транскрипционных факторов (Aksenova et al., 2013; Zhao et al., 2015, 2017).

Изменения уровня экспрессии гена *ACTN4* ассоциируются с определенными типами рака и могут определять скорость пролиферации и миграции клеток (Gao et al., 2015; Honda, 2015; Tentler et al., 2019; Huang et al., 2020). Обнаружена взаимосвязь между уровнем экспрессии *ACTN4* как на уровне мРНК, так и на уровне белка в опухолях и эффективностью применяемой адьювантной химиотерапии у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМКРЛ).

Повышенный уровень экспрессии *ACTN4* в опухолях ассоциирован с лучшим прогнозом выживаемости пациентов в случае применения у них адьювантной химиотерапии препаратами цисплатин и 5-фторурацил (Noro et al., 2013, 2022; Miura et al., 2016; Shiraishi et al., 2017).

В ходе наших предыдущих исследований мы продемонстрировали, что подавление экспрессии *ACTN4* при помощи метода геномного

редактирования CRISPR/Cas9 на модельных линиях клеток рака легкого приводило к изменению активации апоптоза и увеличению их устойчивости к действию ингибиторов топоизомеразы II (ТОРОII). Мы показали, что ACTN4 вовлечен в регуляцию репарации двухцепочечных разрывов ДНК в клетках НМКРЛ. Подавление экспрессии ACTN4 приводило к нарушению соотношения частоты восстановления двухцепочечных разрывов ДНК при помощи основных путей репарации — негомологичного воссоединения концов (non-homology end joining — NHEJ) и репарации с помощью гомологичной рекомбинации (homology recombination repair — HRR) (Kriger et al., 2022).

Исходя из наших результатов, мы полагаем, что ACTN4 может быть вовлечен в регуляцию сборки комплексов белков 53BP1 и BRCA1 — ключевых факторов, отвечающих за инициацию репарации двухцепочечных разрывов (Short, 2011; Moureau et al., 2016; Mirman, de Lange, 2020). Однако остается непонятным механизм, посредством которого ACTN4 может оказывать влияние на регуляцию сборки этих комплексов.

ACTN4 взаимодействует с десятками белков, среди которых транскрипционный фактор NF-κB (Aksenova et al., 2013; Lomert et al., 2018). ACTN4 солокализует с транскрипционным фактором NF-κB и, взаимодействуя с субъединицей RelA, может способствовать активации транскрипции зависимых от NF-κB генов (Бабаков и др., 2004; Aksenova et al., 2013).

В основной массе опухолей, в которых NF-κB конститутивно активен, раковые клетки характеризуются более высокой выживаемостью за счет активации анти-апоптотических генов (Staudt, 2010; DiDonato et al., 2012; Xia et al., 2018). Активация NF-κB проходит в ходе применения химио- и радиотерапевтических стратегий терапии раковых опухолей, которые предназначены для уничтожения раковых клеток посредством индукции апоптоза (Magné et al., 2006).

Ингибирование активации NF-κB приводит к улучшению эффективности противоопухолевой терапии (Nakanishi, Toi, 2005). С одной стороны, индукция NF-κB может приводить к задержке клеточной гибели и, тем самым, предоставлять время системам репарации на восстановление повреждений (W. Wang et al., 2017). С другой стороны, активация NF-κB может вызывать замедление пролиферации клеток (Ricca et al., 2001; Lomert et al., 2018).

В ходе нашей работы мы попытались приблизиться к пониманию вероятного механизма участия ACTN4 в репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Задачи работы: 1) проверить, зависит ли уровень экспрессии NF-κB-зависимых генов, в том числе и тех, продукты которых вовлечены в ответ клетки на повреждение ДНК, от уровня экспрессии ACTN4 в клеточной линии H1299; 2) оценить, приводит ли конститутивная активация NF-κB к изменению устойчивости клеток к действию генотоксических препаратов и изменению эффективности репарации ДНК; 3) провести анализ ядерных белковых экстрактов, содержащих белки фракции гистонов.

Наши результаты указывают на то, что влияние ACTN4 на процесс репарации в клетках НМКРЛ линии H1299 не зависит от активации транскрипционного фактора NF-κB. Мы обнаружили, что в ядре клеток H1299 ACTN4 может тесно связываться с хроматином, что, возможно, лежит в основе его влияния на репарацию разрывов ДНК.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клеточные линии и воздействия.** В работе использовали клеточные линии НМКРЛ (H1299; ATCC, American Type Culture Collection) с разным уровнем экспрессии генов ACTN4 и RELA. Методика получения клеточных линий с полным нокаутом ACTN4 (линия ACTN4KO) и оверэкспрессией ACTN4 (линия ACTN4OE) подробно описана ранее (Kriger et al., 2022). Использовали линии ACTN4KO, полученные от разных клонов и обозначенные ACTN4KO\_c11 и ACTN4KO\_c12.

В качестве контрольной линии использовали линию H1299 ACTN4WT, которая несла генно-инженерную конструкцию без gRNA. Методика получения линии с гиперэкспрессией RelA, субъединицы NF-κB, (H1299 RelAOE) описана ранее (Lomert et al., 2018).

Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco, США). В среды добавляли 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (“Биолот”, Россия) и 2 мМ L-глутамин (“Биолот”, Россия). Клетки культивировали при постоянных условиях в инкубаторе при 37 °C в увлажненной атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Для индукции ответа на повреждение ДНК клетки обрабатывали генотоксическими препаратами с разным механизмом действия: эпопози-

**Таблица 1.** Праймеры, использованные для ОТ-ПЦР в реальном времени

| Ген                            | Последовательность праймера (5'-3')              | Температура отжига, (Тан ) | Размер продукта, нуклеотиды |
|--------------------------------|--|----------------------------|-----------------------------|
| <i>IKBA</i>                    | GAGGAGTACGAGCAGATGGT<br>ССААГТГСАГГААСАГАТС      | 63                         | 123                         |
| <i>ICAM1</i>                   | CACAGTCACCTATGGCAACG<br>СТГАГАССТСТГГСТТСТГТС    | 64                         | 187                         |
| <i>CCL2</i><br>( <i>MCP1</i> ) | CATAGCAGCCACCTTCATTC<br>ТСТГСАСТГАГАТСТТСТТАТТ   | 56                         | 104                         |
| <i>BCL2</i>                    | AAGCGGTCCCCTGGATAGA<br>ТССГГАТТТСТСАГААГТСС      | 60                         | 104                         |
| <i>BRCA2</i>                   | TGCCTGAAAACCAGATGACTATC<br>АГГССАГАСААСТТССГТТТА | 60                         | 154                         |
| <i>DKN1A (P21)</i>             | СТТГТСТТТТСССТТСАГАТСС<br>ТТСТТСТТГТГТСТТСТТСС   | 60                         | 109                         |
| <i>BBC3 (PUMA)</i>             | GACSTCAACGCACAGTACGA<br>САСТТААТТГГГСТСАТСТ      | 60                         | 147                         |
| <i>GAPDH</i>                   | CACCATCTTCCAGGAGCGAG<br>АААТГАГССССАГСТТСТС      | 60                         | 114                         |
| <i>ACTB</i>                    | АССГАГСГСГГСТАСАГ<br>СТТААТГТСАГСАСГАТТТСС       | 60                         | 59                          |

дом, доксорубицином или цисплатином в разных концентрациях.

**Анализ экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени.** Для анализа экспрессии генов мишеней транскрипционного фактора NF-κB проводили выделение тотальной РНК из клеток при помощи фенол-хлороформной экстракции реагентом Trizol (Invitrogen, США) в соответствии с процедурой, описанной производителем.

Для последующего синтеза кДНК использовали 2 мкг тотальной РНК, гексамерные праймеры и обратную транскриптазу MMLV (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию ПЦР в реальном времени проводили с использованием реакционной смеси 5X qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) на термоциклере СХ96 (Bio-Rad Laboratories Inc., США). Для нормализации уровня экспрессии генов использовали значения экспрессии генов *GAPDH* и *ACTB*. Эксперимент повторяли не менее трех раз для подтверждения результата. Информация о последовательности праймеров, температуре отжига и размере продукта указана в табл. 1.

**Анализ выживаемости клеток.** Выживаемость клеток оценивали при помощи метода МТТ. За 1 сутки до добавления генотоксических препаратов клетки рассаживали в 96-луночную плату в плотности  $3 \cdot 10^3$  клеток на 1 лунку. На следующие сутки к клеткам добавляли среду, содержащую этопозид, доксорубицин или цисплатин в различных концентрациях и далее культивировали в течение трех суток.

По истечении этого времени для оценки относительного количества жизнеспособных клеток раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) добавляли в каждую лунку в конечной концентрации 0.5 мг/мл и культивировали еще в течение 4 ч в темноте при температуре 37 °С. Далее среду удаляли и кристаллы формазана растворяли раствором ДМСО (99%).

Оптическую плотность измеряли с помощью планшетного ридера iMark (BioRad, США) при длине волны 570 нм. В качестве референса использовали излучение на длине волны 630 нм. Построение кривых выживаемости осуществляли, используя онлайн-ресурс Quest Graph™ IC50 Calculator (AAT Bioquest, <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

**Оценка эффективности репарации разрывов ДНК при помощи метода ДНК-комет в щелочных условиях.** Чтобы индуцировать повреждения в молекуле ДНК, клетки ( $15 \cdot 10^4$  на чашку Петри 35 мм) обрабатывали этопозидом в концентрации 50 мкМ в течение 40 мин. Затем среду меняли на свежую и клетки культивировали еще в течение 8 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе для репарации образовавшихся разрывов. Через 8 ч клетки снимали раствором Трипсин/Версена (3:7), промывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) объемом приблизительно 100–200 мкл для достижения концентрации  $1.5 \cdot 10^6$  клеток/мл.

Из получившейся суспензии клеток отбирали 4 мкл и добавляли к 40 мкл 0.5%-ному раствору

легкоплавкой агарозы (R&D systems, США) в соотношении 1:10, нагретой до 37 °С, и тщательно перемешивали (носик дозатора должен быть срезан, для облегчения ресуспендирования). За сутки до эксперимента предметные стекла (Menzel-Gläser, GmbH, Германия) покрывали горячим 1%-ным раствором агарозы (TopVision Agarose, Fermentas, Литва) и высушивали в течение ночи при комнатной температуре.

Образцы клеток, ресуспендированные в легкоплавкой агарозе, наносили на подготовленные накануне предметные стекла (слайды) и накрывали покровным стеклом. Слайды высушивали в течение 10 мин при 4 °С и затем покровные стекла снимали. Далее все манипуляции со слайдами проводили через погружение их в раствор (лить на них жидкость строго запрещается).

Слайды помещали в лизирующий буфер (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 10.0, 1% Triton X-100) на 1 ч при 4 °С, а затем — в щелочной буфер (0.2 M NaOH, 1 mM EDTA pH 10.0) на 20 мин в темноту при комнатной температуре. Слайды ополаскивали в холодной воде и подвергали электрофорезу при 23 В в течение 30 мин в горизонтальной камере, заполненной охлажденным буфером (0.2 M NaOH, 1 mM EDTA).

Перед окрашиванием слайды 2 раза промывали холодной водой в течение 5 мин. Затем их погружали в 70%-ный раствор этилового спирта и высушивали при 37 °С. Окрашивали водным раствором SYBR Green II (Sigma-Aldrich), разведенным в 10000 раз.

Съемку слайдов делали при помощи системы высокопроизводительного скрининга CellVoyager CQ1 (Yokogawa, Япония). Для этого использовали объектив с увеличением 10×. Полученные изображения анализировали, используя плагин OpenComet. В каждом эксперименте оценивали более 200 клеток. Эксперимент повторяли не менее 3 раз для подтверждения результата.

**Иммуноокрашивание клеток.** Для иммуноокрашивания белков в 96-луночную плату со стеклянным дном 0.17 мкм (Eppendorf, GmbH, Германия) пассировали клетки,  $4 \cdot 10^3$  на 1 лунку. На следующие сутки клетки обрабатывали этопозидом в концентрации 50 мкМ в течение 40 мин, после чего среду меняли на свежую и клетки культивировали еще 4 ч. Далее их промывали холодным раствором PBS и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 30 мин. После этого их еще раз промывали PBS и пермебилизировали 0.5%-ным раствором Triton X-100, разведенным в PBS, в течение 15 мин.

Чтобы избежать неспецифического связывания антител с белками, клетки инкубировали в блокирующем буфере (0.5% Triton X-100 и 2% бычьего сывороточного альбумина в PBS) в течение 30 мин. Инкубацию клеток с первичными антителами (гамма-H2AX, no. 97184; Cell Signaling, США) проводили в течение 1.5 ч, после чего их промывали 1 раз блокирующим буфером и далее инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa 488 (no. a-11008; Invitrogen, США) в течение 40 мин.

Далее клетки отмывали еще 3 раза. Окрашивание ядер осуществляли красителем Hoechst 33342 в конечной концентрации 4 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Съемку и последующий анализ изображений осуществляли при помощи системы высокопроизводительного скрининга CellVoyager CQ1 (Yokogawa, Япония).

**Внутриклеточное фракционирование и иммуногибридизация.** Пробы, содержащие фракцию ядерных белков, получали при помощи метода субклеточного фракционирования. Для выделения и очистки ядер из клеток использовали метод, описанный ранее (Бабаков et al., 2004) с некоторыми модификациями.

Клетки с чашек (150 мм) снимали при помощи резинового скребка, собирали и отмывали в PBS. Клетки осаждали при 1.5 тыс. g в течение 5 мин и ресуспендировали в 2 мл гипотонического буфера (10 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, ингибиторы протеаз (Roche, Швейцария)) и инкубировали в течение 1 ч (до момента лизиса) во льду.

В течение этого времени суспензию клеток интенсивно перемешивали на вортеке и 20 раз пропускали через иглу диаметром 22.5G. Контроль вскрытия (разрушения клеточной мембраны и высвобождения ядер) клеток осуществляли при помощи светового микроскопа. Для осаждения фракции ядер суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 2.5 тыс. g и 4 °С. Супернатант отбирали в отдельную пробирку и использовали для анализа цитоплазматических белков.

Осажденные ядра очищали от остатков цитоскелетных структур в растворе 0.5 M сахарозы. Для этого осадок ядер ресуспендировали в 250 мкл гипотонического буфера и аккуратно наносили поверх 750 мкл сахарозы. Пробы центрифугировали в течение 5 мин при 3.5 тыс. g и 4 °С.

Выделение ядерной белковой фракции, содержащей транскрипционные факторы, проводили в течение 30 мин на льду в буфере, содержащем

400 мМ NaCl, 20 мМ HEPES pH 7.9, 25% глицерина, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.4 мМ EDTA, 0.4 мМ PMSF, 1 мМ DTT и ингибиторы протеаз (Roche, Швейцария).

Чтобы получить ядерные белки, связанные с хроматином, ядра предварительно обрабатывали бензоназой (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин в буфере, содержащем 20 мМ NaCl, 20 мМ HEPES pH 7.9, 25% глицерина, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.4 мМ EDTA, 0.4 мМ PMSF, 1 мМ DTT и ингибиторы протеаз (Roche, Швейцария).

Затем к суспензии добавляли по каплям равный объем буфера, содержащего 840 мМ NaCl, 20 мМ HEPES pH 7.9, 25% глицерина, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.4 мМ EDTA, 0.4 мМ PMSF, 1 мМ DTT и ингибиторы протеаз (Roche, Швейцария) и инкубировали в течение 30 мин. на льду. Остатки ядер осаждали центрифугированием (14 тыс. g, 10 мин), супернатант использовали для анализа ядерных белков.

К полученным пробам добавляли буфер Laemmli (60 мМ Tris-HCl pH 6.8, 10% глицерина, 2% SDS, 0.2% бромфенолового синего, 5% DTT) и прогревали при 96 °C в течение 10 мин.

Каждый образец разделяли при помощи электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле, содержащем SDS, и белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0.22 мкм (Millipore, Ирландия) в трис-глицериновом буфере, содержащем 20% этанола (v/v) при 100 В в течение 2 ч.

После переноса мембрану инкубировали в растворе 5%-ного обезжиренного молока. Для визуализации белков мембрану инкубировали со специфичными первичными антителами к АСТН4 или гистону H1 в течение ночи, а затем — со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1 ч.

Хемилюминесценцию регистрировали с помощью системы гель-документации ChemiDoc (Bio-Rad, США). В работе были использованы первичные антитела к АСТН4 (no. 0042-05, 1:250; ImmunoGlobe GmbH, Германия) и к Гистону H1 (no. sc-8030, 1:500; Santa-Cruze, США) и соответствующие к ним вторичные антитела: no. A0545 и no. A9044 (Sigma-Aldrich, США).

Для визуализации белков в геле применяли метод окрашивания по Кумасси с использованием PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя.

**Статистическая обработка результатов.** При анализе относительной выживаемости клеток мето-

дом МТТ каждую точку воспроизводили 4 раза, а каждый эксперимент повторяли 3 раза. Данные ОТ-ПЦР в реальном времени представлены средним значением и его ошибкой из не менее трех повторов из одного эксперимента. Статистическую значимость рассматривали при  $p < 0.05$  с использованием U-критерия Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

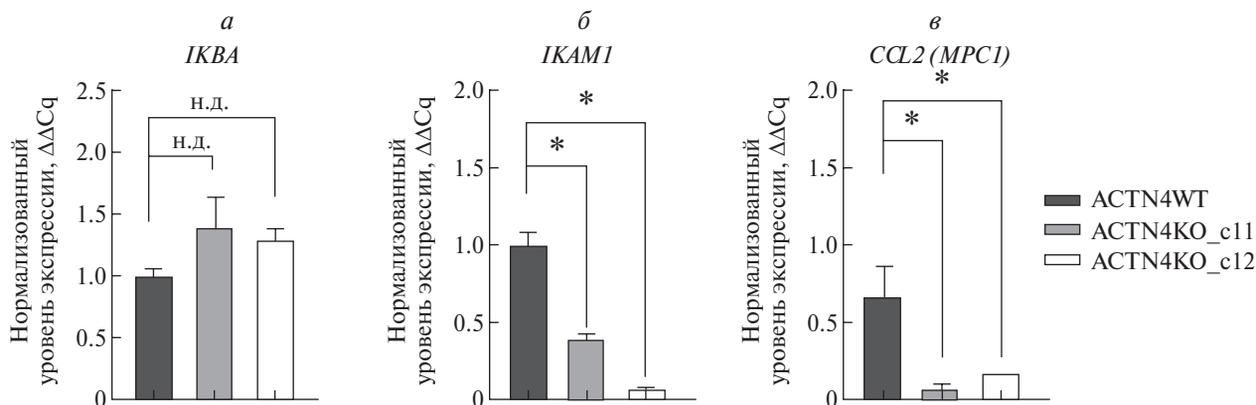
В ходе нашего предыдущего исследования мы обнаружили, что полный нокаут *ACTN4* в клетках линии H1299 приводит к повышению устойчивости клеток к ДНК-повреждающим препаратам, усилению репарации по пути NHEJ и некоторому подавлению пути HRR (Kriger et al., 2022).

Согласно нашим более ранним работам, АСТН4 усиливает активацию транскрипционного фактора NF-κB (Aksenova et al., 2013), который широко известен участием в контроле клеточного цикла, апоптоза и устойчивости клеток к противораковой терапии (Bours et al., 2000; Mayo, Baldwin, 2000; Ricca et al., 2001; Campbell et al., 2004; J. Wang et al., 2009).

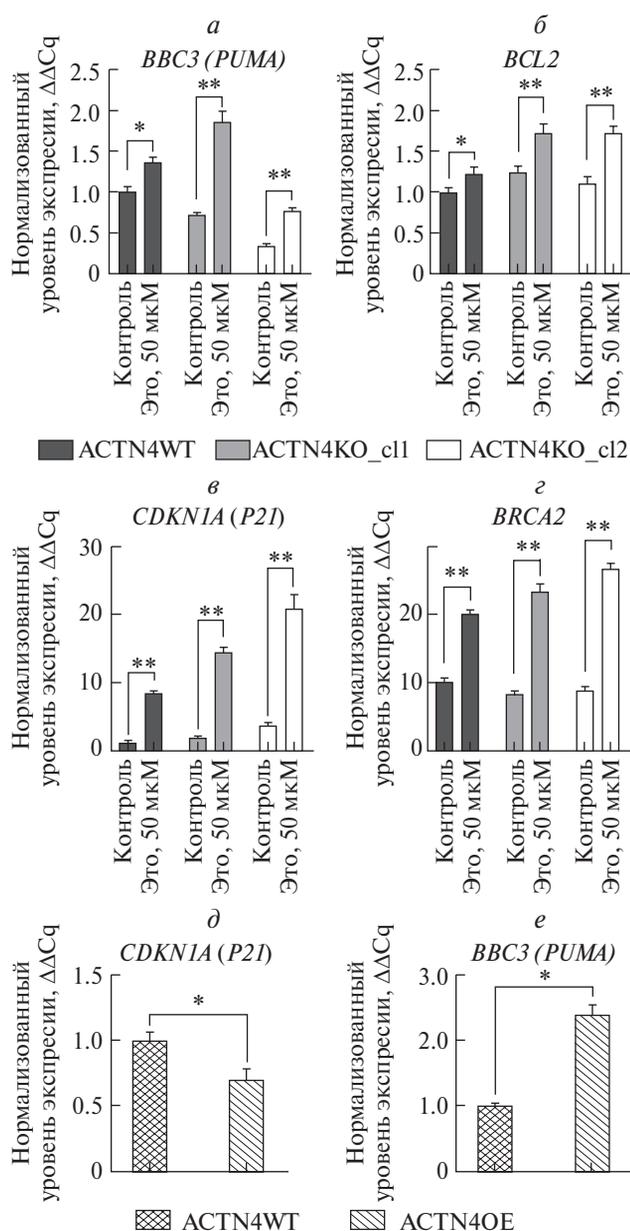
На первом этапе настоящей работы мы проверили, приводит ли подавление экспрессии *ACTN4* к изменению экспрессии NF-κB-зависимых генов в клеточной линии H1299. Для этого мы выбрали гены *ICAM1* (Aoudjit et al., 1997), *CCL2 (MCP1)* (Stylianou et al., 1999) и *IKBA* (Haskill et al., 1991), относящиеся к разным функциональным группам и содержащие функциональные κB-сайты в промоторах.

Экспрессию генов анализировали с помощью количественной ПЦР в клетках H1299 (ACTN4WT) и в двух линиях ACTN4KO с полным нокаутом *ACTN4* (ACTN4KO\_cl1 и ACTN4KO\_cl2). Мы установили, что подавление экспрессии *ACTN4* приводит к значительному, в несколько раз, снижению экспрессии генов *ICAM1* и *CCL2 (MCP1)*, но не влияет на экспрессию гена *IKBA* (рис. 1). Таким образом, мы подтвердили, что *ACTN4* вовлечен в селективную регуляцию генов мишеней NF-κB в нашей модельной системе.

Далее мы проверили, влияет ли уровень экспрессии *ACTN4* на активацию экспрессии генов, участвующих в регуляции репарации ДНК и апоптоза. Мы оценили экспрессию генов *BBC3 (PUMA)* (Wang et al., 2009), *BCL2* (Catz, Johnson, 2001), *CDKN1A (P21)* (Hinata et al., 2003) и *BRCA2* (Wu et al., 2000) в клетках контрольной линии H1299 ACTN4WT и двух линиях ACTN4KO до и после обработки этопозидом в течение 1 ч.



**Рис. 1.** Сравнение уровней экспрессии NF-κB-зависимых генов в контрольной линии H1299 (ACTN4WT) и в двух линиях, нокаутных по гену *ACTN4* (ACTN4KO\_c11 и ACTN4KO\_c12). ПЦР в реальном времени. \* — Различия с контрольной линией достоверны при  $p < 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни); нд — не достоверно.

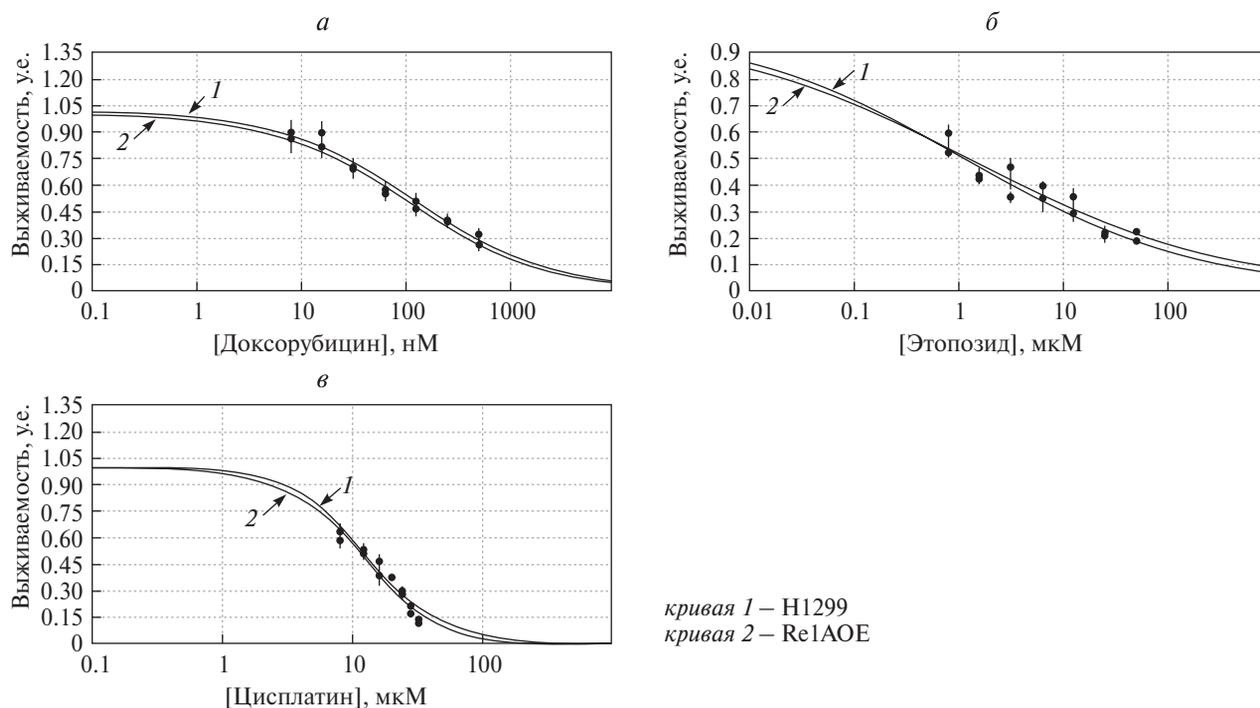


**Рис. 2.** Уровни экспрессии генов ответа на повреждение ДНК. ПЦР в реальном времени: а — сравнение уровней экспрессии генов в контрольных клетках H1299 (ACTN4WT) и в клетках линий H1299, нокаутных по гену *ACTN4* (ACTN4KO\_c11 и ACTN4KO\_c12) до (контроль) и после обработки этопозидом (Это); б — сравнение уровней экспрессии генов в контрольной линии H1299 (ACTN4WT) и линии H1299, гиперэкспрессирующей ген *ACTN4* (ACTN4OE). \* — различия достоверны при  $p < 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни).

Мы обнаружили, что уровень экспрессии *ACTN4* коррелирует с активностью генов *BBC3* (*PUMA*) и *BRCA2* в необработанных клетках. Однако после действия этопозида и активации обоих генов, корреляция у *BBC3* (*PUMA*) более не прослеживалась, а у *BRCA2* менялась на противоположную (рис. 2). Гены *CDKN1A* (*P21*) и *BCL2* показали некоторую обратную корреляцию с *ACTN4* после генотоксического стресса, хотя активация *BCL2* была не слишком значительной (менее 50%).

Таким образом, полученные результаты не дают оснований предполагать, что *ACTN4* влияет на устойчивость клеток к этопозиду через прямую регуляцию экспрессии ключевых генов репарации и апоптоза, в том числе NF-κB-зависимых. Экспрессия генов *BCL2* и *BRCA2* может регулироваться NF-κB (Wu et al, 2000; Catz, Johnson, 2001), но мы не обнаружили снижения их экспрессии в клетках клонов ACTN4KO. Напротив, *BRCA2* активируется в клонах ACTN4KO сильнее и более чем в два раза.

Влияние нокаута *ACTN4* на гены *BBC3* (*PUMA*) и *CDKN1A* (*P21*) было разнонаправленным, хотя оба гена подавляют пролиферацию, индуцируя апоптоз через *BBC3* (*PUMA*) (Yu, Zhang, 2008)



**Рис. 3.** Относительная устойчивость клеток линий H1299 (кривая 1) и H1299 RelAOE (кривая 2) к действию доксорубина (а), этопозид (б) и цисплатина (в). Цитотоксичность (МТТ-тест) оценивали после обработки клеток в течение 72 ч. Для каждого вещества строили кривую зависимости доза–эффект при помощи модели логистической регрессии. Вертикальные отрезки — ошибки среднего значения.

и блок клеточного цикла через *CDKN1A (P21)* (Vermeulen et al., 2003). При нормальных условиях подавление экспрессии *ACTN4* приводило к снижению экспрессии гена *BBC3 (PUMA)* и, напротив, к увеличению экспрессии гена *CDKN1A (P21)* в обоих клонах по сравнению с контрольной линией. При этом гиперэкспрессия *ACTN4* оказывала обратный эффект (см. рис. 2).

Обработка этопозидом индуцировала значительную активацию обоих генов, что соответствует данным из литературы. Интересно, что оба гена в большинстве клеток активируются транскрипционным фактором p53, который стабилизируется при генотоксическом стрессе. Однако в клетках H1299 его ген *TP53* отсутствует. Вероятно, это служит причиной не слишком сильной активации *BBC3 (PUMA)*. Тем не менее экспрессия гена *CDKN1A (P21)* увеличивается в несколько раз несмотря на отсутствие *TP53* (см. рис. 2).

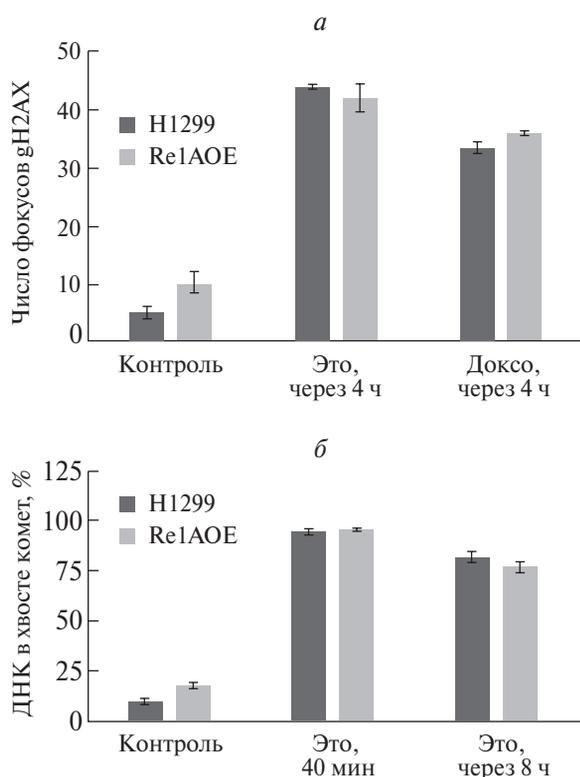
Таким образом, анализ экспрессии выбранных генов ответа на повреждения ДНК, в том числе NF-kB-зависимых, не позволил выявить причину резистентности клеток АСТН4КО к ингибиторам ТОРОП. Однако активация NF-kB обычно ассоциирована с туморогенезом и резистентностью к противоопухолевой терапии (Mayo, Baldwin, 2000). Возможно, влияние АСТН4 на NF-kB-за-

висимую резистентность определяется очень ограниченным количеством генов. Кроме того, мы ранее продемонстрировали, что активация RelA-субъединицы NF-kB приводит к значительному замедлению пролиферации клеток линии H1299 (Lomert et al., 2018).

Возможно, нокаут *ACTN4* и подавление некоторых NF-kB-зависимых генов приводят к обратному эффекту. Исходя из этого, мы проверили, влияет ли активность NF-kB на выживаемость клеток H1299 и эффективность репарации разрывов ДНК после воздействия генотоксических препаратов.

Для анализа использовали полученную нами ранее линию H1299 с постоянной гиперэкспрессией гена *RELA* (линия RelAOE) (Lomert et al., 2018). При помощи метода МТТ мы оценили выживаемость клеток RelAOE после воздействия этопозид (0.8–50  $\mu\text{M}$ ), доксорубина (0.08–0.5  $\mu\text{M}$ ) или цисплатина (8–32  $\mu\text{M}$ ). Эти препараты широко используются в терапии НМКРЛ и обладают разными механизмами действия. Анализ показал, что повышение экспрессии NF-kB не приводило к изменению выживаемости при воздействии всех трех препаратов (рис. 3).

Мы применяли два подхода к оценке эффективности репарации разрывов ДНК. Сначала проанализировали фокусы фосфорилированного



**Рис. 4.** Оценка эффективности репарации разрывов ДНК в клетках линий H1299 и H1299 RelAOE: *а* — среднее число (и его ошибка) фокусов гистона  $\gamma$ H2AX в ядре. Клетки обрабатывали этопозидом (Это) или доксорубицином (Доксо) в течение 40 мин, после чего препарат удаляли и культивировали еще 4 ч; *б* — результаты теста ДНК-комет в щелочных условиях. Обработку клеток этопозидом проводили, как описано ранее, с последующим культивированием в отсутствие препарата в течение 8 ч. Контроль — интактные клетки.

гистона H2AX (гамма-H2AX). Фосфорилирование гистона H2AX в месте разрыва ДНК является одним из ранних событий репарации повреждения (Muslimović, 2012). Клетки обрабатывали этопозидом (50 мкМ) или доксорубицином (1.5 мкМ) в течение 40 мин, после чего препарат убирали и культивировали клетки в течение еще 4 ч, давая им время для репарации разрывов ДНК. Мы обнаружили, что среднее число фокусов гамма-H2AX не отличалось в клетках с нормальным и с активированным NF-kB (рис. 4а).

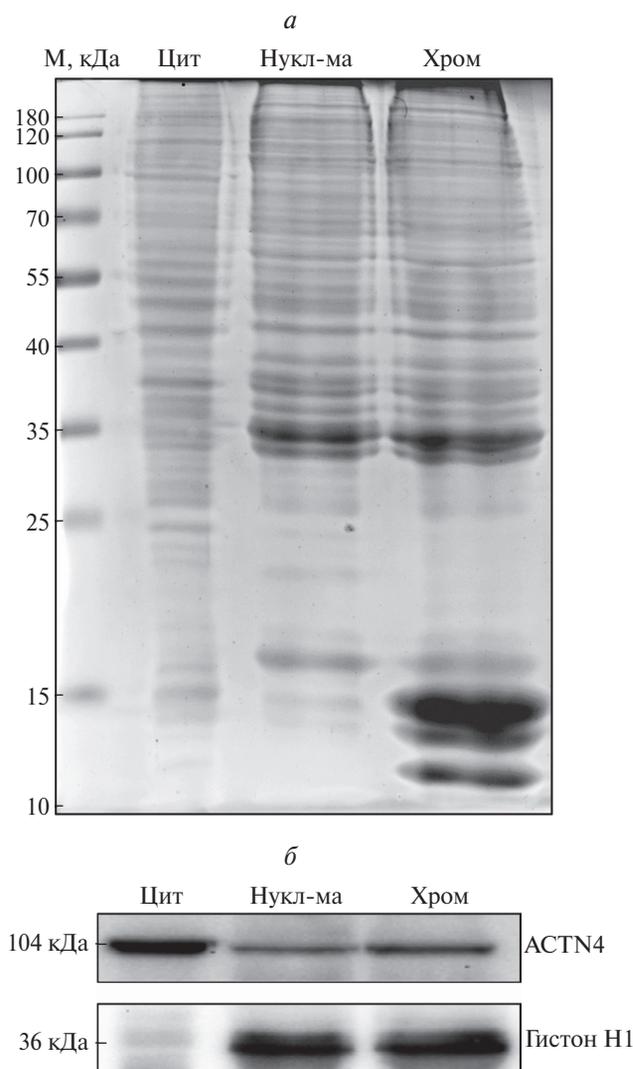
Для подтверждения полученных результатов мы оценили эффективность репарации ДНК при помощи метода ДНК-комет в щелочных условиях. Клетки обрабатывали так же, как при анализе фокусов гамма-H2AX, но репарацию оценивали через 8 ч после удаления препарата.

Клетки линии H1299 RelAOE не отличались по эффективности репарации разрывов ДНК от

контрольной линии (см. рис. 4б). Таким образом, конститутивная активация NF-kB не приводит к увеличению резистентности клеток H1299 к действию ДНК-повреждающих веществ и не оказывает влияния на прохождение репарации ДНК.

Другим возможным механизмом вовлечения АСТN4 в регуляцию репарации ДНК может быть непосредственное взаимодействие АСТN4 с факторами репарации. Для проверки этого предположения мы проанализировали присутствие АСТN4 в хроматине клеток H1299.

Мы применяли метод субклеточного фракционирования с последующей очисткой ядер через



**Рис. 5.** Распределение АСТN4 в клетках H1299: *а* — электрофорез в SDS-геле белков, полученных методом субклеточного фракционирования, из клеток линии H1299. Детекция белков по окраске по Кумасси; *б* — вестерн-блот с антителами к АСТN4. Гистон H1 использован для контроля нагрузки белка. М — белковый маркер; Цит — цитоплазма; Нукл-ма — нуклеоплазма; Хром — хроматин.

0.5 М сахарозу с целью удаления остатков цитоскелетных структур, которые могут оставаться связанными с ядрами после лизиса клеток. Поскольку количество АСТН4 в цитоплазме значительно превышает его содержание в ядре, этот этап критичен для корректного анализа ядерного АСТН4.

После получения и очистки ядер мы исследовали присутствие АСТН4 в растворимой фракции (нуклеоплазме) и в хроматине. Для расщепления геномной ДНК и экстракции белков хроматина ядра дополнительно обрабатывали бензоназой (Moreno et al., 1991). На рис. 5а, дорожка 3 видно, что в растворимой фракции ядерных белков гораздо слабее детектируются фракция гистонов (15 кДа). Иммуногибридизация показала, что количество белка АСТН4 в хроматиновой фракции значительно больше, чем в растворимой (рис. 5б).

Полученные нами данные согласуются с опубликованными сообщениями о том, что АСТН4 обнаруживается в комплексах ремоделирования хроматина, таких как INO80 (Kumeta et al., 2010). INO80 состоит из 15 белков (Shen et al., 2000), которые участвуют в регуляции транскрипции, репликации и репарации молекулы ДНК (Poli et al., 2017).

Таким образом, мы обнаружили, что в линиях Н1299 с полным нокаутом гена *ACTN4* происходит подавление экспрессии некоторых, но не всех, NF-κB-зависимых генов. Тем не менее нам не удалось выявить зависимости между влиянием *ACTN4* на экспрессию генов и повышенной резистентностью нокаутных клеток к ДНК-повреждающим препаратам. Более того, мы не выявили какого-либо влияния активности NF-κB на устойчивость клеток Н1299 к генотоксическому стрессу. Обнаруженное нами присутствие АСТН4 в хроматиновой фракции позволяет предположить его непосредственное влияние на сборку комплексов белков, участвующих в репарации ДНК.

## БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовано оборудование Центра клеточных технологий Института цитологии РАН; авторы благодарны за предоставление доступа к его конфокальной платформе CQ1.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при внутренней финансовой поддержке (ВФНД) Института цитологии РАН (проект “Участие альфа-актинина 4 (АСТН4) в репарации двухцепочечных разрывов ДНК”).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах работы животные и люди не участвовали.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабак В.Н., Бобков Д.Е., Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Подольская Е.П., Пинаев Г.П.* 2004. Альфа-актинин-4 и субъединица p65/RelA транскрипционного фактора NF-κB в клетках A431 локализуются совместно и мигрируют в ядро при действии эпидермального фактора роста. Цитология Т. 46. № 12. С. 1065. (Babakov V.N., Bobkov D.E., Petukhova O.A., Turoverova L.V., Kropacheva I.V., Podol'skaya E.P., Pinaev G.P. 2004. Alpha-Actinin-4 and p65/RelA subunit of NF-kappaB transcription factor are co-localized and migrate together into the nucleus in EGF-stimulated A431 cell. Tsitologiya. V. 46(12). P. 1065.
- Agarwal N., Adhikari A.S., Iyer S.V., Hekmatdoost K., Welch D.R., Iwakuma T.* 2013. MTBP suppresses cell migration and filopodia formation by inhibiting ACTN4. Oncogene V. 32. P. 462.
- Aksenova V., Turoverova L., Khotin M., Magnusson K.E., Tulchinsky E., Melino G., Pinaev G.P., Barlev N., Tentler D.* 2013. Actin-binding protein alpha-actinin 4 (ACTN4) is a transcriptional co-activator of RelA/p65 sub-unit of NF-κB. Oncotarget V. 4. P. 362.
- Aoudjit F., Brochu N., Bélanger B., Stratowa C., Hiscott J., Audette M.* 1997. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene by tumor necrosis factor-alpha is mediated by the nuclear factor-kappaB heterodimers p65/p65 and p65/c-Rel in the absence of p50. Cell Growth Differ V. 8. P. 335.
- Baron M.D., Davison M.D., Jones P., Critchley D.R.* 1987. The sequence of chick alpha-actinin reveals homologies to spectrin and calmodulin. J. Biol. Chem. V. 262. P. 17623.
- Ben Short.* 2011. BRCA1 on the move. J. Cell Biol. V. 192. P. 369.
- Bours V., Bonizz G., Bentires-Alj M., Bureau F., Piette J., Lekeux P., Merville M.* 2000. NF-κB activation in response to toxic and therapeutic agents: role in inflammation and cancer treatment. Toxicol. V. 153. P. 27.
- Campbell K.J., Rocha S., Perkins N.D.* 2004. Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA (p65) NF-κB. V. 13. P. 853.
- Catz S.D., Johnson J.L.* 2001. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. Oncogene. V. 20. P. 7342.
- DiDonato J.A., Mercurio F., Karin M.* 2012. NF-κB and the link between inflammation and cancer. Immunol. Rev. V. 246. P. 379.
- Dixson J.D., Forstner M.J., Garcia D.M.* 2003. The alpha-actinin gene family: a revised classification. J. Mol. Evol. V. 56. P. 1.

- Gao Y., Li G., Sun L., He Y., Li X., Sun Z., Wang J., Jiang Y., Shi J. 2015. ACTN4 and the pathways associated with cell motility and adhesion contribute to the process of lung cancer metastasis to the brain. *BMC Cancer*. V. 15. P. 277.
- Haskill S., Beg A.A., Tompkins S.M., Morris J.S., Yurochko A.D., Sampson-Johannes A., Mondal K., Ralph P., Baldwin A.S.J. 1991. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell*. V. 65. P. 1281.
- Hinata K., Gervin A.M., Jennifer Zhang Y., Khavari P.A. 2003. Divergent gene regulation and growth effects by NF-kappa B in epithelial and mesenchymal cells of human skin. *Oncogene*. V. 22. P. 1955.
- Honda K. 2015. The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell Biosci*. V. 5. P. 41.
- Honda K., Yamada T., Endo R., Ino Y., Gotoh M., Tsuda H., Yamada Y., Chiba H., Hirohashi S. 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J. Cell Biol*. V. 140. P. 1383.
- Huang Q., Li X., Huang Z., Yu F., Wang X., Wang S., He Z., Lin J. 2020. ACTN4 promotes the proliferation, migration, metastasis of osteosarcoma and enhances its invasive ability through the NF- $\kappa$ B pathway. *Pathol. Oncol. Res*. V. 26. P. 893.
- Kruger D., Novitskaya K., Vasileva G., Lomert E., Aksenov N.D., Barlev N.A., Tentler D. 2022. Alpha-actinin-4 (ACTN4) selectively affects the DNA double-strand breaks repair in non-small lung carcinoma cells. *Biol. Direct*. V. 17. P. 1.
- Kumeta M., Yoshimura S.H., Harata M., Takeyasu K. 2010. Molecular mechanisms underlying nucleocytoplasmic shuttling of actinin-4. *J. Cell Sci*. V. 123. P. 1020.
- Lomert E., Turoverova L., Kruger D., Aksenov N. D., Nikotina A. D., Petukhov A., Mittenberg A.G., Panyushev N.V., Khotin M., Volkov K., Barlev N.A., Tentler D. 2018. Co-expression of RelA/p65 and ACTN4 induces apoptosis in non-small lung carcinoma cells. *Cell Cycle*. V. 17. P. 616.
- Magné N., Toillon R.A., Bottero V., Didelot C., Houtte P. Van, Gérard J.P., Peyron J.F. 2006. NF- $\kappa$ B modulation and ionizing radiation: Mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Lett*. V. 231. P. 158.
- Mayo M.W., Baldwin A.S. 2000. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1470. P. M55.
- Mirman Z., de Lange T. 2020. 53BP1: a DSB escort. *Genes Dev*. V. 34. P. 7.
- Miura N., Kamita M., Kakuya T., Fujiwara Y., Tsuta K., Shiraishi H., Takeshita F., Ochiya T., Shoji H., Huang W., Ohe Y., Yamada T., Honda K. 2016. Efficacy of adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer assessed by metastatic potential associated with ACTN4. *Oncotarget*. V. 7. P. 33165.
- Moreno J.M., Sanchez-Montero J.M., Sinisterra J.V., Nielsen L.B. 1991. Contribution to the study of the enzymatic activity of benzonase. *J. Mol. Catalysis*. V. 69. P. 419.
- Moureau S., Luessing J., Harte E.C., Voisin M., Lowndes N.F. 2016. A role for the p53 tumour suppressor in regulating the balance between homologous recombination and non-homologous end joining. *Open Biol*. V. 6. P. 160225. <https://doi.org/10.1098/rsob.160225>
- Muslimović A., Johansson P., Hammarste O. 2012. Measurement of H2AX phosphorylation as a marker of ionizing radiation induced cell damage. In: *Current topics in ionizing radiation research*. London: InTech. P. 3.
- Nakanishi C., Toi M. 2005. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. V. 5. P. 297.
- Noro R., Honda K., Nagashima K., Motoi N., Kunugi S., Matsubayashi J., Takeuchi S., Shiraishi H., Okano T., Kashiro A., Meng X., Yoshida Y., Watanabe S., Usuda J., Inoue T., et al. 2022. Alpha-actinin-4 (ACTN4) gene amplification is a predictive biomarker for adjuvant chemotherapy with tegafur/uracil in stage I lung adenocarcinomas. *Cancer Sci*. V. 113. P. 1002.
- Noro R., Honda K., Tsuta K., Ishii G., Maeshima A.M., Miura N., Furuta K., Shibata T., Tsuda H., Ochiai A., Sakuma T., Nishijima N., Gemma A., Asamura H., Nagai K., Yamada T. 2013. Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4 cell motility gene amplification. *Ann. Oncol*. V. 24. P. 2594.
- Poli J., Gasser S.M., Papamichos-Chronakis M. 2017. The INO80 remodeler in transcription, replication and repair. *Philosoph. Transact. Royal Soc. B: Biol. Sci*. V. 372. P. 20160290.
- Ricca A., Biroccio A., Trisciuglio D., Cippitelli M., Zupi G., Bufalo D. Del. 2001. RelA over-expression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells. *Br. J. Cancer*. V. 85. P. 1914.
- Shen X., Mizuguchi G., Hamiche A., Wu C. 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*. V. 406. P. 541.
- Shiraishi H., Fujiwara Y., Kakuya T., Tsuta K., Motoi N., Miura N., Watabe Y., Watanabe S., Noro R., Nagashima K., Huang W., Yamada T., Asamura H., Ohe Y., Honda K. 2017. Actinin-4 protein overexpression as a predictive biomarker in adjuvant chemotherapy for resected lung adenocarcinoma. *Biomark. Med*. V. 11. P. 721.
- Staudt L.M. 2010. Oncogenic activation of NF-kB. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. V. 2. P. a000109. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000109>
- Stylianou E., Nie M., Ueda A., Zhao L. 1999. C-Rel and p65 trans-activate the monocyte chemoattractant protein-1 gene in interleukin-1 stimulated mesangial cells. *Kidney Int*. V. 56. P. 873.
- Tentler D., Lomert E., Novitskaya K., Barlev N.A. 2019. Role of ACTN4 in tumorigenesis, metastasis, and EMT. *Cells*. V. 8. P. 1427.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. V. 36. P. 131.
- Wang J., Jacob N.K., Ladner K.J., Beg A., Perko J.D., Tanner S.M., Liyanarachchi S., Fishel R., Guttridge D.C. 2009. RelA/p65 functions to maintain cellular senescence by regulating genomic stability and DNA repair. *EMBO Rep*. V. 10. P. 1272.
- Wang P., Qiu W., Dudgeon C., Liu H., Huang C., Zambetti G., Yu J., Zhang L. 2009. PUMA is directly activated by NF-

- $\kappa$ B and contributes to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *Cell Death Differ.* V. 16. P. 1192.
- Wang W., Mani A.M., Wu Z.-H. 2017. DNA damage-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation and its roles in cancer progression. *J. Cancer Metastasis Treat.* V. 3. P. 45.
- Wu K., Jiang S.W., Thangaraju M., Wu G., Couch F.J. 2000. Induction of the BRCA2 promoter by nuclear factor- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* V. 275. P. 35548.
- Xia L., Tan S., Zhou Y., Lin J., Wang H., Oyang L., Tian Y., Liu L., Su M., Wang H., Cao D., Liao Q. 2018. Role of the NF $\kappa$ B-signaling pathway in cancer. *OncoTargets Ther.* V. 11. P. 2063.
- Yu J., Zhang L. 2008. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene.* V. 27. P. 71.
- Zhao X., Hsu K.-S., Lim J.H., Bruggeman L.A., Kao H.-Y. 2015.  $\alpha$ -Actinin 4 potentiates nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B-cell (NF- $\kappa$ B) activity in podocytes independent of its cytoplasmic actin binding function. *J. Biol. Chem.* V. 290. P. 338.
- Zhao X., Khurana S., Charkraborty S., Tian Y., Sedor J.R., Bruggeman L.A., Kao H.-Y. 2017.  $\alpha$ -Actinin 4 (ACTN4) regulates glucocorticoid receptor-mediated transactivation and transrepression in podocytes. *J. Biol. Chem.* V. 292. P. 1637.

## ACTN4-DEPENDENT REGULATION OF DOUBLE-STRAND DNA BREAK REPAIR IS INDEPENDENT OF NF-KB ACTIVITY

D. V. Kriger<sup>a,\*</sup>, G. V. Vasilevaa, E. V. Lomerta, D. G. Tentlera

<sup>a</sup> *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St-Petersburg, 194064, Russia*

\*E-mail: daryamalikova@gmail.com

$\alpha$ -Actinin-4 is an actin-binding protein that is involved in a wide range of cellular processes. Along with actin and other proteins of the actin cytoskeleton,  $\alpha$ -actinin-4 was found not only in the cytoplasm, but also in the nucleus of various cells. As a nuclear protein, it is involved in regulation of certain transcription factors. In particular, it can regulate transcriptional activity of NF- $\kappa$ B, which largely determines the resistance of cancer cells to apoptosis and anticancer therapy. During our previous studies, it was found that  $\alpha$ -actinin-4 can influence resistance of cancer cells to topoisomerase II inhibitors and determine the efficiency of DNA double-strand break repair. We have demonstrated that  $\alpha$ -actinin-4 interferes with the assembly of complexes involved in DNA repair via NHEJ and HRR, which in turn leads to an imbalance between these pathways. In this study, we were answering to the question of how  $\alpha$ -actinin-4 is involved in the regulation of the DNA double-strand breaks repair following genotoxic stress. Our results indicate that the effect of  $\alpha$ -actinin-4 on repair progression in H1299 non-small cell lung cancer cells does not depend on the transcription factor NF- $\kappa$ B activity. We found that in the nucleus of H1299 cells,  $\alpha$ -actinin-4 is localized not only in the nucleoplasm, but also reveals close association with chromatin.

**Keywords:** ACTN4, NF- $\kappa$ B, DNA repair, Non-small cell lung cancer (NSCLC)

УДК 616.5-006.81.04:576.08

## УГНЕТЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NRF2, ОПОСРЕДОВАННОЕ MIR-155, ВЫЗЫВАЕТ СНИЖЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ ВНЕ ЗАВИСИМОСТИ ОТ РЕДОКС-СТАТУСА

© 2024 г. В. А. Купенко<sup>1</sup>, Д. А. Дашкова<sup>1</sup>, Т. Г. Рукша<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022, Россия

\*E-mail: tatyana\_ruksha@mail.ru

Поступила в редакцию 13.07.2023 г.

После доработки 07.10.2023 г.

Принята 11.10.2023 г.

Ген *NFE2L2* редокс-зависимого транскрипционного фактора NRF2 является мишенью микроРНК miR-155. В представленной работе выполнена трансфекция имитатора (миметика) miR-155 в клетки меланомы В16, устойчивые к дакарбазину. Определено, что под влиянием миметика микроРНК miR-155 в клетках меланомы снижается уровень экспрессии NRF2, кодируемого *NFE2L2*, как в условиях окислительного стресса, так и без него. Снижение уровня NRF2 сопровождалось снижением жизнеспособности устойчивых к дакарбазину клеток меланомы. Таким образом, miR-155-опосредованная активация NRF2, регулирующего выраженность антиоксидантных процессов в клетке, может быть связана с сохранением жизнеспособности и развитием лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Последнее может быть использовано для преодоления химиорезистентности при лечении онкологических заболеваний.

**Ключевые слова:** меланома, В16, дакарбазин, miR-155, NRF2, ферроптоз, редокс-статус, окислительный стресс

**Принятые сокращения:** АФК — активные формы кислорода; ДМСО — диметилсульфоксид; МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени; PBS — фосфатно-солевой раствор.

**DOI:** 10.31857/S0041377124010044, **EDN:** IEFCEJ

Активные формы кислорода (АФК) обладают двойственной ролью в канцерогенезе. С одной стороны, они стимулируют разрушение и последующую элиминацию трансформированных клеток, выполняя протективную роль в отношении развития злокачественных новообразований; кроме того, они могут индуцировать развитие клеточного старения и гибель клеток путем ферроптоза (Wu et al., 2019). С другой стороны, при хроническом воспалении АФК, выступая одной из первых линий защиты, обеспечивают окисление макромолекул, приводя к хромосомной нестабильности, появлению мутаций, изменению выраженности процессов пролиферации и дифференцировки (Seddon et al., 2023). В этой связи логично считать, что механизмы, регулирующие антиоксидантные процессы в клетках эукариот, играют существенную роль в канцерогенезе (Cheung, Vousden, 2022).

NRF2 — транскрипционный фактор, функционирование которого связано с поддержанием

редокс-статуса в клетке (Agamouni et al., 2023). Установлено, что NRF2 регулирует экспрессию ряда антиоксидантных молекул, в том числе каталазы, супероксиддисмутазы, глутатиона (Tossetta, Marzioni, 2023). В физиологических условиях NRF2 находится в связанном состоянии с белком Keap1, репрессирующим его активность, и подвергается убиквитин-зависимой деградации в протеасомах.

В условиях действия повреждающих факторов NRF2 высвобождается и транслоцируется в ядро клетки, где образует гетеродимеры с малыми белками Maf и связывается с так называемым антиоксидант-респонсивным элементом (ARE) (Bollong et al., 2018). Генами-мишенями NRF2 являются глутаматцистеинлигаза, тиоредоксинредуктаза 1, NAD(P)H-дегидрогеназа, глутатион-S-трансфераза, гены семейства множественной лекарственной устойчивости. Активация NRF2 приводит к повышению синтеза глутатиона, элиминации АФК,

детоксикации ксенобиотиков, инициации транспорта лекарственных веществ в клетку (Milcovic et al., 2017).

Таким образом, сигнальный путь NRF2/Keap1/ARE относится к ключевым механизмам, активирующимся в условиях нарушенного редокс-статуса (Fan et al., 2017). В нормальных клетках посредством NRF2/Keap1/ARE происходит усиление транскрипции генов провоспалительных и антиоксидантных факторов, что снижает вероятность нестабильности генома (Camiña, Penning, 2022).

Усиление активности NRF2 в опухолевых клетках может быть связано с приобретением последними повышенной устойчивости к повреждающим факторам, в том числе к противоопухолевым лекарственным средствам. Пока нет однозначного ответа, носит ли функционирование NRF2 в опухолевых клетках про- или, напротив, антиканцерогенный характер. Описаны попытки целенаправленного воздействия на NRF2 с терапевтической целью при злокачественных новообразованиях, хотя весьма широкий спектр функций NRF2 являлся фактором, ограничивающим эту область исследований (Feng et al., 2023).

Выявлено, что длинная некодирующая РНК LINC00239 вызывает нестабильность комплекса NRF2/Keap1, приводя к NRF2-опосредованному усилению пролиферации и ингибированию ферроптоза клеток колоректального рака (Han et al., 2022). Вместе с тем для развития колоректального рака *in vivo* одной активации или ингибирования только NRF2 было недостаточно (Knatko et al., 2021).

Ряд микроРНК описан в качестве регуляторов экспрессии гена *NFE2L2*, кодирующего транскрипционный фактор NRF2. *NFE2L2* является геном-мишенью микроРНК miR-155 (Aksenenko et al., 2019; Liu et al., 2023). Обычно функционирование miR-155 в клетках меланомы рассматривается как оносупрессорное. Эктопическая экспрессия miR-155 вызывала снижение миграции и инвазии клеток меланомы (Li et al., 2019). Повышение miR-155 посредством трансфекции в клетки меланомы миметика miR-155 приводило к ингибированию метастазирования *in vivo*, что было опосредовано снижением уровня мишеневого гена — протеинкиназы WEE1, являющейся компонентом сигнального пути BRAF. Помимо уменьшения интенсивности метастазирования, при трансфекции в клетки меланомы миметика miR-155, происходило снижение их жизнеспособности (DiSano et al., 2019).

В этой связи целью данного исследования являлось определение эффекта трансфекции миметика микроРНК miR-155 на уровень мРНК гена *NFE2L2* и жизнеспособности клеток меланомы, резистентных к дакарбазину, в условиях окислительного стресса.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клеточные линии и условия культивирования.** В эксперименте использовали клеточную линию меланомы В16, любезно предоставленную НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (Новосибирск, Россия).

Клетки культивировали в среде DMEM (“Пан-Эко”; Москва, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone, GmbH, Parsching, Австрия), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco Life Technologies; Гранд-Айленд, США). Клетки культивировали в инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (Sanyo MSO-5AC, Осака, Япония).

**Воздействие цитостатическим препаратом дакарбазин.** Клетки меланомы В16 в концентрации 1·10<sup>5</sup> кл./мл обрабатывали 1.2 мМ раствором дакарбазина (Sigma-Aldrich, США), разведенного в ДМСО, и культивировали в течение 72 ч при 37 °С. Затем клетки промывали стерильным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и культивировали дополнительно в питательной среде DMEM без дакарбазина в течение 48 ч, как было нами описано ранее (Esimbekova et al., 2023). В качестве контроля использовали исходные культуры клеток, обработанные 0.1% ДМСО.

**МТТ-тест.** Для оценки метаболической активности (жизнеспособности) клеток после воздействия миметиком микроРНК miR-155 выполняли МТТ-тест. Питательную среду отбирали из лунок, заменяли ее на свежую полную среду с МТТ (5 мг МТТ на 1 мл полной питательной среды) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Нидерланды). В каждую лунку добавляли по 135 мкл полной питательной среды и по 15 мкл концентрата МТТ. Далее клетки культивировали в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора в течение 4 ч. Затем отбирали жидкость из лунок, добавляли 200 мкл ДМСО и культивировали еще 10 мин. Оптическую плотность раствора в лунках определяли на спектрофотометре “Эфос-9305” (“Фотосистемы Швабе”, Россия) при длине волны 594 нм.

**Трансфекция миметика микроРНК miR-155 в клетки меланомы В16.** Трансфекцию миметика

микроРНК miR-155 в клетки меланомы линий B16 осуществляли после воздействия цитостатическим препаратом дакарбазином в бессывороточной питательной среде. Для увеличения количества микроРНК miR-155 в клетках меланомы использовали коммерческий миметик микроРНК mmu-miR-155 mirVana™ miRNA mimics (№ 4464066; Invitrogen, США) и для отрицательного контроля — mirVana™ miRNA Mimic Negative Control 1 (№ 4464058; Invitrogen, США) в комплексе с реагентом для трансфекции Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen, США).

В соответствии с прилагаемым протоколом производителя на 2 мл клеточной суспензии в концентрации  $4 \cdot 10^4$  кл./мл использовали 12 мкл раствора миметика miR-155 или отрицательного контроля миметика и 6 мкл трансфектанта. После приготовления растворов Lipofectamine™ 3000 и миметика (негативного контроля), их смешивали и инкубировали 15 мин для проникновения миметика в липосферы. Конечная концентрация вводимых миметика микроРНК и отрицательного контроля в питательной среде составляла 250 нМоль/л. Трансфекцию осуществляли в течение 48 ч при температуре 37 °С и содержании углекислого газа 5% в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора.

**Индукция окислительного стресса.** Стресс вызывали добавлением в лунки планшета с клетками раствора перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в конечной концентрации 700 мкМ, как нами было описано ранее (Komina et al., 2012). Клетки предварительно обрабатывали дакарбазином в отдельной серии экспериментов с последующей трансфекцией негативного контроля к микроРНК miR-155 или миметика miR-155. После добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в лунки планшета клетки культивировали в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора в течение 60 мин. Затем среду с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> заменяли на среду без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и оставляли клетки на 24 ч в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора.

**Выделение РНК и реакция обратной транскрипции.** Выделение РНК из культуры клеток проводили с помощью набора реагентов diaGene (№ 3317; “Диаэм”, Россия) согласно протоколу производителя. Выделение тотальной РНК из клеток культур осуществляли после двукратной отмывки клеток от питательной среды стерильным PBS и дальнейшего лизиса клеток лизирующим раствором, входящим в состав набора. Полученные РНК-элюаты объемом 40 мкл использовали сразу для исследований, или сохраняли при температуре –70 °С.

Для синтеза первой цепи кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора

MMLV RT kit (№ SK021; “Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. Каждый образец состоял из 3 мкл раствора полученной РНК и 1.5 мкл случайного декануклеотидного праймера или 5-кратного раствора специфических праймеров из соответствующего набора для исследования экспрессии микроРНК/мРНК и 5.5 мкл реакционной смеси, состоящей из 1 мкл смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), 1 мкл 1.4-дителиотреитола (ДТТ), 2 мкл 5-кратного раствора реакционного буфера, 0.5 мкл обратной транскриптазы MMLV и 1 мкл безнуклеазной воды. Образец инкубировали в термостате при 37 °С в течение 50 мин, а затем реакцию останавливали, нагревая образцы в течение 10 мин при 70 °С.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени.** ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) выполняли на амплификаторе StepOne™ (Applied Biosystems, Сингапур) с протоколом термоциклирования: 1 цикл 50 °С — 2 мин, 95 °С — 10 мин, затем 40 циклов 95 °С — 15 с, 60 °С — 1 мин. Реакционная смесь для каждой реакции амплификации в общем объеме 20 мкл состояла из 2 мкл кДНК, 1 мкл исследуемых праймеров, 8 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для ПЦР в присутствии ROX (Синтол, Россия), 1.2 мкл раствора MgCl<sub>2</sub> и 6.8 мкл безнуклеазной воды.

Для определения экспрессии мРНК использовали набор для оценки уровня NRF2 (Mm00477784\_m1; Applied Biosystems, США), для нормализации образцов в качестве эндогенных контролей определяли уровни мРНК HPRT1 (Mm00446968\_m1; Applied Biosystems, США) и GAPDH (Mm99999915\_g1; Applied Biosystems, США).

Используемые реагенты для определения экспрессии микроРНК: набор для детекции экспрессии микроРНК miR-155 (mmu-miR-204 PN4427975 002571; Applied Biosystems, США). В качестве эндогенных контролей использовали U6 snRNA (NR\_004394 001973; Applied Biosystems, США) и snoRNA234 (AF357329 001234; Applied Biosystems, США).

Данные анализировали количественно с определением относительных уровней экспрессии исследуемых молекул при помощи метода ΔΔC<sub>T</sub> (Livak, Schmittgen, 2001). Для этого относительные уровни экспрессии микроРНК и мРНК по каждому эндогенному контролю рассчитывали по формуле  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , где C<sub>T</sub> — средние пороговые циклы образцов, при которых кривая флуоресценции ROX пересекала заданную линию фона, а ΔC<sub>T</sub>

определяли разницей СТ исследуемого маркера и СТ эндогенного нормирующего контроля для данного маркера.

Кроме нормализации по эндогенному контролю осуществляли нормализацию по эталонному образцу.  $\Delta\Delta$ СТ — разница  $\Delta$ СТ образца после воздействия и  $\Delta$ СТ интактного образца без какого-либо воздействия. Для каждой исследуемой пробы методом ПЦР-РВ выполняли два технологических повтора.

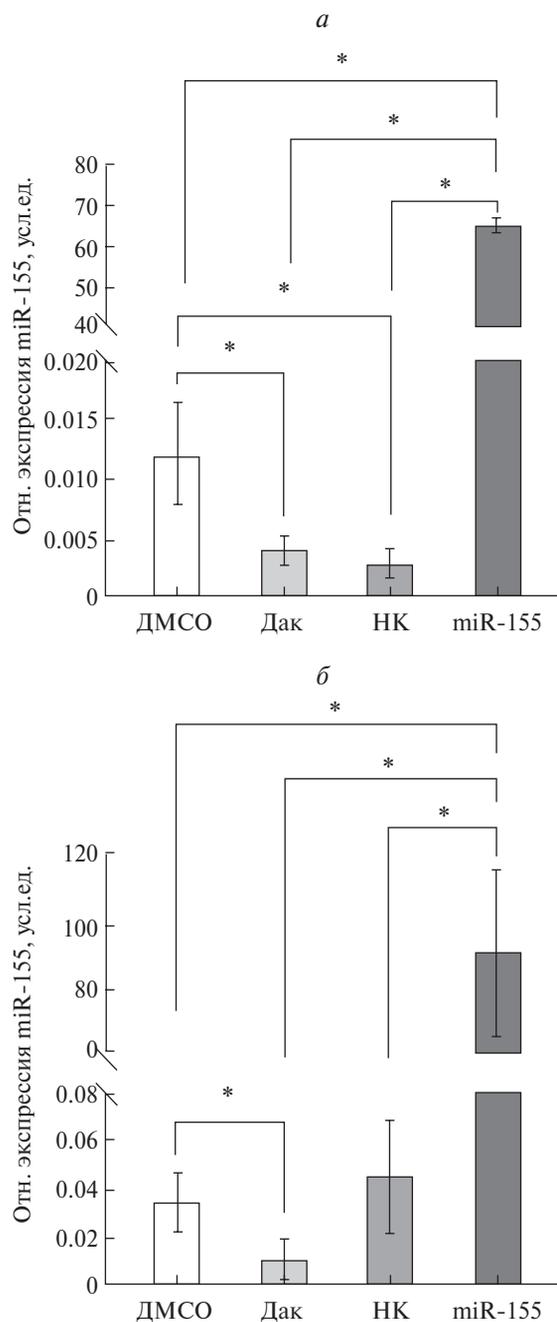
**Статистическая обработка.** Все эксперименты по клеточному культивированию проводили в трех повторностях. Полученные результаты представлены в виде среднего значения из трех повторов и его стандартной ошибки. Различия считали как статистически значимыми при  $P < 0.05$ . Достоверность различий оценивали на основе критерия Краскелла–Уоллеса с дальнейшим сравнением попарно с помощью критерия Манна–Уитни с помощью программного обеспечения Statistica 7.0 (StatSoft, Россия). Статистические результаты получены с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, USA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетках меланомы В16, подвергнутых действию дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 наблюдали повышение уровня miR-155 по сравнению с клетками, подвергнутыми действию ДМСО ( $P = 0.0495$ ), дакарбазина ( $P = 0.0495$ ), дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля ( $P = 0.0495$ ) (рис. 1).

В клетках меланомы В16 на фоне гиперэкспрессии микроРНК miR-155 было обнаружено снижение уровня мРНК *NFE2L2* по сравнению с клетками, подвергнутыми действию ДМСО, дакарбазина и дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля (во всех случаях  $P = 0.0495$ ). Помимо этого, уровень экспрессии *NFE2L2* снижался в клетках меланомы В16 после действия дакарбазина по сравнению с клетками, подвергнутыми воздействию ДМСО ( $P = 0.0495$ ) (рис. 2а).

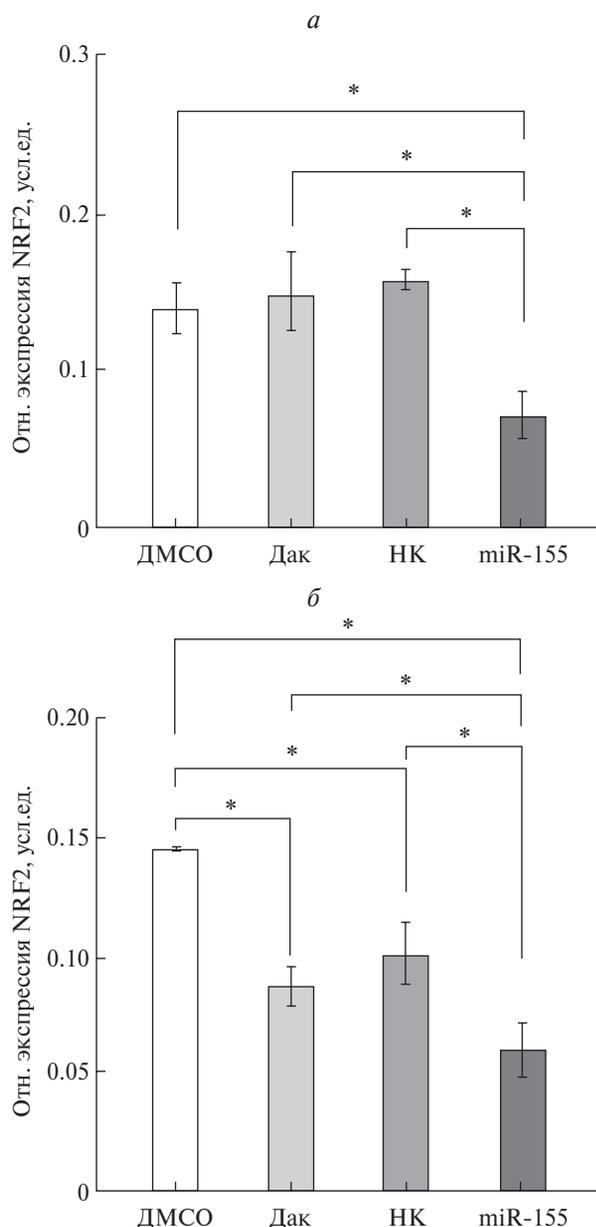
При добавлении в культуральную среду  $H_2O_2$  для индукции окислительного стресса через 24 ч после отмывки уровень экспрессии *NFE2L2* снижался в клетках, подвергнутых действию дакарбазина с последующей трансфекцией миметика miR-155 по сравнению со всеми тремя контрольными группами — клетками с добавлением ДМСО, дакарбазина и дакарбазина в сочетании с негатив-



**Рис. 1.** Уровни экспрессии микроРНК miR-155 в клетках меланомы В16 после действия 0.1% ДМСО, 1.2 мМ дакарбазина, дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля имитатора miR-155, дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 до окислительного стресса (а) и через 24 ч после добавления 700 мкМ  $H_2O_2$  (б). По результатам ПЦР-РВ; (\*) — различия достоверны при  $P = 0.0495$  (критерий Краскелла–Уоллеса).

ным контролем (во всех случаях  $P = 0.0495$ ) (см. рис. 2б).

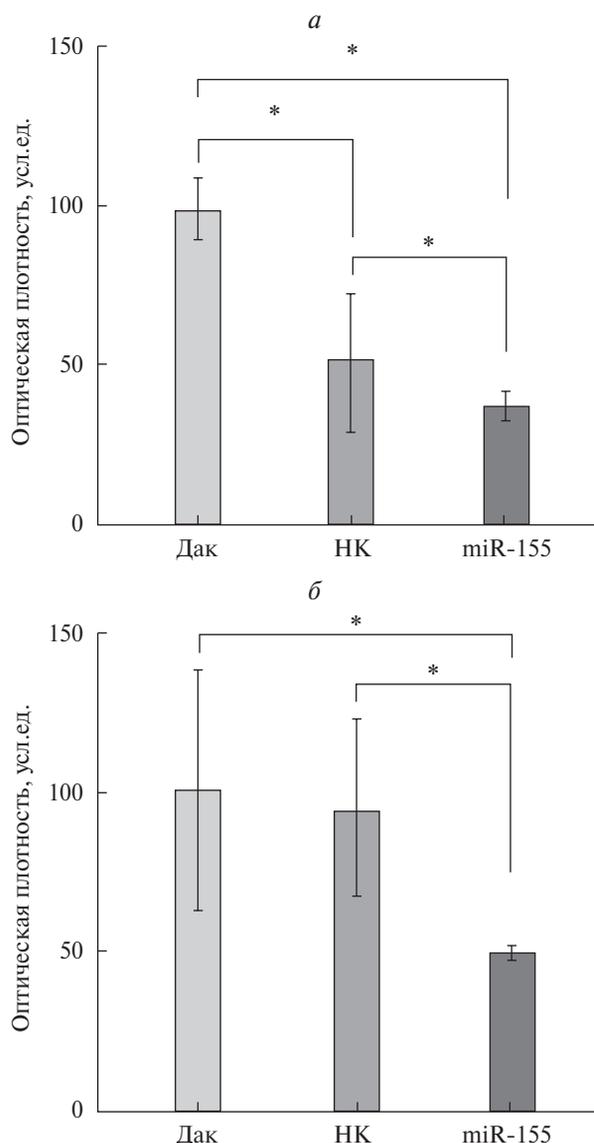
Стоит отметить, что уровень экспрессии *NFE2L2* после действия дакарбазина снижался



**Рис. 2.** Уровни экспрессии *NFE2L2*, кодирующего транскрипционный фактор NRF2, в клетках меланомы В16, подвергнутых воздействию ДМСО, дакарбазина, дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля, дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 в отсутствие  $H_2O_2$  (а) и после добавления 700 мкМ  $H_2O_2$  (б). (\*) —  $P=0.0495$  (критерий Краскелла–Уоллеса).

при индукции в клетках окислительного стресса, а дополнительная трансфекция миметика miR-155 не оказывала влияния на уровни экспрессии гена транскрипционного фактора NRF2 (см. рис. 2).

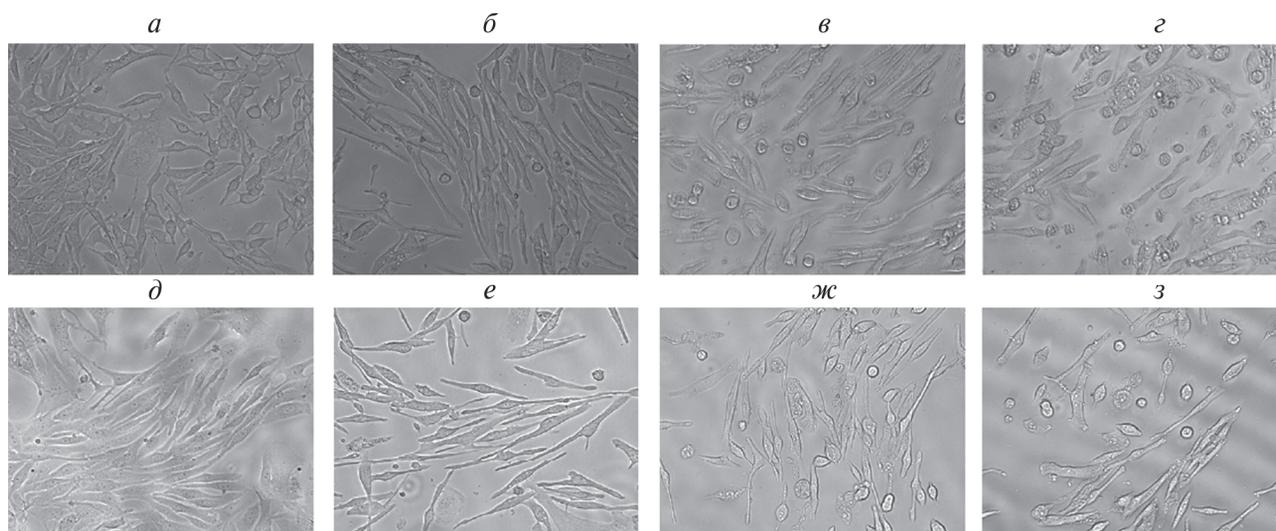
При оценке жизнеспособности клеток меланомы В16 вне зависимости от редокс-статуса, трансфекция миметика микроРНК вызывала снижение жизнеспособности клеток ( $P=0.0495$ ). По-



**Рис. 3.** Жизнеспособность клеток меланомы В16, подвергнутых воздействию ДМСО, дакарбазина, дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля, дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 в отсутствие  $H_2O_2$  (а) и после добавления 700 мкМ  $H_2O_2$  (б). Оценка оптической плотности продукта реакции в МТТ-тесте. (\*) —  $P=0.0495$  (критерий Краскелла–Уоллеса).

мимо этого, в условиях отсутствия окислительного стресса трансфекция негативного контроля также вызывала уменьшение жизнеспособности клеток ( $P=0.0495$ ). Этот эффект нивелировался индукцией окислительного стресса (рис. 3).

Визуально морфология клеток меланомы В16 изменялась после действия дакарбазина: клетки приобретали веретенообразную форму (рис. 4б, 4е), что может быть связано с транскриптомным перепрограммированием под действием дакарбазина и последующим изменением процессов меж-



**Рис. 4.** Культура клеток меланомы линии V16 после воздействия ДМСО (а), дакарбазина (б), дакарбазина с последующей трансфекцией негативного контроля (в), дакарбазина с последующей трансфекцией миметика микроРНК miR-155 (z) в условиях отсутствия (а–z) и после добавления 700 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в тех же группах (е–ж).

клеточной коммуникации (Esimbekova et al., 2023). Трансфекция антисмысловых олигонуклеотидов в дальнейшем не влияла на морфологию клеток (рис. 4в–z, 4ж–z).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Терапия злокачественных новообразований остается малоэффективной в отношении диссеминированных форм опухолей, что поддерживает актуальность исследования молекулярных механизмов их лекарственной устойчивости, поиска новых стратегий противоопухолевого воздействия.

Дакарбазин является химиотерапевтическим агентом, используемым в качестве базового средства для лечения меланомы кожи. Он представляет собой алкилирующий агент, индуцирующий повреждение ДНК и, как предполагалось, последующую остановку клеточного цикла с развитием апоптоза. К сожалению, эффективность дакарбазина незначительна, а механизмы низкой эффективности до сих пор остаются недостаточно понятными.

Вместе с тем известно, что химиотерапевтические средства индуцируют в опухолевых клетках окислительный стресс (Wang et al., 2021), что должно снижать их жизнеспособность. Безусловно, антиоксидантные системы клеток в таких условиях, выполняя цитопротекторную роль, способствуют выживаемости опухолевых клеток.

Целью представленной работы было miR-155-опосредованное снижение экспрессии редокс-чувствительного транскрипционного фактора NRF2 в клетках меланомы в условиях окислительного

стресса для оценки возможного антиканцерогенного действия miR-155.

Для этого в клетки меланомы, подвергнутые действию дакарбазина и сохранившие жизнеспособность (Esimbekova et al., 2023), трансфецировали миметик микроРНК miR-155. В дальнейшем клетки подвергали действию перекиси водорода, как было описано нами ранее (Komina et al., 2012), с последующим определением уровня miR-155, ее гена-мишени *NFE2L2*, кодирующего транскрипционный фактор NRF2, и оценкой жизнеспособности клеток.

Оверэкспрессию микроРНК miR-155 осуществляли в клетках меланомы посредством трансфекции миметика на основе олигонуклеотидов. Эффективность трансфекции оценивали по уровню miR-155. Только в клетках с трансфицированным миметиком miR-155 наблюдали повышение ее уровня, что говорит об успешной трансфекции олигонуклеотидов.

Помимо этого, в клетках с трансфецированным имитатором miR-155 отмечали снижение уровня ее гена-мишени *NFE2L2*. Это косвенно еще раз указывает на эффективность оверэкспрессии miR-155, подтверждает, что NRF2 является функциональной мишенью miR-155. Стоит отметить, что в клетках, подвергнутых воздействию только дакарбазином, уровень *NFE2L2* также снижался, хотя и не столь значительно. Данный факт может быть свидетельством способности дакарбазина модулировать уровни экспрессии *NFE2L2*.

Понижение уровня NRF2 в клетках с трансфецированным миметиком miR-155 соответствовало снижению жизнеспособности клеток меланомы.

Стоит отметить, что в данном случае трансфекцию миметика miR-155 осуществляли в клетки меланомы, сохранившие жизнеспособность после воздействия дакарбазином.

Как следует из наших предыдущих исследований, доля таких клеток составляла 50% (Lapkina et al., 2023). По всей видимости, miR-155-опосредованное снижение уровня NRF2 вызывает угнетение жизнеспособности дакарбазин-резистентных клеток меланомы.

Стоит отметить, что повышение уровня NRF2 при этом не происходило в условиях индукции окислительного стресса. Последнее также может указывать на выраженное супрессивное действие miR-155 в отношении NRF2.

Таким образом, в клетках меланомы NRF2 является функциональной мишенью микроРНК miR-155. miR-155, действуя каноническим путем, вероятнее всего, связывается с мРНК NRF2 в комплементарном участке 3'-нетранслируемой области, приводя к деградации последней, что и вызывает снижение соответствующего уровня экспрессии.

Сочетанное применение дакарбазина с миметиком miR-155 может вызывать NRF2-опосредованное снижение жизнеспособности клеток меланомы. Последнее может быть применено для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток, обусловленной повышением активности в них антиоксидантных систем.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00110; <https://rscf.ru/project/19-15-00110/>).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Лапкина Е.З., Есимбекова А.Р., Белениук В.Д., Савченко А.А., Рукша Т.Г. 2022. Распределение клеток меланомы В16 по фазам клеточного цикла под воздействием дакарбазина. Цитология. Т. 64. № 6.

- С. 573. (Lapkina E.Z., Esimbekova A.R., Beleniuk V.D., Savchenko A.A., Ruksha T.G. 2023. The distribution of B16 melanoma cells in cell-cycle phases under the influence of dacarbazine. *Cell Tiss. Biol.* V. 17. P. 161.)
- Aksenenko M.B., Palkina N.V., Sergeeva O.N., Sergeeva Yu.E., Kirichenko A.K., Ruksha T.G. 2019. miR-155 overexpression is followed by downregulation of its target gene, *NFE2L2*, and altered pattern of VEGFA expression in the liver of melanoma B16-bearing mice at the premetastatic stage. *Int. J. Exp. Pathol.* V. 100. P. 311.
- Aramouni K., Assaf R., Shaito A., Fardoun M., Al-Asmakh M., Sahebkar A., Eid A.H. 2023. Biochemical and cellular basis of oxidative stress: Implications for disease onset. *J. Cell Physiol.* V. 238. P. 1951. <https://doi.org/10.1002/jcp.31071>
- Bollong M.J., Lee G., Coukos J.S., Yun H., Zambaldo C., Chang J.W., Chin E.N., Ahmad I., Chatterjee A.K., Lairson L.L., Schultz P.G., Moellering R.E. 2018. A metabolite-derived protein modification integrates glycolysis with KEAP1-NRF2 signalling. *Nature.* V. 562. P. 600. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0622-0>
- Camiña N., Penning T.M. 2022. Genetic and epigenetic regulation of the NRF2-KEAP1 pathway in human lung cancer. *Br. J. Cancer.* V. 126. P. 1244. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01642-0>
- Cheung E.C., Vousden K.H. 2022. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat. Rev. Cancer.* V. 22. P. 280. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>
- DiSano J.A., Huffnagle I., Gowda R., Spiegelman V.S., Robertson G.P., Pameijer C.R. 2019. Loss of miR-155 upregulates WEE1 in metastatic melanoma. *Melanoma Res.* V. 29. P. 216. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000545>
- Esimbekova A.R., Palkina N.V., Zinchenko I.S., Belenyuk V.D., Savchenko A.A., Sergeeva E.Y., Ruksha T.G. 2023. Focal adhesion alterations in G0-positive melanoma cells. *Cancer Med.* V. 12. P. 7294. <https://doi.org/10.1002/cam4.5510>
- Fan Z., Wirth A.K., Chen D., Wruck C.J., Rauh M., Buchfelder M., Savaskan N. 2017. Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis. *Oncogenesis.* V. 6. P. 371. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.65>
- Feng Q., Xu X., Zhang S. 2023. Nrf2 protein in melanoma progression, as a new means of treatment. *Pigment Cell Melanoma Res.* <https://doi.org/10.1111/pcmr.13137>
- Han Y., Gao X., Wu N., Jin Y., Zhou H., Wang W., Liu H., Chu Y., Cao J., Jiang M., Yang S., Shi Y., Xie X., Chen F., Han Y., et al., 2022. Long noncoding RNA LINC00239 inhibits ferroptosis in colorectal cancer by binding to Keap1 to stabilize Nrf2. *Cell Death Dis.* V. 13. P. 742. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05192-y>
- Knaiko E.V., Castro C., Higgins M., Zhang Y., Honda T., Henderson C.J., Wolf C.R., Griffin J.L., Dinkova-Kostova A.T. 2021. Nrf2 activation does not affect adenoma development in a mouse model of colorectal cancer. *Commun. Biol.* V. 4. P. 1081. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02552-w>
- Komina A.V., Korostileva K.A., Gyrylova S.N., Belonogov R.N., Ruksha T.G. 2012. Interaction between single nucleotide polymorphism in catalase gene and catalase activity under

- the conditions of oxidative stress. *Physiol. Res.* V. 61. P. 655. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932333>
- Li H., Song J.B., Chen H.X., Wang Q.Q., Meng L.X., Li Y.* 2019. MiR-155 inhibits proliferation, invasion and migration of melanoma via targeting CBL. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* V. 23. P. 9525. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_201911\\_19447](https://doi.org/10.26355/eurev_201911_19447)
- Liu G., He L., Yang X., Tang L., Shi W., She J., Wei J.* 2023. MicroRNA-155-5p aggravates adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis through targeting Nrf2. *Nephron.* V. 147. P. 108. <https://doi.org/10.1159/000525233>
- Milkovic L., Zarkovic N., Saso L.* 2017. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.* V. 12. P. 727. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.013>
- Seddon A.R., Das A.B., Hampton M.B., Stevens A.J.* Site-specific decreases in DNA methylation in replicating cells following exposure to oxidative stress. *Hum. Mol. Genet.* 2023. V. 32. P. 632. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac232>
- Tossetta G., Marzioni D.* 2023. Targeting the NRF2/KEAP1 pathway in cervical and endometrial cancers. *Eur. J. Pharmacol.* V. 941. P. 175503. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175503>
- Wang J., Sun Y., Zhang X., Cai H., Zhang C., Qu H., Liu L., Zhang M., Fu J., Zhang J., Wang J., Zhang G.* 2021. Oxidative stress activates NORAD expression by H3K27ac and promotes oxaliplatin resistance in gastric cancer by enhancing autophagy flux via targeting the miR-433-3p. *Cell Death Dis.* V. 12. P. 90. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03368-y>
- Wu J., Minikes A.M., Gao M., Bian H., Li Y., Stockwell B.R., Chen Z.N., Jiang X.* 2019. Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2-YAP signalling. 2019. *Nature.* V. 572. P. 402. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1426-6>

## INHIBITION OF NRF2 TRANSCRIPTION FACTOR MEDIATED BY MIR-155 DIMINISHES MELANOMA CELL VIABILITY INDEPENDENTLY OF REDOX STATUS

V.A. Kutsenko<sup>a</sup>, D.A. Dashkova<sup>a</sup>, T.G. Ruksha<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022, Russia

\* E-mail: tatyana\_ruksha@mail.ru

Redox-sensitive NRF2 transcription factor is a target gene of microRNA miR-155. miR-155 mimic was transfected in dacarbazine-resistant melanoma cells. NRF2 expression levels were down-regulated in miR-155-overexpressed cells independently of oxidative stress induced by hydrogen peroxide. NRF2 suppression was associated with a decrease of melanoma cells viability. As a result, miR-155-mediated NRF2 overexpression that regulate intensity of a cell antioxidant processes can be associated with cancer cell survival leading to drug resistance. NRF2 repression by miR-155 highlighted a potential for NRF2 down-regulation as an approach in anticancer therapy.

**Keywords:** melanoma, B16, dacarbazine, miR-155, *NFE2L2*, ferroptosis, redox-status, oxidative stress

УДК 576.08:612.17

## АНАЛИЗ МЕДЛЕННОЙ ИНАКТИВАЦИИ КАНАЛОВ $Na_v1.5$ В РАЗВИТИИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ СЕРДЦА

© 2024 г. А. К. Зайцева<sup>1, 2, \*</sup>, К. И. Перепелина<sup>1, 3</sup>, А. А. Костарева<sup>1</sup><sup>1</sup> Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины» Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, 197341, Россия<sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223, Россия<sup>3</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

\*E-mail: zaytseva\_ak@almazovcentre.ru

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 27.06.2023 г.

Принята к публикации 24.08.2023 г

Потенциал-зависимые натриевые каналы сердца  $Na_v1.5$  ответственны за инициацию и распространение потенциала действия в кардиомиоцитах. Дисфункция  $Na_v1.5$  может быть обусловлена как патогенными вариантами в самом гене *SCN5A*, кодирующем  $Na_v1.5$ , так и генетическими вариантами в генах других белков, регулирующих его активность и транспорт. Смена различных фаз потенциала действия определяется строгой временной организацией активации и инактивации различных ионных каналов. На переходы между функциональными состояниями канала, в том числе на переход в состояние медленной инактивации, могут влиять разнообразие факторы и взаимодействующие с каналом белки. Хотя процесс медленной инактивации канала известен несколько десятилетий, его роль в механизме развития наследственной патологии сердца остается неясной. В нашей работе мы с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch clamp) в отведении от целой клетки (whole-cell) исследовали изменения процесса медленной инактивации  $Na_v1.5$  под влиянием различных мутаций в структурных генах (*DSP-N1684R*, *LMNA-R249Q*, *FLNC-R1267Q*, *FLNC-V2264M*), ассоциированных с генетически обусловленной патологией миокарда, приводящей к дисфункции кардиомиоцитов. Мы использовали модель кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (КМ-иПСК) и продемонстрировали усиление медленной инактивации каналов на модели КМ-иПСК, полученных от пациентов с фенотипом кардиомиопатии, совмещенной с желудочковыми аритмиями. Таким образом, представленная работа вносит вклад в понимание роли процесса медленной инактивации  $Na_v1.5$  в механизме развития патологии сердца.

**Ключевые слова:** DSP, FLNC, LMNA, канал  $Na_v1.5$ , гейтинг, медленная инактивация, наследственная аритмия

**Принятые сокращения:** иПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; КМ-иПСК — кардиомиоциты, дифференцированные из иПСК;  $Na_v1.5$  — потенциал-зависимый натриевый канал сердца.

**DOI:** 10.31857/S0041377124010052, **EDN:** IEDWYA

Порообразующая альфа-субъединица натриевого канала сердца  $Na_v1.5$  (кодируемая геном *SCN5A*) — это сложный трансмембранный белок, обеспечивающий быстрый вход ионов натрия в клетку в ходе фазы 0 потенциала действия кардиомиоцитов (Catterall, 1992). Он представляет собой псевдогетеротетрамер и состоит из цитоплазматического N-конца, четырех трансмембранных доменов (I–IV), соединенных между собой внутриклеточными петлями, и цитоплазматического C-конца. Каждый из гомологичных доменов I–IV состоит из шести сегментов (S1–S6), из которых S5 и S6 образуют пору канала, а сегмент S4 содержит несколько положительно заряженных

аминокислотных остатков и выполняет функцию сенсора напряжения (Sato et al., 1998).

Функционально активные каналы  $Na_v1.5$  локализованы в двух основных пулах плазматической мембраны кардиомиоцитов: в области вставочных дисков и в латеральной мембране (Shy et al., 2013). Макромолекулярные участники комплексов  $Na_v1.5$  в этих пулах различны, активность натриевых каналов находится под контролем различных белков-партнеров.

Нарушения активности ионных каналов могут быть как первичными, т.е. возникающими в результате аминокислотной замены в структуре  $Na_v1.5$ , либо вторичными, ассоциированными

с генетическими вариантами в генах, регулирующих экспрессию, транспорт или биофизические свойства каналов. Генетические варианты в гене *SCN5A* были идентифицированы у пациентов с различными формами наследственных аритмий: синдром удлиненного интервала QT, синдром Бругада, прогрессирующее замедление проводимости сердца, дилатационная кардиомиопатия и другие (Amin et al., 2010). Кроме того, дисфункция натриевых каналов миокарда может быть следствием генетических вариантов в других генах, кодирующих белки, которые входят в состав макромолекулярных комплексов  $Na_v1.5$  в области вставочных дисков и латеральной мембраны или регулируют экспрессию *SCN5A*, транспорт  $Na_v1.5$  на плазматическую мембрану и его интернализацию.

Так, дисфункция натриевых каналов была показана при мутациях в генах *LMNA*, *PKP2* и *DSP*, ассоциированных с генетически обусловленными формами кардиомиопатий (Gusev et al., 2020; Khudiakov et al., 2020; Perepelina et al., 2022). Таким образом, термин “натриевые каналопатии” может объединять гетерогенную группу заболеваний, в которую входят как аритмогенные синдромы без структурных изменений миокарда (синдром LQT, синдром Бругада, прогрессирующее замедление проводимости сердца, идиопатическая атриовентрикулярная блокада), так и структурная патология сердца, например различные формы кардиомиопатий.

Прогессирующее замедление проводимости, также известное как болезнь Лева–Ленегра, — редкое наследственное заболевание, ассоциированное с генами *SCN5A*, *DSP* и рядом других, которое характеризуется медленно и неуклонно прогрессирующим дегенеративным фиброзом волокон пучка Гиса (Amin et al., 2010).

Мышечная дистрофия Эмери–Дрейфуса — это редкое наследственное заболевание, чаще всего ассоциированное с генами *LMNA*, *EMD* и *FHL1* и характеризующееся дистрофическими изменениями в скелетной и сердечной мускулатуре, сопровождающееся развитием внутримиеокардиальных блокад (Emery, Dreifuss, 1966).

Ген *FLNC* также был изначально ассоциирован с нейромышечной патологией, но позже был описан в связи с развитием дилатационной, аритмогенной и рестриктивной кардиомиопатиями.

Ранее нами на модели КМ-иПСК было описано изменение функциональных характеристик натриевого тока у пациента с вариантом R249Q в гене *LMNA* (Perepelina et al., 2022), однако ста-

ционарная медленная инактивация потенциал-зависимых натриевых каналов не была исследована.

Воротный механизм (гейтинг) потенциал-зависимых натриевых каналов описывается с помощью совокупности процессов, которые являются отражением конформационных переходов  $Na_v$ -каналов между различными состояниями: закрытым, открытым, состояниями быстрой и медленной инактивации. Из активированного состояния канал может переходить в различные инактивированные состояния.

К настоящему времени наиболее хорошо изучено состояние быстрой инактивации, которая инициируется за счет работы сегмента IVS4, передающего сигнал на IFM-мотив во внутриклеточном линкере III–IV (Capes et al., 2013). Физиологическая роль IFM-мотива в процессе быстрой инактивации также подтверждена с помощью различных структурных исследований (Rohl et al., 1999; Yan et al., 2017). Механизм перехода  $Na_v1.5$  в состояние медленной инактивации, напротив, остается слабо изученным.

Исследования биофизических характеристик  $Na_v1.5$ , как правило, проводят на гетерологических системах экспрессии — клеточных линиях (HEK293, CHO) или ооцитах *Xenopus laevis*, трансфицированных векторной конструкцией, которая содержит ген *SCN5A* с исследуемым генетическим вариантом. Подобные системы временной сверхэкспрессии *SCN5A* позволяют изучать эффект отдельных аминокислотных замен на функциональную активность канала (Sendfeld et al., 2019).

Основным недостатком этих моделей является их неспособность воспроизводить сложную физиологию кардиомиоцитов, поскольку они не обладают структурно-морфологическими особенностями кардиомиоцитов и экспрессируют отличный набор генов, кодирующих ионные каналы. Кроме того, разнятся полученные результаты, зависящие от используемой экспрессионной системы.

Открытие репрограммирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) и их последующая дифференцировка в кардиомиоциты (КМ-иПСК) дали новые возможности для моделирования сердечно-сосудистых заболеваний. В КМ-иПСК присутствует большинство кардио-специфичных ионных каналов и вспомогательных белков, и в настоящее время эта модель демонстрирует наиболее выраженное сходство с КМ человека (Karakikes et al., 2015; Kodama et al., 2019). Поскольку КМ-иПСК могут быть получены непосредственно от пациента, они сохраняют его

генетический фон, включая потенциальные модификаторы, влияющие на фенотип (Nijak et al., 2021).

КМ-иПСК зарекомендовали себя как эффективная модель для исследования роли изменения биофизических характеристик различных ионных каналов в развитии наследственной патологии сердца (Craeto, Di Pasquale, 2018; Steele-Stallard et al., 2018; El-Battrawy et al., 2019; Giacomelli et al., 2020; Khudiakov et al., 2020; Kamga et al., 2021; Shah et al., 2021; Zhu et al., 2021). Однако большинство работ фокусируется на регистрации изменения плотности тока и не описывает изменение других электрофизиологических параметров каналов. Таким образом, ранее не был исследован процесс медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов на модели КМ-иПСК и его роль в развитии наследственной патологии сердца.

Цель нашей работы заключалась в характеристике изменения медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов на модели КМ-иПСК, полученных от пациентов с наследственными заболеваниями сердца и аритмогенными синдромами, ассоциированными с генетическими вариантами в генах *DSP*, *LMNA* и *FLNC*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Получение линий иПСК и их дифференцировка.** Линии иПСК были созданы и охарактеризованы, как описано ранее (Khudiakov et al., 2017; Rodina et al., 2021). Позднее иПСК были адаптированы к условиям культивирования без кормления на основе планшетов, покрытых реагентом Geltrex (Corning) и среды E8 (Thermo Scientific). иПСК пассировали с реагентом ReleSR (Stemcell Technologies). Ингибитор рок-киназы Y27632 (Tocris) добавляли в среду на 24 ч после посева.

Были получены и проанализированы экспериментальные данные для двух специфичных для каждого пациента линий иПСК. В качестве контроля для каждого пациента использовали две линии иПСК, полученные от здоровых доноров того же пола. Все линии иПСК были зарегистрированы в базе данных hPSCreg (<https://hpscereg.eu/>).

Дифференцировку иПСК в кардиомиоциты выполняли с использованием протокола модуляции сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин с помощью малых молекул (Burrige et al., 2014). Активные кардиомиоциты через 14 суток дифференцировки селектировали с помощью лактата в течение 3–5 суток, как описано ранее (Tohyama et al.,

2013). После метаболической очистки кардиомиоциты размножали в среде CMs (RPMI 1640, содержащей глутамакс, добавку B27, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США)).

Кардиомиоциты, полученные от пациентов с генетическими вариантами *DSP*-H1684R и *LMNA*-R249Q, и от условно здоровых доноров (донор 1 и донор 2 соответственно) дифференцировали в течение 25–30 суток и использовали для электрофизиологических экспериментов. Для экспериментов на КМ-иПСК, полученных от пациентов с генетическими вариантами в гене *FLNC* (*FLNC*-R1267Q и *FLNC*-V2264M) была необходима более высокая степень зрелости кардиомиоцитов, поэтому регистрацию параметров натриевых токов проводили на 45-е сутки дифференцировки.

КМ-иПСК, полученные от здорового донора (донор 3), были дифференцированы аналогично клеткам пациентов. Наличие филамина-С в используемой модели верифицировали с помощью методов иммуноцитохимии. Для электрофизиологических измерений кардиомиоциты подвергали как ферментативной, так и механической диссоциации с помощью реагента TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific), промывали средой CMs и пересевали на покровные стекла за 24–36 ч до эксперимента.

**Регистрация натриевых токов ( $I_{Na}$ ).** Процесс медленной инактивации каналов  $Na_v1.5$  изучали с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации целой клетки (whole-cell). Стеклообразные микроэлектроды изготавливали из боросиликатного стекла с помощью пуллера (P-1000, Sutter Instrument). Сопротивление электродов составляло 1.5–2.5 МОм. Последовательное сопротивление компенсировали на 75–80%.

Сбор данных осуществляли с использованием усилителя Axopatch 200B и программного обеспечения Clampfit версии 10.3 (Molecular devices, США). Токи регистрировали на частоте 20 кГц и подвергали низкочастотной фильтрации на частоте 5 кГц с использованием аналого-цифрового интерфейса (система сбора данных Digidata 1440A, Molecular devices, США).

Все измерения проводили при комнатной температуре. Внеклеточный раствор для регистрации  $I_{Na}$  содержал (мМ): 140 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7.4, CsOH). Внутриклеточный раствор содержал (мМ): 130 CsCl, 10 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.3, CsOH).

Измерения проводили при поддерживаемом потенциале  $-100$  мВ.

Репрезентативные записи натриевых токов были получены с использованием протокола с прямоугольным импульсом, варьирующим от  $-80$  до  $60$  мВ в течение  $40$  мс при частоте  $1$  Гц с шагом  $5$  мВ.

Для исследования кинетики развития медленной инактивации канала был выбран протокол стационарной медленной инактивации, в котором первый импульс длился  $10$  с и варьировал по потенциалу от  $-80$  до  $20$  мВ с последующей  $20$ -миллисекундной гиперполяризацией ( $-100$  мВ) и тестирующим импульсом  $-20$  мВ продолжительностью  $20$  мс.

Ранее было показано, что использование гиперполяризации в течение  $20$  мс является достаточным для восстановления каналов из состояния медленной инактивации (Itoh et al., 2005; Zaytseva et al., 2022). Сравнение проводили по доли медленно инактивированных каналов при различных потенциалах, как было описано.

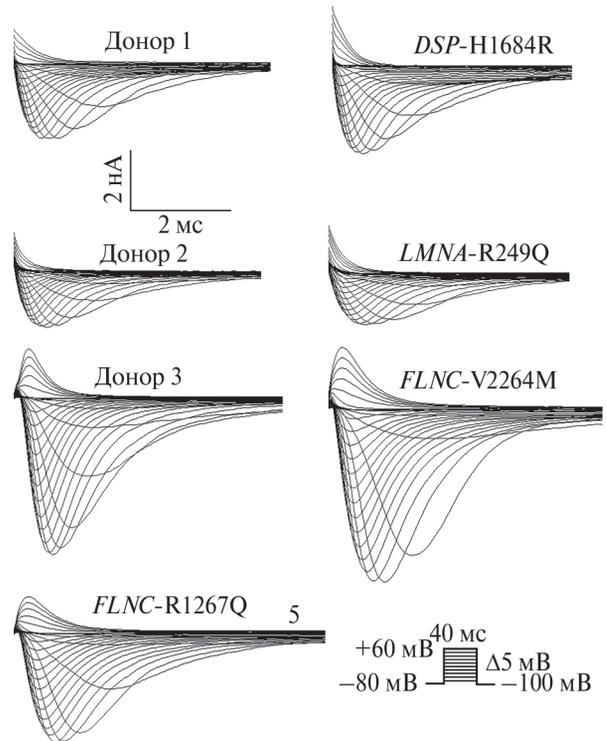
**Статистическая обработка.** Использовали программное обеспечение Graphpad Prism. С целью проверки нормальности распределения значений нормированного тока на разных потенциалах использовался тест Колмогорова–Смирнова. Ввиду того, что распределение внутри групп не соответствует нормальному, в качестве статистического теста использовался критерий Манна–Уитни.

Данные представлены как среднее арифметическое и его стандартная ошибка. Достоверно различающимися считались группы при  $p < 0.05$ . Для проведения множественных сравнений результаты попарного теста Манна–Уитни корректировали с помощью метода Бенджамина–Хохберга, как было описано ранее (Khudiakov et al., 2020).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетках всех представленных линий КМ-иПСК, полученных от пациентов и здоровых доноров, регистрировали типичный натриевый ток (рис. 1).

Ранее нами был описан новый генетический вариант H1684R в гене десмоплакина (*DSP*), ассоциированный с прогрессирующим замедлением проводимости и желудочковыми нарушениями сердечного ритма (Gusev et al., 2020). Было показано, что вариант DSP-H1684R ассоциирован с изменением плотности различных токов, однако процесс инактивации  $I_{Na}$  не был детально изучен.

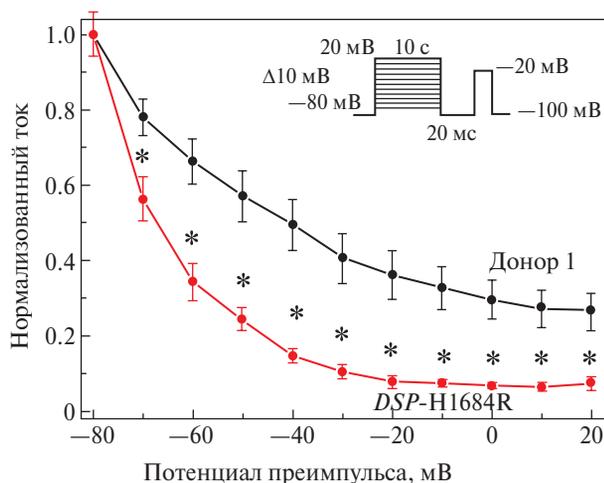


**Рис. 1.** Репрезентативные записи натриевых токов, зарегистрированные в клетках модели КМ-иПСК, полученных от пациентов с наследственной патологией сердца и здоровых доноров (доноры 1, 2, 3). Все представленные линии генерировали  $I_{Na}$  типичной морфологии.

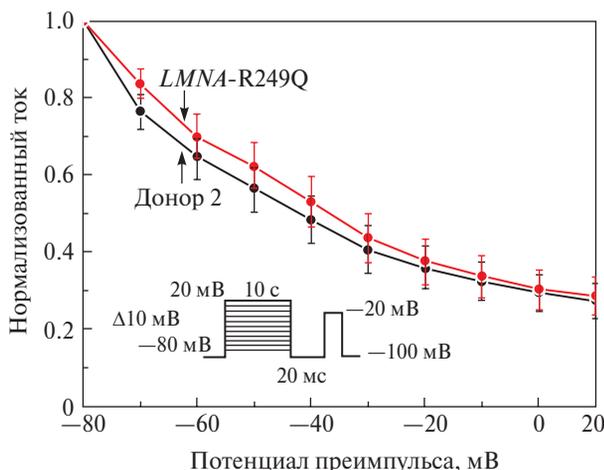
В данной работе мы анализировали влияние этого генетического варианта на стационарную медленную инактивацию  $Na_v1.5$ . Мы показали усиление медленной инактивации в кардиомиоцитах, полученных из клеток пациента с прогрессирующим замедлением проводимости, относительно значений, полученных у здорового донора (донор 1, рис. 2).

Кроме того, ранее нами был идентифицирован генетический вариант R249Q в гене *LMNA* у пациента с дистрофией Эмери–Дрейфуса, сопровождавшейся пароксизмальной фибрилляцией предсердий и атриовентрикулярной блокадой без признаков желудочковых аритмий, была получена и охарактеризована линия иПСК FAMRCi007-A (Perrepelina et al., 2020).

Генетический вариант R249Q ранее был описан как патогенный, ассоциированный с сердечно-сосудистой дисфункцией (Raffaele Di Barletta et al., 2000). Ранее мы показали, что *LMNA*-R249Q приводит к снижению активности  $Na_v1.5$  и изменению экспрессии различных генов, кодирующих белки, регулирующие активность данного канала (Perrepelina et al., 2022). В настоящей работе

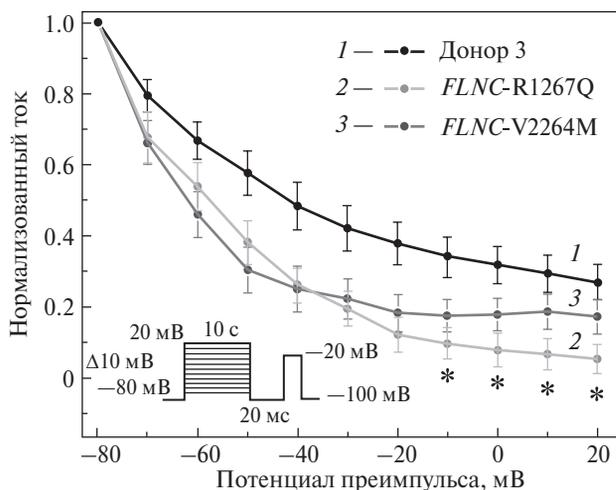


**Рис. 2.** Усиление стационарной медленной инактивации на модели КМ-иПСК пациента с прогрессирующим нарушением сердечной проводимости и выраженными желудочковыми нарушениями ритма (DSP-H1684R, нижняя кривая,  $n=5$ ) по сравнению с данными, полученными на кардиомиоцитах от здорового донора (верхняя кривая,  $n=9$ ). \* — различия достоверны при  $p < 0.05$  (критерий Манна–Уитни). Здесь и на рис. 3, 4 показаны средние значения и их стандартные ошибки.



**Рис. 3.** Медленная инактивация  $Na_v1.5$  в КМ-иПСК, полученных от пациентов с дистрофией Эмери–Дрейфуса (мутация *LMNA-R249Q*, верхняя кривая,  $n=9$ ), и в клетках, полученных от здорового донора (нижняя кривая,  $n=12$ ). Не выявлено изменений кинетики стационарной медленной инактивации при потенциалах от  $-80$  до  $20$  мВ (критерий Манна–Уитни).

мы проанализировали влияние *LMNA-R249Q* на процесс медленной инактивации и показали, что медленная инактивация  $Na_v1.5$  не изменялась в КМ-иПСК пациента с дистрофией Эмери–Дрейфуса на фоне *LMNA-R249Q* относительно значений, полученных для здорового донора (донор 2, рис. 3). Таким образом, процесс медленной инактивации каналов  $Na_v1.5$  не вносит вклада в



**Рис. 4.** Кинетика стационарной медленной инактивации  $Na_v1.5$  в кардиомиоцитах пациента с мутацией R1267Q в гене *FLNC*, мутацией V2264M в гене *FLNC* и в клетках здорового донора. Мутация R1267Q, ассоциированная со смешанным фенотипом (аритмогенной кардиомиопатией с выраженными желудочковыми аритмиями) значительно изменяла долю медленно инактивированных каналов ( $n=6$ ) по сравнению с характеристиками тока, зарегистрированными в клетках здорового донора ( $n=12$ ) при потенциалах от  $-10$  до  $20$  мВ. Мутация V2264M в гене *FLNC*, ассоциированная со смешанным фенотипом (рестриктивной кардиомиопатией, атриовентрикулярной блокадой и желудочковой тахикардией), не изменяла долю медленно инактивированных каналов ( $n=7$ ) относительно клеток здорового донора. \* — отличия значений нормированного тока относительно здоровых доноров достоверны при  $p < 0.05$  после коррекции (критерий Манна–Уитни с последующей коррекцией на множественные сравнения с помощью метода Бенжамина–Хохберга).

развитие сердечно-сосудистого фенотипа, обусловленного генетическим вариантом *LMNA-R249Q*.

Исследование роли медленной инактивации каналов в развитии фенотипов кардиомиопатий проводили на моделях иПСК, несущих варианты R1267Q и V2264M в гене *FLNC*. Генетический вариант R1267Q, локализованный в 11-м иммуноглобулино-подобном домене, был обнаружен у пациента дилатационной формой кардиомиопатии и желудочковыми нарушениями ритма. Нами показано усиление медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов в КМ-иПСК, полученных от пациента с генетическим вариантом R1267Q относительно значений здорового донора (рис. 4, донор 3). Таким образом, этот вариант может оказывать влияние на процесс медленной инактивации  $Na_v1.5$  и тем самым вносить вклад в развитие аритмогенного фенотипа, в частности желудочковых нарушений ритма.

Вариант V2264M в гене *FLNC*, идентифицированный у пациента с рестриктивной кардиомиопатией и врожденным пороком сердца (Muravyev et al., 2022), локализован в 20-м иммуноглобулиноподобном домене. Медленная инактивация Na<sub>v</sub>1.5 не изменялась в кардиомиоцитах, полученных от пациентов с этим генетическим вариантом, по сравнению со значениями для контрольных линий, полученных от здорового донора (см. рис. 4, донор 3).

Исходя из полученных данных, можно сделать выводы о том, что нарушение процесса медленной инактивации натриевых каналов не ассоциировано с развитием рестриктивной кардиомиопатии в данной экспериментальной модели, а нарушение процесса медленной инактивации может зависеть от локализации аминокислотной замены в филламин-С.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевыми характеристиками функциональной активности потенциал-зависимых натриевых каналов являются особенности его воротного механизма (гейтинга). Для эукариотических организмов характерно два основных механизма инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов.

Быстрая инактивация развивается в течение 1–5 мс (Hodgkin, Huxley, 1952a, 1952b, 1952c), в то время как для перехода в состояние медленной инактивации необходима длительная деполяризация длительностью от десятых долей секунды до десятков секунд (Adelman, Palti, 1969; Palti, Adelman, 1969; Rudy, 1975, 1981). Аминокислотные остатки в селективном фильтре и окружающие сегменты S5 и S6 участвуют в конформационных изменениях, сопровождающих медленную инактивацию (Balsler et al., 1996; Bénitah et al., 1996, 1997; Vilin, Ruben, 2001). Таким образом, медленную инактивацию часто рассматривают как результат конформационного изменения структуры поры потенциал-зависимых натриевых каналов (Payandeh et al., 2012; Zhang et al., 2012).

В норме только 40% каналов Na<sub>v</sub>1.5 переходят в состояние медленной инактивации, в отличие от 80% потенциал-зависимых натриевых каналов Na<sub>v</sub>1.4 в скелетной мускулатуре. Предполагается, что такая особенность Na<sub>v</sub>1.5 является адаптацией к постоянным деполяризующим импульсам, возникающим в миокарде (Richmond et al., 1998). Таким образом, усиление процесса медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых

каналов, зарегистрированное в КМ-иПСК пациентов с желудочковыми нарушениями ритма, потенциально может влиять на адаптивные свойства натриевых каналов и способствовать возникновению аритмогенных очагов.

Изменения медленной инактивации Na<sub>v</sub>1.5 описаны для некоторых генетических вариантов в гене *SCN5A*, идентифицированных у пациентов с различными наследственными формами желудочковых аритмий. Например, для мутаций N406S (IS6) (Itoh et al., 2007), G752R (IIS2) (Hoogendijk et al., 2010) и S1710L (IVS5-S6) (Akai et al., 2000), ассоциированных с синдромом Бругада, также сопровождаемым желудочковыми тахикардиями, характерно замедление активации в сочетании с усиленной медленной инактивацией. В то время как при мутации G298S (IS5-S6) наблюдается снижение плотности тока и усиление медленной инактивации в отсутствие изменений других биофизических характеристик (Wang et al., 2002).

Усиление как быстрой, так и медленной инактивации каналов было продемонстрировано для мутации N1541D (IVS1) (Dharmawan et al., 2019). Встречаются и более сложные варианты сочетания изменений медленной инактивации и других биофизических характеристик Na<sub>v</sub>1.5. Так, генетический вариант Y739D (IIS1-S2), ассоциированный с синдромом Бругада, приводит к снижению плотности тока, усилению быстрой и медленной инактивации и замедлению активации каналов (Zaytseva et al., 2022), в то время как генетический вариант A1294G (IIS3-S4), ассоциированный с развитием смешанной клинической картины, приводит к ускорению активации, ускорению быстрой и медленной инактивации и замедлению восстановления инактивированного состояния каналов (Zaytseva et al., 2019). Таким образом, в настоящее время есть свидетельства усиления медленной инактивации при желудочковых нарушениях ритма.

Следует отметить, что большинство работ, посвященных изучению влияния генетических вариантов, ассоциированных с наследственными аритмиями, на процесс медленной инактивации Na<sub>v</sub>1.5, выполнено на моделях гетерологической системы экспрессии (Зайцева и др., 2018). Несмотря на очевидные преимущества, данная модель не позволяет оценить влияние генетического фона пациента и неудобна для исследования влияния генетических вариантов, идентифицированных в генах, кодирующих белки, участвующие в регуляции каналов Na<sub>v</sub>1.5.

В настоящее время наиболее актуальные подходы к сердечно-сосудистым исследованиям основаны на использовании кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (КМ-иПСК). Изучение активности ионных каналов на модели КМ-иПСК позволяют оценить биофизические свойства натриевых каналов в их нативном тканеспецифическом окружении с учетом генетического фона пациента.

КМ-иПСК активно используются для изучения ассоциированных с кардиомиопатиями изменений активности ионных каналов (Craeto, Di Pasquale, 2018; Steele-Stallard et al., 2018; Giacomelli et al., 2020; Shah et al., 2021). Однако в этих исследованиях авторы, как правило, ограничиваются изменениями плотности тока и не пытаются рассмотреть более детальные механизмы активности натриевых каналов. Так, на модели КМ-иПСК было показано уменьшение плотности тока в клетках пациентов с аритмогенной кардиомиопатией (Khudiakov et al., 2020), с дилатационной кардиомиопатией и прогрессирующим нарушением сердечной проводимости (Kamga et al., 2021) и в клетках пациентов с синдромом Бругада (El-Battrawy et al., 2019; Zhu et al., 2021), а также замедление активации при миотонической дистрофии 1 типа (Poulin et al., 2021).

Актуальность данной работы во многом определяется тем, что в настоящее время большая часть данных, полученных на модели КМ-иПСК, фокусируется на описании изменений плотности натриевого тока и уровня экспрессии *SCN5A*, в то время как изучение других электрофизиологических характеристик натриевых каналов остается вне фокуса подавляющего числа исследований.

Мы продемонстрировали, что у пациентов с генетически обусловленными кардиомиопатиями, сопровождающимися желудочковыми аритмиями, ассоциированными с генетическими вариантами в генах *DSP* и *FLNC*, наблюдается усиление стационарной медленной инактивации. Это соотносится с данными литературы об изменениях медленной инактивации, обусловленных генетическими вариантами в гене *SCN5A*, ассоциированных с развитием желудочковых нарушений ритма. Например, при мутации T512I в гене *SCN5A* обнаружено изменение кинетики активации и инактивации и усиление медленной инактивации  $Na_v1.5$  (Yang et al., 2002), а генетический вариант G1712S сопровождался спектром биофизических изменений, в том числе нарушением медленной инактивации  $Na_v1.5$  (Sanner et al., 2021).

Таким образом, пока информации о роли процесса медленной инактивации  $Na_v1.5$  в развитии наследственных кардиомиопатий и аритмий недостаточно. Мы показали, что процесс медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов сердца может быть усилен в клетках пациентов с желудочковыми нарушениями ритма, вызванными генетическими вариантами в различных генах, регулирующих активность каналов  $Na_v1.5$  (*FLNC* и *DSP*).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 20-34-90142).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова и проводилось согласно надлежущей клинической практике и этическим стандартам Хельсинкской декларации. Все респонденты подписали информированное согласие на проведение необходимых методов обследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии потенциально-го конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зайцева А.К., Карпушев А.В., Жоров Б.С. и Костарева А.А. 2019. Биофизические механизмы натриевых каналов в миокарде: синдром удлиненного интервала QT. Российский физиол. ж. им. И.М. Сеченова. Т. 105. № 1. С. 3. (Zaytseva A.K., Karpushev A.V., Zhorov B.S., Kostareva A.A. 2019. Biophysical mechanisms of sodium channelopathies in myocardium: long QT syndrome and Brugada syndrome. Russian J. Physiol. V. 105. № 1. P. 3.)
- Adelman W.J., Jr., Palti Y. 1969. The effects of external potassium and long duration voltage conditioning on the amplitude of sodium currents in the giant axon of the squid, *Loligo pealei*. J. Gen. Physiol. V. 54. P. 589. <https://doi.org/10.1085/jgp.54.5.589>
- Akai J., Makita N., Sakurada H., Shirai N., Ueda K., Kitabatake A., Nakazawa K., Kimura A., Hiraoka M. 2000. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. FEBS Lett. V. 479. P. 29.

- Amin A.S., Asghari-Roodsari A, Tan H.L. 2010. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch.* V. 460. P. 223. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0761-0>
- Balser J.R., Nuss H.B., Chiamvimonvat N., Pérez-García M.T., Marban E., Tomaselli G.F. 1996. External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J. Physiol.* V. 494. P. 431.
- Bénitah J.P., Ranjan R., Yamagishi T., Janecki M., Tomaselli G.F., Marban E. 1997. Molecular motions within the pore of voltage-dependent sodium channels. *Biophys. J.* V. 73. P. 603.
- Bénitah J.P., Tomaselli G.F. and Marban E. 1996. Adjacent pore-lining residues within sodium channels identified by paired cysteine mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93. P. 7392.
- Burridge P.W., Matsa E., Shukla P., Lin Z.C., Churko J.M., Ebert A.D., Lan F., Diecke S., Huber B., Mordwinkin N.M., Plews J.R., Abilez O.J., Cui B., Gold J.D., Wu J.C. 2014. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods.* V. 11. P. 855. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2999>
- Capes D.L., Goldschen-Ohm M.P., Arcisio-Miranda M., Bezanilla F. and Chanda B. 2013. Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. *J. Gen. Physiol.* V. 142. P. 101.
- Crasto S., Di Pasquale E. 2018. Induced Pluripotent Stem Cells to Study Mechanisms of Laminopathies: Focus on Epigenetics. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 6. P. 172. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00172>
- Dharmawan T., Nakajima T., Iizuka T., Tamura S., Matsui H., Kaneko Y., Kurabayashi M. 2019. Enhanced closed-state inactivation of mutant cardiac sodium channels (SCN5A N1541D and R1632C) through different mechanisms. *J. Mol. Cell Cardiol.* V. 130. P. 88. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.03.023>
- El-Battrawy I., Müller J., Zhao Z., Cyganek L., Zhong R., Zhang F., Kleinsorge M., Lan H., Li X., Xu Q., Huang M., Liao Z., Moscu-Gregor A., Albers S., Dinkel H., et al. 2019. Studying Brugada Syndrome with an SCN1B variants in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 7. P. 261. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00261>
- Emery A.E., Dreifuss F.E. 1966. Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* V. 29. P. 338. <https://doi.org/10.1136/jnnp.29.4.338>
- Giacomelli E., Meraviglia V., Camprostrini G., Cochrane A., Cao X., van Helden R.W.J., Krotenberg Garcia A., Mircea M., Kostidis S., Davis R.P., van Meer B.J., Jost C.R., Koster A.J., Mei H., Míguez D.G., et al. 2020. Human-iPSC-derived cardiac stromal cells enhance maturation in 3D cardiac microtissues and reveal non-cardiomyocyte contributions to heart disease. *Cell Stem Cell.* V. 26. P. 862. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.05.004>
- Gusev K., Khudiakov A., Zaytseva A., Perepelina K., Makeenok S., Kaznacheyeva E. and Kostareva A. 2020. Impact of the DSP-H1684R genetic variant on ion channels activity in ipsc-derived cardiomyocytes. *Cell Physiol. Biochem.* V. 54. P. 696. <https://doi.org/10.33594/000000249>
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. 1952a. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* V. 116. P. 449. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004717>
- Hodgkin A.L., and Huxley A.F. 1952b. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* V. 116. P. 497.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. 1952c. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* V. 117. P. 500. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Hoogendijk M.G., Potse M., Linnenbank A.C., Verkerk A.O., den Ruijter H.M., van Amersfoort S.C., Klaver E.C., Beekman L., Bezzina C.R., Postema P.G., Tan H.L., Reimer A.G., van der Wal A.C., Ten Harkel A.D., Dalinghaus M., et al. 2010. Mechanism of right precordial ST-segment elevation in structural heart disease: excitation failure by current-to-load mismatch. *Heart Rhythm.* V. 7. P. 238. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.10.007>
- Itoh H., Shimizu M., Takata S., Mabuchi H. and Imoto K. 2005. A novel missense mutation in the *SCN5A* gene associated with Brugada syndrome bidirectionally affecting blocking actions of antiarrhythmic drugs. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* V. 16. P. 486.
- Itoh H., Tsuji K., Sakaguchi T., Nagaoka I., Oka Y., Nakazawa Y., Yao T., Jo H., Ashihara T., Ito M., Horie M., Imoto K. 2007. A paradoxical effect of lidocaine for the N406S mutation of *SCN5A* associated with Brugada syndrome. *Int. J. Cardiol.* V. 121. P. 239. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.02.007>
- Kamga M.V.K., Reppel M., Hescheler J., Nguemo F. 2021. Modeling genetic cardiac channelopathies using induced pluripotent stem cells — *status quo* from an electrophysiological perspective. *Biochem. Pharmacol.* V. 192. P. 114746. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114746>
- Karakikes I., Ameen M., Termglinchan V., Wu J.C. 2015. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ. Res.* V. 117. P. 80. <https://doi.org/10.1161/circresaha.117.305365>
- Khudiakov A., Kostina D., Zlotina A., Yany N., Sergushichev A., Pervunina T., Tomilin A., Kostareva A., Malashicheva A. 2017. Generation of iPSC line from patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy carrying mutations in *PKP2* gene. *Stem Cell Res.* V. 24. P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.08.014>
- Khudiakov A., Zaytseva A., Perepelina K., Smolina N., Pervunina T., Vasichkina E., Karpushev A., Tomilin A., Malashicheva A., Kostareva A. 2020. Sodium current abnormalities and deregulation of Wnt/β-catenin signaling in iPSC-derived cardiomyocytes generated from patient with arrhythmogenic cardiomyopathy harboring compound genetic variants in plakophilin 2 gene. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* V. 1866. P. 165915. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165915>
- Kodama M., Furutani K., Kimura R., Ando T., Sakamoto K., Nagamori S., Ashihara T., Kurachi Y., Sekino Y., Furukawa T., Kanda Y., Kurokawa J. 2019. Systematic

- expression analysis of genes related to generation of action potentials in human iPSC cell-derived cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Sci.* V. 140. P. 325. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.06.006>
- Nijak A., Saenen J., Labro A.J., Schepers D., Loeys B.L., Alaerts M.* 2021. iPSC-cardiomyocyte models of brugada syndrome-achievements, challenges and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 2825. <https://doi.org/10.3390/ijms22062825>
- Muravyev A., Vershinina T., Tesner P., Sjoberg G., Fomicheva Y., Čajbiková N.N., Kozyreva A., Zhuk S., Mamaeva E., Tarnovskaya S., Jornholt J., Sokolnikova P., Pervunina T., Vasichkina E., Sejersen T., et al.* 2022. Rare clinical phenotype of filaminopathy presenting as restrictive cardiomyopathy and myopathy in childhood. *Orphanet J. Rare Dis.* V. 17. P. 358. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02477-5>
- Palti Y., Adelman W.J., Jr.* 1969. Measurement of axonal membrane conductances and capacity by means of a varying potential control voltage clamp. *J. Membr. Biol.* V. 1. P. 431. <https://doi.org/10.1007/bf01869791>
- Payandeh J., Gamal El-Din T.M., Scheuer T., Zheng N. and Catterall W.A.* 2012. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature.* V. 486. P. 135.
- Perepelina K., Kostina A., Klauzen P., Khudiakov A., Rabino M., Crasto S., Zlotina A., Fomicheva Y., Sergushichev A., Oganessian M., Dmitriev A., Kostareva A., Di Pasquale E., Malashicheva A.* 2020. Generation of two iPSC lines (FAMRCi007-A and FAMRCi007-B) from patient with Emery-Dreifuss muscular dystrophy and heart rhythm abnormalities carrying genetic variant LMNA p.Arg249Gln. *Stem Cell Res.* V. 47. P. 101895. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101895>
- Perepelina K., Zaytseva A., Khudiakov A., Neganova I., Vasichkina E., Malashicheva A. and Kostareva A.* 2022. LMNA mutation leads to cardiac sodium channel dysfunction in the Emery-Dreifuss muscular dystrophy patient. *Front. Cardiovasc. Med.* V. 9. P. 932956. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.932956>
- Poulin H., Mercier A., Djemai M., Pouliot V., Deschenes I., Boujtir M., Puymirat J., Chahine M.* 2021. iPSC-derived cardiomyocytes from patients with myotonic dystrophy type 1 have abnormal ion channel functions and slower conduction velocities. *Sci Rep.* V. 11. P. 2500. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82007-8>
- Raffaele Di Barletta M., Ricci E., Galluzzi G., Tonali P., Mora M., Morandi L., Romorini A., Voit T., Orstavik K.H., Merlini L., Trevisan C., Biancalana V., Housmanowa-Petrusewicz I., Bione S., Ricotti R., et al.* 2000. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* V. 66. P. 1407. <https://doi.org/10.1086/302869>
- Richmond J.E., Featherstone D.E., Hartmann H.A., Ruben P.C.* 1998. Slow inactivation in
- with familial progressive cardiac conduction disorder carrying genetic variant FLNC p.Val2264Met. *Stem Cell Res.* V. 59. P. 102640. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102640>
- Rohl C.A., Boeckman F.A., Baker C., Scheuer T., Catterall W.A., Klevit R.E.* 1999. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry.* V. 38. P. 855. <https://doi.org/10.1021/bi9823380>
- Rudy B.* 1975. Proceedings: slow recovery of the inactivation of sodium conductance in *Myxicola* giant axons. *J. Physiol.* V. 249. P. 22.
- Rudy B.* 1981. Inactivation in *Myxicola* giant axons responsible for slow and accumulative adaptation phenomena. *J. Physiol.* V. 312. P. 531.
- Sanner K., Mueller-Leisse J., Zormpas C., Duncker D., Leffler A. and Veltmann C.* 2021. A Novel SCN5A Variant causes temperature-sensitive loss of function in a family with symptomatic Brugada syndrome, cardiac conduction disease, and sick sinus syndrome. *Cardiol.* V. 146. P. 754. <https://doi.org/10.1159/000518210>
- Sato C., Sato M., Iwasaki A., Doi T. and Engel A.* 1998. The sodium channel has four domains surrounding a central pore. *J. Struct. Biol.* V. 121. P. 314.
- Sendfeld F., Selga E., Scornik F.S., Pérez G.J., Mills N.L., Brugada R.* 2019. Experimental models of Brugada syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 2123. <https://doi.org/10.3390/ijms20092123>
- Shah P.P., Lv W., Rhoades J.H., Poleshko A., Abbey D., Caporizzo M.A., Linares-Saldana R., Heffler J.G., Sayed N., Thomas D., Wang Q., Stanton L.J., Bedi K., Morley M.P., Cappola T.P., et al.* 2021. Pathogenic LMNA variants disrupt cardiac lamina-chromatin interactions and de-repress alternative fate genes. *Cell Stem Cell.* V. 28. P. 938. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.12.016>
- Shy D., Gillet L., Abriel H.* 2013. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1833. P. 886. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.026>
- Steele-Stallard H.B., Pinton L., Sarcar S., Ozdemir T., Maffioletti S.M., Zammit P.S., Tedesco F.S.* 2018. Modeling Skeletal muscle laminopathies using human induced pluripotent stem cells carrying pathogenic LMNA mutations. *Front. Physiol.* V. 9. P. 1332. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01332>
- Tohyama S., Hattori F., Sano M., Hishiki T., Nagahata Y., Matsuura T., Hashimoto H., Suzuki T., Yamashita H., Satoh Y., Egashira T., Seki T., Muraoka N., Yamakawa H., Ohgino Y., et al.* 2013. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell.* V. 12. P. 127. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.013>
- Vilin Y.Y., Ruben P.C.* 2001. Slow inactivation in voltage-gated sodium channels: molecular substrates and contributions to channelopathies. *Cell Biochem. Biophys.* V. 35. P. 171. <https://doi.org/10.1385/cbb:35:2:171>
- Wang D.W., Viswanathan P.C., Balsler J.R., George A.L., Jr. and Benson D.W.* 2002. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with

- atrioventricular conduction block. *Circulation*. V. 105. P. 341.
- Yan Z., Zhou Q., Wang L., Wu J., Zhao Y., Huang G., Peng W., Shen H., Lei J. and Yan N. 2017. Structure of the Na(v)1.4-β1 Complex from Electric Eel. *Cell*. V. 170. P. 470.
- Yang P., Kanki H., Drolet B., Yang T., Wei J., Viswanathan P.C., Hohnloser S.H., Shimizu W., Schwartz P.J., Stanton M., Murray K.T., Norris K., George A.L., Jr., Roden D.M. 2002. Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation*. V. 105. P. 1943. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000014448.19052.4c>
- Zaytseva A.K., Karpushev A.V., Kiselev A.M., Mikhaylov E.N., Lebedev D.S., Zhorov B.S., Kostareva A.A. 2019. Characterization of a novel SCN5A genetic variant A1294G associated with mixed clinical phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 516. P. 777.
- Zaytseva A.K., Kiselev A.M., Boitsov A.S., Fomicheva Y.V., Pavlov G.S., Zhorov B.S., Kostareva A.A. 2022. Characterization of the novel heterozygous SCN5A genetic variant Y739D associated with Brugada syndrome. *Biochem. Biophys. Rep.* V. 30. P. 101249. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101249>
- Zhang X., Ren W., DeCaen P., Yan C., Tao X., Tang L., Wang J., Hasegawa K., Kumasaka T., He J., Wang J., Clapham D.E., Yan N. 2012. Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature*. V. 486. P. 130.
- Zhu Y., Wang L., Cui C., Qin H., Chen H., Chen S., Lin Y., Cheng H., Jiang X., Chen M. 2021. Pathogenesis and drug response of iPSC-derived cardiomyocytes from two Brugada syndrome patients with different Na (v)1.5-subunit mutations. *J. Biomed. Res.* V. 35. P. 395. <https://doi.org/10.7555/jbr.35.20210045>

## ANALYSIS OF THE ROLE OF NAV1.5 SLOW INACTIVATION IN THE DEVELOPMENT OF INHERITED CARDIAC PATHOLOGY

K. Zaytseva<sup>a, b, \*</sup>, K. I. Perepelina<sup>a, c</sup>, A. A. Kostareva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> World-Class Research Centre for personalized medicine, Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, 197341, Russia

<sup>b</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg 194223, Russia

<sup>c</sup> Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 194064, Russia

\* E-mail: zaytseva\_ak@almazovcentre.ru

Voltage-gated cardiac sodium channels Na<sub>v</sub>1.5 are responsible for the initiation and propagation of action potentials in cardiomyocytes. Dysfunction of Na<sub>v</sub>1.5 can be caused both by pathogenic variants in the *SCN5A* gene itself, which encodes Na<sub>v</sub>1.5, and by genetic variants in the genes of other proteins, regulating channel activity and trafficking. The change of different phases of the action potential is determined by the strict temporal organization of activation and inactivation of various ion channels. Transitions between channel functional states (for example, to slow inactivated state) can be influenced by various factors and proteins interacting with the channel. Despite the fact that the process of slow inactivation of the channel has been known for several decades, its role in the mechanism of development of hereditary heart pathology remains unclear. In this work, using the patch clamp method in whole-cell leads, we studied changes in the process of slow Nav1.5 inactivation under the influence of various mutations in structural genes (*DSP*-H1684R, *LMNA*-R249Q, *FLNC*-R1267Q, *FLNC*-V2264M) associated with a genetically determined myocardial pathology leading to dysfunction of cardiomyocytes. The study used a model of cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (CM-iPSCs). We have demonstrated an increase in slow inactivation in the model of CM-iPSCs obtained from patients with a phenotype of cardiomyopathy combined with ventricular arrhythmias. Thus, this work contributes to understanding the role of the slow inactivation process in the mechanism of the development of heart pathology.

**Keywords:** *DSP*, *FLNC*, gating, inherited arrhythmia, *LMNA*, Na<sub>v</sub>1.5, slow inactivation

УДК 576.3: 576.08:616-006

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ pRb И бета-КАТЕНИНА В ОПУХОЛЕВОЙ И НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. В. М. Рябов<sup>1</sup>, Н. И. Тяпкин<sup>2</sup>, А. П. Родимцев<sup>1</sup>, О. Г. Люблинская<sup>1</sup>,  
И. В. Гужова<sup>1</sup>, Б. В. Попов<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

<sup>2</sup>Ленинградский региональный клинический онкологический диспансер им. Л.Д. Романа  
Минздрава России, Кузьмолово, 188663, Россия

\* E-mail: voldemryabov@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.07.2023 г.

После доработки 22.08.2023 г.

Принята к публикации 08.09.2023 г.

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний, которое в своем развитии проходит две стадии: локализованный РПЖ и кастрационно-резистентный РПЖ (КР-РПЖ). Первая стадия – локализованный РПЖ – может неопределенно долго протекать в дремлющей форме, не требующей активного медицинского вмешательства, или неожиданно переходить в агрессивную метастатическую форму (КР-РПЖ), заканчивающуюся быстрым летальным исходом. Патогенез перехода дремлющей формы РПЖ в метастатическую форму остается не полностью изученным. Сигнальные пути опухолевого супрессора pRb и протоонкогена  $\beta$ -катенина являются, вероятно, наиболее вовлеченными в патогенез РПЖ, однако роль их взаимодействия не исследована. Изучение патогенеза опухолей других тканей позволяет предположить, что в начальной стадии развития РПЖ pRb теряет некоторые свойства опухолевого супрессора, что может происходить при его взаимодействии с  $\beta$ -катенином и дает возможность опухолевым клеткам получить конкурентные преимущества для размножения. В нашей работе мы показали, что гены *RB* и  $\beta$ -катенина (*CTNNB1*) экспрессируются в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы (ПЖ). В отличие от  $\beta$ -катенина, pRb не выявляется в иммуноблотинге в опухолевой и нормальной ткани ПЖ, но легко определяется таким способом в экстрактах контрольных клеток линии T98G. С одной стороны, ко-иммунопреципитация антителами к pRb из экстрактов опухолевой и нормальной ткани ПЖ дает возможность выявить этот белок и  $\beta$ -катенин последующим иммуноблотингом, что свидетельствует о физическом взаимодействии названных белков в ткани ПЖ. С другой стороны, иммунопреципитация  $\beta$ -катенина антителами к его С-концевому фрагменту не дает возможности выявить этот белок в экстрактах ПЖ последующим иммуноблотингом с помощью тех же антител. В противоположность ткани ПЖ,  $\beta$ -катенин легко определяется в иммунопреципитации, совмещенной с иммуноблотингом, в экстрактах контрольных клеток T98G. Полученные данные дают возможность предположить, что *RB* и  $\beta$ -катенин физически взаимодействуют друг с другом в клетках различной тканевой специфичности. В клетках линии T98G такое взаимодействие происходит, вероятно, через С-концевой фрагмент  $\beta$ -катенина, но в клетках ПЖ оно осуществляется другим путем, поскольку С-фрагмент  $\beta$ -катенина оказывается экранированным от такого взаимодействия, возможно из-за его физической ассоциации с pRb.

**Ключевые слова:** локализованный рак предстательной железы, сигнальные пути, pRb,  $\beta$ -катенин, взаимодействие

**Принятые сокращения:** КР-РПЖ – кастрационно-резистентный РПЖ, ПЖ – предстательная железа, ПСА – простатический специфический антиген, ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, РПЖ – рак предстательной железы, ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени, AR – андрогенный рецептор, CTNNB1 – ген  $\beta$ -катенина, передающего сигналы в каноническом сигнальном пути Wnt/ $\beta$ -катенин, *RB* – ген чувствительности к ретинобластоме; pRb – продукт гена *RB*.

DOI: 10.31857/S0041377124010067, EDN: IBXASX

Ген *RB*, определяющий чувствительность к возникновению ретинобластомы, был первым опухолевым супрессором, который удалось клонировать в 1986–1987 гг. (Friend et al., 1986; Lee et al., 1987).

С тех пор *RB* и его продукт pRb постепенно заняли центральное место в публикациях, посвященных изучению основных клеточных функций и их нарушений при онкологических заболеваниях.

Область регуляторной активности *RB* включает эмбриональные стволовые, соматические стволовые и дифференцированные клетки различных тканей (Sage, 2012). Онкосупрессорная активность pRb основана на его канонической роли в регуляции клеточного цикла и неканонической роли в регуляции состояния хроматина (Weinberg, 1995; Sherr, 1996; Dyson, 1998; Dick et al., 2018).

Многофункциональность pRb опосредована его свойством взаимодействовать со множеством различных регуляторных белков. Основными партнерами pRb являются транскрипционные факторы семейства E2F, которые опосредуют его регуляторное воздействие на клеточный цикл и хроматин (Dyson, 1998). В ходе такого взаимодействия белки семейства E2F, имеющие сайты связывания в промоторах множества генов, физически взаимодействуют с pRb, способствуют формированию комплекса pRb-E2F на промоторах генов-мишеней и прямому или опосредованному торможению их транскрипции путем рекрутирования комплексов или отдельных белков, например метилтрансферазы Ezh2. Ezh2 триметирует лизин 27 гистона H3 (H3K27me3). Такая модификация хроматина в промоторах генов плюрипотентности *OCT4*, *SOX2* в эксперименте вызывает их сайленсинг, сохраняющий стволовые клетки в состоянии самоподдержания и тормозящий их дифференцировку в тканеспецифические специализированные клетки (Kareta et al., 2015; Dick et al., 2018). Потеря, мутации, метилирование промотора *RB* или посттрансляционные модификации его продукта ведут к изменениям внутриклеточной сигнализации и возникновению опухолей в различных тканях, включая предстательную железу (ПЖ) (Mandigo et al., 2021).

В мужской репродуктивной системе ПЖ является небольшим вспомогательным органом, который в настоящее время находится в центре биомедицинских исследований вследствие самой высокой чувствительности к онкогенной трансформации среди других органов у мужчин.

Рак предстательной железы (РПЖ) диагностируется в течение жизни у каждого восьмого лица мужского пола (Siegel et al., 2021). ПЖ формируется и функционирует в эмбриональной жизни и после рождения под контролем сигнального пути андрогенного рецептора (*AR*) (Cunha, 1994). *AR* наиболее высоко экспрессируется в люминальном эпителии ПЖ, фенотип которого доминирует при РПЖ, поэтому *AR* является критическим эффектором возникновения и прогрессии РПЖ и эффективности его терапии (Balk, Knudsen, 2008).

С одной стороны, *AR* способствует делению клетки путем индукции экспрессии циклина D1, образованию активной киназы циклин-D/Cdk4,6 и последующей инактивации pRb путем его гиперфосфорилирования (Xu et al., 2006). pRb является убиквитарным негативным регулятором клеточного цикла. В начале фазы G1 он находится в гипофосфорилированном активном состоянии и индуцирует остановку клеточного цикла в рестрикционной точке R1 перед началом репликации ДНК путем связывания и секвестрирования активаторных транскрипционных факторов E2Fs (E2F1-E2F3). Фосфорилирование pRb киназами циклин-D/Cdk4,6 и циклин-E/Cdk2 освобождает белки E2Fs от связи с ним.

В несвязанном с pRb состоянии белки E2Fs способствуют последовательному формированию циклин-зависимых киназных комплексов, включающих циклины D, E, A, M. Такие комплексы создают механизм последовательного прохождения клеткой фаз G1, S, G2/M клеточного цикла (Dyson, 1988; Рябов и др., 2022).

С другой стороны, проксимальный и дистальный промоторы гена *AR* содержат сайты связывания белков E2Fs, передающих регуляторное влияние pRb на транскрипцию *AR*. Сигнальный путь pRb-E2F1 транскрипционно тормозит экспрессию *AR* и его мишеней – генов ПСА и сериновой трансмембранной протеазы (*TMPRSS2*). При потере *RB* происходит активация сигнального пути *AR* и связанное с ним повышение уровня продуктов ПСА и *TMPRSS2*. Ген *TMPRSS2* у части пациентов с РПЖ формирует рекомбинантную последовательность путем слияния с геном *ERG* (*TMPRSS2-ERG*), которая является маркером РПЖ (Tomlins et al., 2008).

Утрата *RB* играет ключевую роль в патогенезе и снижении эффективности медикаментозного лечения РПЖ, направленного на модуляцию сигнального пути *AR*. Прогрессирование РПЖ включает две отдельные стадии: локализованный РПЖ и кастрационно-резистентный РПЖ (КР-РПЖ). В первой стадии болезнь может протекать неопределенно долго в дремлющей форме, не угрожающей жизни пациента, или внезапно трансформироваться в агрессивный КР-РПЖ, сопровождающийся быстрым летальным исходом (Mandigo et al., 2021). Потеря *RB* обнаруживается менее, чем у 1% пациентов с локализованным РПЖ, но у 30–60% пациентов с КР-РПЖ (Sharma et al., 2010; McNair et al., 2018).

Механизм утраты pRb свойств опухолевого супрессора при локализованном РПЖ не ясен, но

изучение патогенеза опухолей других тканей позволяет предположить, что в начальной стадии развития опухоли pRb может терять некоторые свойства опухолевого супрессора, что дает возможность опухолевым клеткам получить конкурентные преимущества для размножения (Viatour, Sage, 2011).

Пациенты с раком грудной железы, у которых выявляется потеря pRb, демонстрируют более продолжительный период безрецидивной выживаемости после химиотерапии по сравнению с пациентами с нормальным уровнем pRb (Derenzini et al., 2008). Сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин конститутивно активирован более чем в 90% случаев колоректального рака, при котором в некоторых случаях амплифицируется локус RB (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Опухоль может использовать разные механизмы отмены негативного влияния pRb на ее рост. В нормальных условиях pRb способствует митохондриальному апоптозу путем увеличения проницаемости внешней митохондриальной мембраны, опосредованному взаимодействием pRb с белком Bax. Потеря RB и его взаимодействия с Bax уменьшает уровень апоптоза и его защитную роль при росте опухоли (Wang et al., 2017). pRb тормозит транскрипцию E2F1, который способствует активации сигнального пути ARF-p53, вызывающего апоптоз (Weber et al., 2000).

В условиях потери pRb могут накапливаться реактивные формы кислорода, вызывающие активацию аутофагии (Ciavatta, Zacksenhaus, 2011). Функции pRb почти всегда сохраняются при раке толстого кишечника, при котором pRb способствует росту опухоли путем транскрипционной супрессии E2F1, тормозящего продукцию  $\beta$ -катенина (Morris et al., 2008).

Другой механизм участия  $\beta$ -катенина в развитии опухолей толстого кишечника реализуется при хроническом воспалении и опосредуется фактором некроза опухолей (TNF). В таких случаях TNF активирует каспазу 8, которая протеолизует pRb в его С-концевой части, тогда как клетки с мутацией RB в С-домене проявляют устойчивость к апоптозу, индуцированному TNF (Chau et al., 2002).

Устойчивость к апоптозу также повышена в клеточных линиях, происходящих из толстого кишечника и экспрессирующих ядерный  $\beta$ -катенин, взаимодействие которого с pRb, вероятно, тормозит митохондриальный апоптоз (Han et al., 2013). Взаимодействие между pRb и  $\beta$ -катенином при локализованном РПЖ не изучалось.

Цель настоящей работы заключалась в изучении взаимодействия pRb с  $\beta$ -катенином в опухолевой и окружающей нормальной ткани ПЖ, полученных от пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу локализованного РПЖ.

Первая задача работы заключалась в оценке экспрессии эпителиальных маркеров (цитокератина 5 и AR), опухолевого маркера (AMACR), генов CTNNB1 ( $\beta$ -катенина) и RB в опухолевой и нормальной ткани ПЖ.

Вторая задача состояла в определении уровня белков pRb и  $\beta$ -катенина в тех же тканях путем иммуноблотинга и иммунопреципитации.

Третья задача включала в себя оценку взаимодействия pRb и  $\beta$ -катенина в указанных тканях с помощью иммуноблотинга и иммунопреципитации.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Пробы ткани ПЖ.** Образцы ткани получали от пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу РПЖ в урологическом отделении Ленинградского областного клинического онкологического диспансера им. Л.Д. Романа (ЛОКОД) в соответствии с протоколом, утвержденным биоэтическим комитетом Института цитологии РАН и согласованным с отделом клинических исследований ЛОКОД.

Пробы ткани ПЖ весом около 100 мг, включая опухолевый узел или нормальную ткань того же слоя, помещали в пробирки с 5 мл стерильной среды RPMI 1640, содержащей 50 мкг/мл гентамицина ("Биолот", Россия). Каждую из двух проб разделяли острыми ножницами на две части, одна из которых предназначалась для экстрагирования тотальной РНК и общеклеточного белка. Вторую часть обрабатывали коллагеназой для приготовления клеточной суспензии, которую использовали в дальнейшем для получения первичных клеточных двумерных культур.

**Стабильная клеточная линия T98G.** Глиобластома человека T98G широко используется в качестве золотого стандарта клеток, продуцирующих белки pRb и  $\beta$ -катенин (Hansen et al., 2001; Петров и др., 2016; Роров et al., 2020). Клетки были получены из коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с 10% фетальной бычьей сыворотки, гентамицином (50 мкг/мл) при 6% CO<sub>2</sub> и 100%-ной влажности.

**Получение первичных клеточных культур из образцов тканей ПЖ.** Пробы ткани ПЖ, предназначенные для получения клеточных культур, помещали в 100-мм чашки Петри с 10 мл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). Далее пробы разрезали стерильными ножницами на кусочки размером 1 мм, переносили в 15 мл конические пластиковые пробирки (ТТР, Новосибирск, Россия), и подвергали ферментативной обработке в 1 мл раствора, содержащего 5 мг коллагеназы II типа (Life Technologies, США) в 1 мл среды Advanced DMEM/F12, содержащей 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина, 10 мМ Непес и 1-кратный GlutaMAX (adDMEM/F12+++ , Life Technologies, США).

Далее добавляли ингибитор Rho-киназы Y27632 (Abmole Bioscience, США) до конечной концентрации 10 мкМ и дигидротестостерон (Sigma, США) до конечной концентрации 1 нМ (Drost et al., 2016). Пробирки с материалом инкубировали на ротационном шейкере (PST-60 HL-4, “Биосан”, Латвия) 18 ч при 37 °С и 230 гpm.

Затем суспензии центрифугировали при 250 g 5 мин, клеточные осадки отмывали в 5 мл среды adDMEM/F12, фильтровали через нейлоновые сито с порами 70 мкМ (Corning, США), осаждали при 250 g 5 мин, осадок ресуспендировали в 1 мл раствора TрупLE Express (Life Technologies, США) в течение 1 ч на ротационном шейкере (PST-60 HL-4, “Биосан”, Латвия) при 37 °С и 230 гpm.

Затем к суспензии добавляли 5 мл среды adDMEM/F12, клетки осаждали центрифугированием при 250 g 5 мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл среды adDMEM/F12+++.

Для подсчета количества клеток 5 мкл клеточной суспензии смешивали с 45 мкл 1%-ной уксусной кислоты и 50 мкл 2%-ного трипанового синего (“Биолот”, Россия), клетки подсчитывали в камере Горяева.

Для получения первичных клеточных культур  $2 \cdot 10^5$  клеток из клеточной суспензии добавляли в 4 мл специальной среды SCBM (Lonza, Швейцария) для стромальных клеток ПЖ человека и вносили в 60 мм культуральные чашки, предварительно покрытые коллагеном (“Биолот”, Россия). Импиджи клеток первичных культур получали через 2–4 недели культивирования, используя микроскопа Axiovert 200M (Германия), камеру DFC420 в режиме проходящего света или фазового контраста, объектив 20\*/0.5; размер снимка составлял 1728×1296 пикселей.

**Извлечение тотальной РНК из проб ткани ПЖ пациентов, синтез кДНК.** Пробы ткани ПЖ размером 2×2 мм помещали в стальную ступку, охлаждали жидким азотом и растирали пестиком. Полученный порошок переносили в отдельную пробирку и добавляли 1 мл ExtractRNA (“Евроген”, Россия), оставляли на льду на 5 мин. Затем в каждую пробирку добавляли по 200 мкл охлажденного хлороформа и суспензию перемешивали на вортексе.

После этого пробирки ставили в лед на 3 мин, центрифугировали 15 мин при 4 °С и 13000 g, верхнюю фазу супернатанта переносили в новые пробирки и добавляли 500 мкл изопропанола (Sigma, США). Инкубировали на льду 10 мин, затем центрифугировали 10 мин при 4 °С и 13000 g, удаляли супернатант, добавляли по 1 мл 70%-ного этанола, центрифугировали 5 мин при 4 °С и 7600 g. Полностью удаляли супернатант, осадок сушили при комнатной температуре 10 мин, растворяли в 32 мкл безнуклеазной воды (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 15 мин при 57.5°С.

Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Для синтеза кДНК 2 мкг РНК смешивали с 1 мкл праймера олиго-дТ18 (“Алкор Био”, Россия), объем смеси доводили до 11 мкл и инкубировали при 70 °С 10 мин; охлаждали, добавляли 2 мкл буфера для обратной транскриптазы (SibEnzyme, Россия), 2 мкл 10 мМ смеси дНТФ (Beagle, Россия), 0.5 мкл ингибитора рибонуклеаз RiboLock (Thermo Scientific, США), 40 ед. обратной транскриптазы (SibEnzyme, Россия), предварительно разведённой в буфере для обратной транскриптазы, и инкубировали 1 ч при 37°С. Реакцию останавливали нагреванием до 70 °С в течение 10 мин.

**Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ).** Смесь реагентов для проведения ПЦР включала в себя: 1 мкл 10 мМ смеси дНТФ (Beagle, Россия), 2.5 мкл 10-кратного буфера для Taq-полимеразы (“Алкор Био”, Россия), 2.5 мкл 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ прямого и обратного праймеров (“Алкор Био”, Россия), 2 мкл кДНК, 0.25 мкл Taq-полимеразы (“Алкор Био”, Россия) и воду до 25 мкл общего объема реакционной смеси.

Смесь готовили при температуре тающего льда. Амплификацию проводили на термоциклере BioRad T100 (США) при следующем температурном режиме: иницирующее плавление – 1 мин, 94 °С; плавление – 15 с, 94 °С; отжиг – 30 с,

**Таблица 1.** Праймеры, использованные для амплификации маркерных генов, экспрессирующихся в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы

| Ген                            | Прямой праймер, 5'–3'   | Обратный праймер, 5'–3'    | Размер ампликона, п.о. |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|
| <i>CK5</i>                     | TTCATCGACAAGGTGCGGT     | TGAGGTGTCAGAGACATGCG       | 423                    |
| <i>AR</i>                      | GACATGCGTTTGGAGACTGC    | TTTCTTCAGCTTCCGGGCTC       | 294                    |
| <i>AMACR</i>                   | TGGCCACGATATCAACTATTTGG | ACTCAATTTCTGAGTTTTCCACAGAA | 247                    |
| <i>RB</i>                      | GCAGTATGCTTCCACCAGGC    | AATCCGTAAGGGTGAAC TAGGAAAC | 91                     |
| <i>CTNNB1</i> (ген β-катенина) | GATTGATTCGAAATCTTGCCCT  | CTGATGTGCACGAACAAGCA       | 101                    |
| <i>GAPDH</i>                   | CCATCTTCCAGGAGCGAGA     | GGCAGTGATGGCATGGACTGT      | 326                    |

58 °С; элонгация – 30 с, 72 °С (40 циклов); плато – 10 мин, 72 °С. Продукты ПЦР-амплификации подвергали электрофорезу в 2%-ном агарозном геле с бромистым этидием, размер отдельных ампликонов в агарозном геле определяли при сравнении их подвижности с маркерами 50 пар оснований (п. о.) (Invitrogen, США) на имиджах, полученных с помощью Bio-Rad ChemiDoc XRS+ (США) (табл. 1).

**ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).** Обще-клеточную РНК выделяли при помощи набора для выделения РНК на колонках “Биолабмикс” (Новосибирск, Россия). Осадок клеток ресуспендировали в 50 мкл PBS, добавляли по 350 мкл буфера для лизиса LB из набора, пипетировали, инкубировали в течение 10 мин. Добавляли к лизату равный объем этанола, переносили на колонки, центрифугировали 30 с при 10000 g, удаляли фильтрат. Наносили на колонки по 500 мкл буфера для промывки из набора, центрифугировали 30 с при 10000 g и удаляли фильтрат. Повторяли эту же процедуру с буфером для промывки WB2. Колонки центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин для полного удаления промывочного буфера и переносили их в новые микропробирки. Далее на фильтр каждой колонки дважды наносилось по 60 мкл буфера для элюции EB из набора, после чего колонки оба раза инкубировали в течение 1 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 10000 g.

Количество РНК определяли спектрометрически при длине волны 260 нм. Для синтеза кДНК 2 мкг РНК смешивали с 2 мкл 20 мМ раствора случайного гексапраймера (“Биолабмикс”, Новосибирск, Россия), объем смеси доводили до 12 мкл и инкубировали при 70 °С 3 мин, реакционную смесь охлаждали, добавляли к ней 4 мкл 5-кратного буфера, 1 мкл (200 ед.) обратной транскриптазы M-MuLV-RH (“Биолабмикс”, Новосибирск, Россия), 1 мкл 10 мМ смеси dNTP и 2 мкл 0.1 М

ДТТ, инкубировали 10 мин. при 25 °С и затем 60 мин при 42 °С.

Реакцию останавливали нагреванием до 70 °С в течение 10 мин. ПЦР-РВ проводили на амплификаторе Bio-Rad CFX96 Touch со следующими параметрами: иницирующее плавление – 6 мин. 95°С, плавление – 15 с 95 °С, отжиг – 30 с 60 °С, синтез – 60 с 70 °С, 40 циклов.

Реакционная смесь состояла из 15 мкл 2-кратного раствора HS-qPCR SYBR Blue, содержащего дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP), ПЦР-буфер, MgCl<sub>2</sub>, Taq ДНК-полимеразу, SYBR Green I и инертный краситель (“БиоМастер”, Россия), 0.2 мкМ прямого и обратного праймеров (см. табл. 1), синтезированных в компании “Евроген” (Россия), 0.2 мкл кДНК и воды до объема 30 мкл.

В качестве контрольного гена использовали GAPDH. Нормализованную экспрессию рассчитывали по формуле  $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{GOI} / \Delta Cq_{GAPDH}$ , где GOI – ген интереса, а  $\Delta Cq$  – относительное количество, рассчитанное из разницы между средним значением цикла выхода Cq и самым низким средним значением Cq среди образцов в эксперименте. Для всех генов ПЦР-РВ повторяли шесть раз.

**Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг.** Электрофорез белков проводили в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS). Пробы ткани ПЖ размером 2×2 мм помещали в стальную ступку, охлаждали жидким азотом и растирали пестиком. Затем добавляли 100 мкл буферного раствора, содержащего 25 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 250 мМ NaCl, 0.25%-ный детергент NP-40, 1 мМ PMSF – коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma, США) в разведении 1:100.

Полученные экстракты центрифугировали 15 мин при 13000 g и температуре 4 °С, супернатанты использовали для последующих экспериментов. Пробы уравнивали по количеству

общего белка, определяемого с помощью Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США), переносили в микропробирки, содержащие равный объем буфера для нанесения проб на гель (4% SDS, 20% глицерина, 200 мМ дитиотреита, 120 мМ Трис-Cl (pH 6.8), 0.002% бромфенолового синего), кипятили 5 мин на водяной бане и наносили в объеме 25 мкл, содержащем 50 мкг общего белка, на одну дорожку ПААГ. Электрофоретически разделенные белки переносили с геля на мембрану PVDF с помощью полусухого электропереноса. Белки на мембране выявляли специфическими антителами и визуализировали реактивом ECL (Sigma, США).

**Иммунопреципитация.** Для преципитации комплексов антиген–антитело образцы ткани растирали в стальной ступке при помощи жидкого азота, лизировали при температуре тающего льда 30 мин. специальным буферным раствором, содержащим 20 мМ Tris-Cl (pH 8.0), 137 мМ NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 мМ EDTA и ингибиторы протеаз и фосфатаз (Sigma, США) в разведении 1:100. Экстракты клеток центрифугировали 15 мин при 13000 g и температуре 4 °C и супернатанты использовали для последующей иммунопреципитации.

С этой целью к 500 мкл клеточного экстракта, содержащего 500 мкг белка, добавляли 5 мкг специфических антител на 90 мин, обработку антителами проводили при постоянной ротации при 4 °C. Затем к экстрактам добавляли 30 мкг антител к иммуноглобулинам кролика (Sigma, США) на 1.5 ч с последующим добавлением 30 мкл 10% протеин-А сефарозы на 1.5 ч.

Преципитаты отмывали путем 3-кратного центрифугирования при 2000 об./мин. в буфере для иммунопреципитации и 2-кратного центрифугирования в таком же буфере без детергента. Последующая обработка включала в себя кипячение проб в течение 5 мин в буфере для нанесения на гель, центрифугирование для отделения сефарозы и нанесение на ПААГ.

**Иммунофлюоресцентное окрашивание.** Покровные стекла с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в чашки 35 мм, однократно отмывали PBS 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 15 мин, затем 70%-ным этиловым спиртом в течение ночи при 4 °C; обрабатывали 0.2%-ным “Тритоном X-100” 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин; сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3% бычьего сывороточного альбумина и 0.1% “Твина 20”.

Затем на клетки наносили специфические антитела (разведение в 50–200 раз) в блокирующем растворе на 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза по 5 мин. PBS, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре вторыми антителами, конъюгированными с флюоресцентной меткой, отмывали 3 раза по 5 мин PBS и заключали в среду Anti-Fade (BioRad, США), уменьшающую неспецифическую флюоресценцию и содержащую краситель DAPI для окраски ДНК. Иммунофлюоресцентные изображения получали на конфокальном электронном сканирующем микроскопе Olympus FV3000 (“Олимпус”, Япония), используя лазеры с длиной волны 405, 561 и 640 нм и объектив с увеличением 60х.

**Антитела.** Для иммунопреципитации и иммуноблотинга использовали следующие антитела: кроличьи поликлональные антитела анти-β-катенин (CAT-15, Thermo Fisher Scientific, США), мышинные моноклональные антитела против pRb (C-2) и Gapdh (G-9) (sc-74562 и sc-365062, соответственно; Santa-Cruz, Biothech, США), мышинные моноклональные антитела против AMACR были получены самостоятельно (Popov et al., 2018). Для иммуноблотинга использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (Cell Signaling, США) и анти-мышинные антитела, конъюгированные с HRP (BioRad, США).

**Статистический анализ.** Статистическую обработку результатов проводили с использованием средней арифметической величины, ее ошибки и критерия Стьюдента (при  $P=0.05$ ), посчитанных при помощи программы Microsoft Office Excel 2010. Уровень β-катенина определяли по соотношению этого белка с Gapdh на одних и тех же электрофоретических блотах.

Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз. Для количественной оценки и сравнения содержания белков на отдельных электрофоретических полосах использовали приложение GelAnalyzer2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Характеристика пациентов с локализованным РПЖ, у которых брали пробы ткани простаты.** Объектом нашего исследования служили пробы опухолевой и окружающей нормальной ткани предстательной железы 17 пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу локализованного РПЖ. В момент операционного вмешательства пациентам было от 55 до 73 лет,

**Таблица 2.** Общая информация, описывающая статус пациентов с локализованным РПЖ, подвергнутых радикальной простатэктомии и давших добровольное согласие на использование ткани ПЖ в исследовании

| Номер п.п. | Последовательный номер клинической пробы | Возраст пациента (лет) | Уровень ПСА сыворотки крови при операции, (нг/мл) | Коэффициент Глисона |
|------------|--|------------------------|---|---------------------|
| 1          | 49                                       | 73                     | 7.0   | 6 (3+3)             |
| 2          | 55                                       | 56                     | 14.8  | 5 (3+2)             |
| 3          | 56                                       | 60                     | 5.0   | 6 (3+3)             |
| 4          | 57                                       | 68                     | 8.0   |                     |
| 5          | 58                                       | 62                     | 7.0   |                     |
| 6          | 59                                       | 65                     | 8.0   |                     |
| 7          | 60                                       | 73                     |   |                     |
| 8          | 61                                       | 61                     | 9.7   | 7 (3+4)             |
| 9          | 62                                       | 61                     | 8.0   | 6 (3+3)             |
| 10         | 63                                       | 65                     | 9.0   | 7 (3+4)             |
| 11         | 64                                       | 72                     | 11.1  |                     |
| 12         | 65                                       | 69                     | 16.8  | 6 (3+3)             |
| 13         | 66                                       | 66                     | 16.1  |                     |
| 14         | 67                                       | 68                     | 5.1   |                     |
| 15         | 68                                       | 55                     | 5.4   |                     |
| 16         | 69                                       | 61                     | 9.8   |                     |
| 17         | 70                                       | 61                     | 9.7   |                     |

уровень ПСА в сыворотке их крови составлял 3.5–16.8 нг/мл и коэффициент Глисона – от 5 (3+2) до 7 (3+4) (табл. 2).

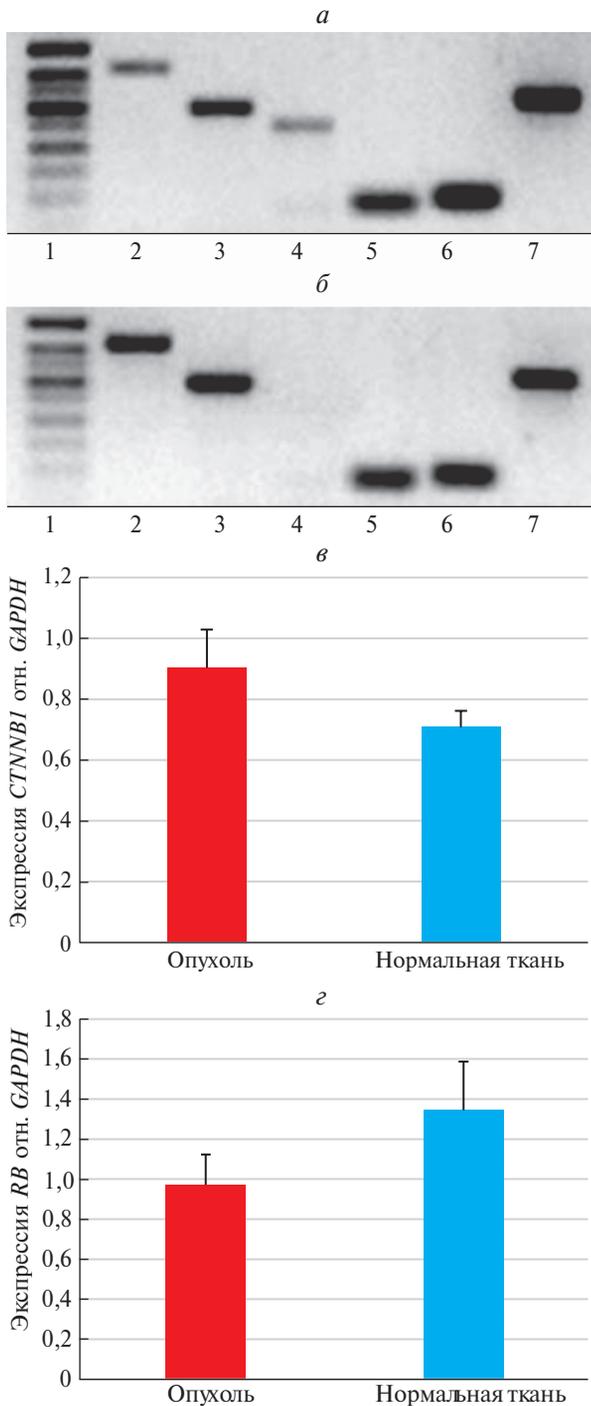
**Гены *RB* и *CTNNB1* стабильно экспрессируются в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы человека.** Результаты ПЦР-ОТ с использованием мРНК, полученной из опухолевой и нормальной ткани ПЖ пациентов, оперированных по поводу локализованного РПЖ, показали, что и в той, и в другой ткани экспрессируются маркер базального слоя эпителия ПЖ цитокератин 5 (ЦК5) и маркер люминального слоя эпителия – андрогенный рецептор (*AR*).

В опухолевой ткани выявляется экспрессия маркера РПЖ *AMACR*, который экспрессируется в меньшем количестве или отсутствует в нормальной ткани (рис. 1а, б). В образцах опухолевой и нормальной ткани пациентов стабильно экспрессируются гены *RB* и *CTNNB1* ( $\beta$ -катенина) (рис. 1а, б). ПЦР в реальном времени показала, что уровень экспрессии этих генов в опухолевой и нормальной ткани ПЖ примерно одинаков (рис. 1в, г).

**Уровень  $\beta$ -катенина в опухолевой и нормальной ткани при РПЖ варьирует от пациента к пациенту, а *pRb* вовсе не определяется в иммуноблоттинге.** При использовании нагрузки по общему белку в 50 мкг на дорожку 10%-ного ПААГ  $\beta$ -катенин выявляется в пробах опухолевой и нормальной

тканей пациентов с РПЖ. Выявляемый уровень  $\beta$ -катенина варьирует от пациента к пациенту, но не доминирует ни в опухолевой, ни в нормальной ткани (рис. 2а). В противоположность  $\beta$ -катенину, *pRb* не определяется в тех же экстрактах тканей ПЖ при иммуноблоттинге, тогда как в контрольных клетках T98G продукция обоих белков стабильно выявляется на высоком уровне (рис. 2а). Сравнение средних величин уровня  $\beta$ -катенина в опухолевой и нормальной ткани показывает отсутствие различий (рис. 2б). Отсутствие *pRb* на иммуноблотах клеток ПЖ отчасти связано с низким уровнем его продукции относительно  $\beta$ -катенина, поскольку использование тех же антител против *pRb*, распознающих эпитоп в С-концевой части белка, позволяет выявить этот белок в иммунопреципитации, совмещенной с иммуноблоттингом, как в опухолевой, так и в нормальной ткани ПЖ (рис. 2в). Результаты иммунофлюоресценции на первичных 2D-культурах, полученных из опухолевой или нормальной ткани ПЖ, показывают, что *pRb* продуцируется на очень низком уровне и выявляется преимущественно в цитоплазме некоторых клеток, тогда как  $\beta$ -катенин визуализируется на значительно более высоком уровне в цитоплазматической, мембранной и ядерной формах (рис. 2г).

**Имунопреципитация  $\beta$ -катенина и его ко-имунопреципитация с *pRb* из экстрактов опухолевой**



**Рис. 1.** Амплификация *RB* и *CTNNB1* (ген β-катенина) в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы (ПЖ) пациентов, оперированных по поводу РПЖ. ОТ-ПЦР-амплификация маркеров: эпителиальных (*ЦК5*, *AR*), опухолевого (*AMACR*), *RB* и *CTNNB1* (гена β-катенина) в опухолевой (*а*) нормальной (*б*) ткани ПЖ: 1 – маркер мол. массы 50 п.о., 2 – *ЦК5* (423 п.о.), 3 – *AR* (294 п.о.), 4 – *AMACR* (247 п.о.), 5 – *RB* (91 п.о.), 6 – *CTNNB1* (101 п.о.), 7 – *GAPDH* (326 п.о.); *в*, *г* – ПЦР-РВ-амплификация *RB* и *CTNNB1* соответственно; *в*, *г* – данные ПЦР-РВ представляют собой среднюю арифметическую величину и ее ошибку ( $n=3$ ).

и нормальной ткани пациентов с локализованным РПЖ. Мы нашли, что хотя β-катенин стабильно выявляется у всех пациентов с РПЖ при иммуноблоттинге, использование тех же антител не приводит к его выявлению в иммунопреципитации, совмещенной с иммуноблоттингом как в опухолевой, так и в нормальной ткани. В противоположность результатам с иммунопреципитацией из экстрактов тканей ПЖ, β-катенин стабильно выявляется при иммунопреципитации теми же антителами из экстрактов клеток линии T98G (рис. 3а).

Мы предполагаем, что отсутствие иммунопреципитации β-катенина из экстрактов ПЖ связано с тем, что сайты его распознавания антителами CAT-15 (Thermo Fisher Scientific, США) экранированы в ПЖ в результате взаимодействия β-катенина с pRb. Это предположение соответствует тому факту, что используемые антитела иммунопреципитируют β-катенин из экстрактов клеток T98G, в которых взаимодействие β-катенина и pRb происходит, вероятно, иначе (см. рис. 3а).

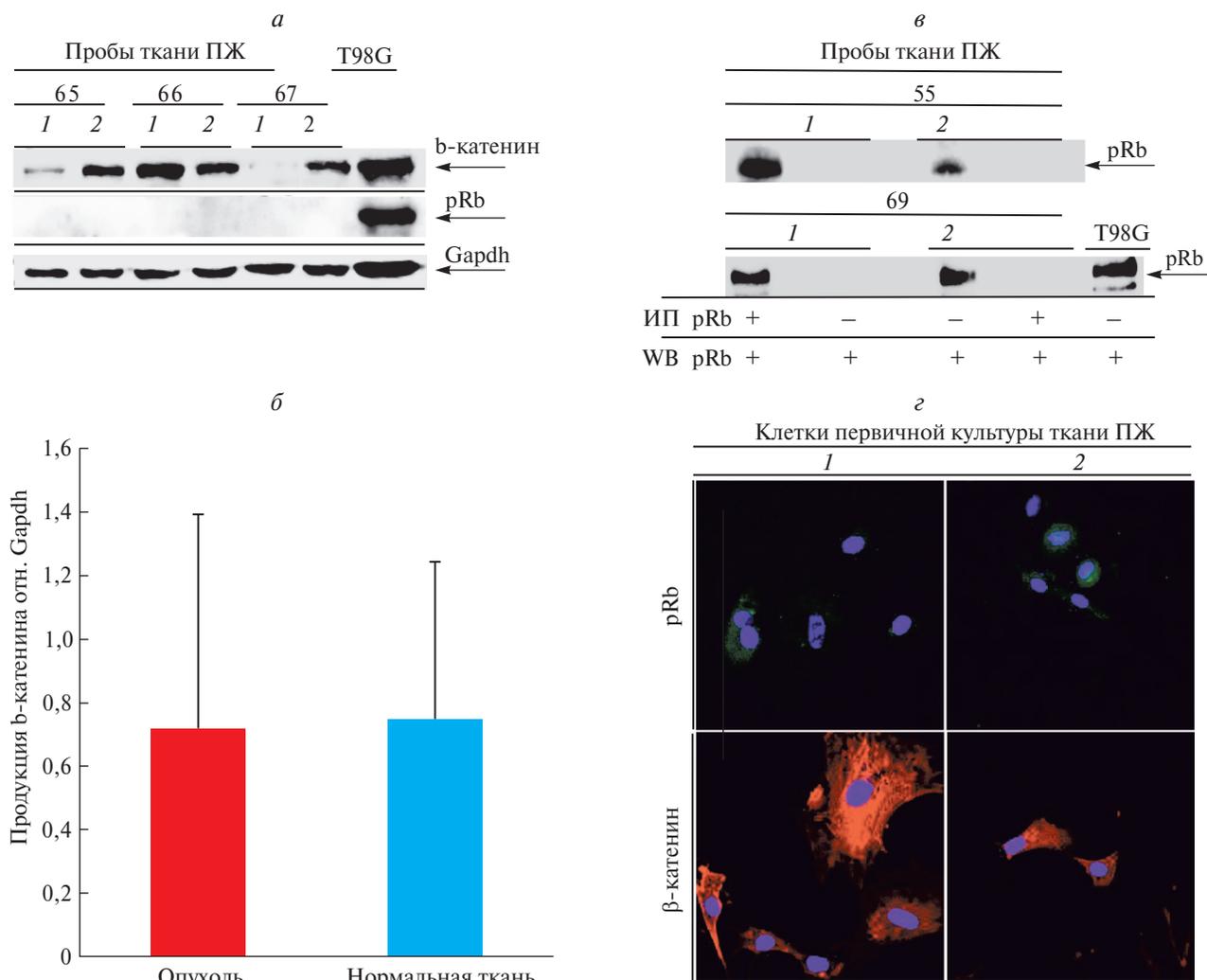
Для проверки этого предположения мы использовали иммунопреципитацию антителами к pRb, совмещенную с иммуноблоттингом антителами против β-катенина. В таком опыте антитела к pRb ко-иммунопреципитируют β-катенин, который выявляется как в экстрактах опухолевых и нормальных клеток ПЖ, так и в экстрактах клеток T98G (см. рис. 3б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Белок pRb играет различную роль в патогенезе локализованного РПЖ и КР-РПЖ. При локализованном РПЖ мутации или потеря гена *RB* встречаются менее, чем у 1% пациентов в противоположность КР-РПЖ, при котором такие нарушения выявляются в 30–60% заболеваний (McNair et al., 2018; Рябов и др., 2022).

Мы предположили, что низкая частота мутаций *RB* и сохранение синтеза его продукта при локализованном РПЖ могут быть связаны с тем, что pRb теряет некоторые функции опухолевого супрессора. Возможно, при локализованном РПЖ подобно тому, что происходит при раке толстого кишечника, опухолевые клетки создают конкурентные преимущества для роста путем модификации и использования pRb в своих целях (Morris et al., 2008; Viatour, Sage, 2011).

Механизм частичной утраты свойств опухолевого супрессора продуктом *RB* может быть



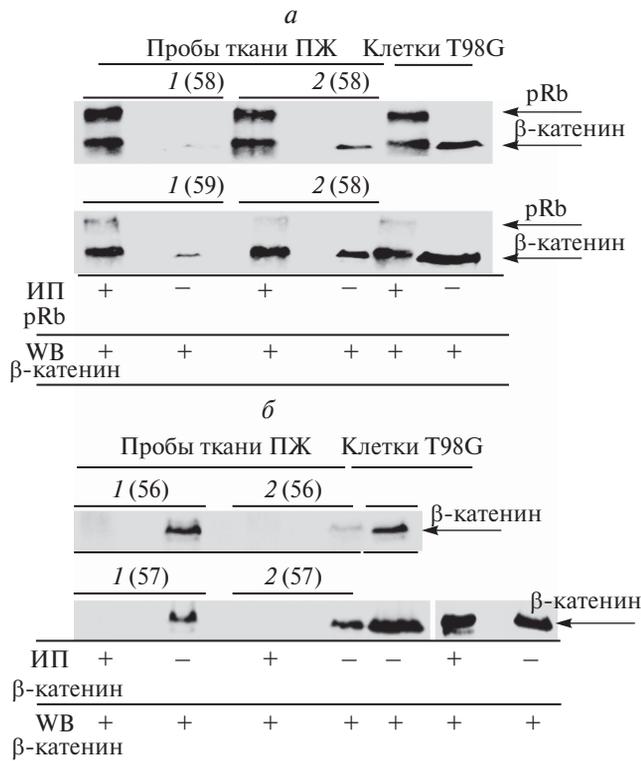
**Рис. 2.** Уровень  $\beta$ -катенина и pRb в опухолевой (1) и нормальной (2) ткани ПЖ трех клинических проб (65, 66, 67) от пациентов, оперированных по поводу локализованного РПЖ. Иммуноблотинг (WB) и иммунопреципитация (ИП); а – WB: белки экстрактов ПЖ разделяли путем электрофореза в 10%-ном ПААГ при нагрузке по общеклеточному белку 50 мкг на дорожку; Gapdh определяли для выравнивания нагрузки на разных дорожках, экстракты клеток линии T98G использовали в качестве положительного контроля; б – уровень  $\beta$ -катенина в опухолевой (1) и нормальной (2) ткани ПЖ, показаны средние арифметические величины и их ошибки ( $n=7$ ); в – ИП: pRb из опухолевой и нормальной ткани ПЖ; экстракты, содержащие 50 мкг общеклеточного белка на дорожку, разделяли при электрофорезе в ПААГ и визуализировали с помощью WB; г – иммунофлуоресцентное выявление pRb (зеленый цвет) и  $\beta$ -катенина (красный цвет) в клетках первичных культур из опухолевой (1) и нормальной (2) ткани ПЖ (клиническая проба 70): ядра окрашены DAPI (голубой цвет); конфокальный лазерный сканирующий микроскоп FV3000 (Япония; лазеры 405, 561 и 640 нм), увеличение объектива 60 $\times$ .

основан на его взаимодействии с  $\beta$ -катенином в клетках РПЖ, как это происходит в клетках при раке толстого кишечника (Han et al., 2013). Для оценки такого предположения мы сначала оценили экспрессию генов в опухолевой и нормальной ткани ПЖ с помощью ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ.

Результаты опытов показали, что гены *CTNNB1* (ген  $\beta$ -катенина) и *RB* экспрессируются в опухолевой и нормальной ткани ПЖ подобно маркерам базального (ЦК5) и люминального (AR) эпителия. Экспрессия *CTNNB1* и *RB* в опухолевой и нормальной ткани ПЖ существенно не отличается.

В опухолевой ткани дополнительно выявляется AMACR – маркер РПЖ (рис. 1а, б).

При оценке уровня продуктов *CTNNB1* и *RB* (pRb) мы нашли, что  $\beta$ -катенин выявляется в опухолевой и нормальной ткани ПЖ, хотя его уровень изменяется от пациента к пациенту, не показывая доминирования ни в опухолевой, ни нормальной ткани (см. рис. 2а, б). В отличие от  $\beta$ -катенина, pRb не выявляется на иммуноблотах ни в опухолевой, ни в нормальной ткани ПЖ, тогда как в контрольных клетках T98G этот белок выявляется на высоком уровне (см. рис. 2а).



**Рис. 3.** Белки pRb и β-катенин физически взаимодействуют друг с другом и формируют комплекс в экстрактах ткани предстательной железы человека: *а* – β-катенин (клинические пробы 58 и 59) не преципитируется из экстрактов ткани ПЖ, но выявляется на иммуноблоте антителами CAT-15 (Thermo Fisher Scientific, США), распознающими эпитоп в С-концевом участке молекулы; *б* – антитела к pRb ко-иммунопреципитируют β-катенин из экстрактов ткани ПЖ (клинические пробы 56 и 57). Клетки T98G использовали как положительный контроль. ИП, WB – то же, что и на рис. 2. Показаны результаты для опухолевой (1) и нормальной (2) ткани ПЖ.

С помощью иммунопреципитации pRb выявляется как в опухолевой, так и в нормальной ткани ПЖ, причем в опухолевой ткани его уровень значительно превышает таковой в нормальной ткани (см. рис. 2*в*).

Следующим шагом была оценка физического взаимодействия β-катенина и pRb. Путем ко-иммунопреципитации антителами к pRb нам удалось показать, что эти белки физически взаимодействуют друг с другом и преципитируются в одном комплексе. Ко-иммунопреципитированный антителами против pRb из экстрактов опухолевой и нормальной ткани ПЖ β-катенин выявляется специфическими антителами на иммуноблотах (см. рис. 3*а*). Уровень ко-иммунопреципитированного β-катенина из экстрактов ткани ПЖ подобен таковому из клеток линии T98G (см. рис. 3*а*).

Интересно, что β-катенин не иммунопреципитируется из экстрактов ПЖ теми же специфическими антителами, которыми он распознается в иммуноблотинге, но иммунопреципитируется из экстрактов контрольных клеток T98G (см. рис. 3*б*).

Эти данные дают возможность предположить, что в клетках ткани ПЖ сайт распознавания β-катенина антителами CAT-15 (Thermo Fisher Scientific, США) экранирован от распознавания, поскольку он занят взаимодействующим с ним pRb. В клетках T98G взаимодействие этих белков происходит, вероятно, иначе, поэтому сайт распознавания антителами CAT-15 оказывается открытым и β-катенин эффективно ко-иммунопреципитируется теми же антителами против β-катенина (см. рис. 3*б*).

Найденные нами особенности взаимодействия β-катенина и pRb в клетках ПЖ проходят как в опухолевой, так и нормальной ткани. Возможно, что этот процесс инициируется в опухоли и распространяется на нормальную ткань путем передачи неизвестного фактора, который взаимодействует с С-концевым участком β-катенина, экранируя находящийся там эпитоп связывания антител CAT-15 (Thermo Fisher Scientific, США).

β-Катенин опосредует регуляторное действие на клетку эволюционно консервативного семейства белков Wnt (Wodarz, Nusse, 1998). В присутствии лигандов Wnt цитоплазматический β-катенин становится стабильным, транслоцируется в ядро и активирует транскрипционные факторы семейства LEF/TCF, инициируя продукцию Мус, циклина D1, AR, что ассоциируется с возникновением РПЖ (Kurta, Waxman, 2012). Мутации β-катенина идентифицированы в 5% проб тканей с РПЖ (Voeller et al., 1998).

Кроме того, инактивация β-катенина способствуют мутации опухолевых супрессоров APC и AXIN1, продукты которых входят в состав комплекса, способствующего его деструкции (Schneider, Logan, 2018). Подобно pRb, β-катенин имеет множественные точки влияния на продукцию AR. В регуляторной области гена AR находятся три активных сайта связывания LEF/TCF, передача сигналов Wnt/β-катенин может сопровождаться повышением уровня транскрипции AR (Yang et al., 2006).

Торможение GSK-3β, эффекторной киназы комплекса, инактивирующего β-катенин в цитоплазме, может способствовать репрессии AR и росту РПЖ (Mazog et al., 2004). Мишень сигнального пути Wnt/β-катенин, продукт гена циклина D1, может подавлять сигнальный путь AR (Petre et al.,

2002). В опытах *in vivo* на мышинной модели РПЖ показано, что сверхэкспрессия  $\beta$ -катенина вызывает выраженную интраэпителиальную неоплазию и резистентность к антиандрогенной терапии (Yu et al., 2009).

Изложенные данные из литературы показывают, что pRb и  $\beta$ -катенин имеют множественные точки синергичного и антагонистического влияния на продукцию AR и прогрессирование РПЖ. Дальнейшее изучение механизмов сочетанной роли этих факторов может раскрыть новые стороны патогенеза локализованного РПЖ и его перехода в КР-РПЖ.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам группы конфокальной микроскопии и анализа изображений Института цитологии РАН за помощь в проведении фазово-контрастной и сканирующей микроскопии, а также сотрудникам ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, имеющего финансовую поддержку Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-683), за предоставление клеточной линии T98G.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00162).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Образцы ткани предстательной железы получали от пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу рака ПЖ в отделении урологии Ленинградского областного клинического онкологического диспансера им. Л.Д. Романа. Забор материала проводили согласно протоколу № 19, утвержденному биоэтической комиссией Института цитологии РАН 4 мая 2023 г. и согласованному с отделом клинических исследований онкологического диспансера им. Л.Д. Романа. Экспериментов с участием животных авторы не проводили.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Петров Н.С., Воскресенский М.А., Грозов Р.В., Коршак О.В., Зарицкий А.Ю., Верещагина Н.А., Комяков Б.К., Попов Б.В.* 2016. Маркеры клеток базального слоя эпителия предстательной железы являются эффективными индикаторами ее злокачественной трансформации. Цитология. Т. 58. С. 526. (*Petrov N.S., Voskresenskiy M.A., Grozov R.V., Korshak O.V., Zaritskey A.Y., Vereschagina N.A., Komyakov B.K. and Popov B.V.* 2017. Markers of the basal cell layer of prostate are effective indicators of its malignant transformation. *Cell Tiss. Biol.* V. 11. P. 205). <https://doi.org/10.1134/S1990519X17030099>
- Рябов В.М., Воскресенский М.А., Попов Б.В.* 2022. Роль опухолевого супрессора RB в развитии локализованного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы. Цитология. Т. 64. С. 208. (*V.M. Ryabov, M.A. Voskresenskiy, B.V. Popov.* 2022. Role of the tumor suppressor RB in the development of localized and castration-resistant prostate cancer. *Cell Tiss. Biol.* V. 16. P. 434). <https://doi.org/10.1134/S1990519X2205008X>
- Balk S.P., Knudsen K.E.* 2008. AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl Recept Signal.* V. 6. P. e001. <https://doi.org/10.1621/nrs.06001>
- Cancer Genome Atlas Network.* 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* V. 487. P. 330. <https://doi.org/10.1038/nature11252>
- Chau B.N., Borges H.L., Chen T.T., Masselli A., Hunton I.C., Wang J.Y.* 2002. Signal-dependent protection from apoptosis in mice expressing caspase-resistant Rb. *Nat. Cell Biol.* V. 4. P. 757. <https://doi.org/10.1038/ncb853>
- Ciavarra G., Zacksenhaus E.* 2011. Direct and indirect effects of the pRb tumor suppressor on autophagy. *Autophagy.* V. 7. P. 544. <https://doi.org/10.4161/auto.7.5.15056>
- Cunha G.R.* 1994. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer.* V. 74. P. 1030. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19940801\)74:3+<1030:aid-cnrcr2820741510>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19940801)74:3+<1030:aid-cnrcr2820741510>3.0.co;2-q)
- Derenzini M., Donati G., Mazzini G., Montanaro L., Vici M., Ceccarelli C., Santini D., Taffurelli M., Treré D.* 2008. Loss of retinoblastoma tumor suppressor protein makes human breast cancer cells more sensitive to antimetabolite exposure. *Clin. Cancer Res.* V. 14. P. 2199. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2065>
- Dick F.A., Goodrich D.W., Sage J., Dyson N.J.* 2018. Non-canonical functions of the RB protein in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* V. 18. P. 442. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0008-5>
- Dyson N.* 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* V. 12. P. 2245. <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2245>
- Friend S.H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R.A., Rapaport J.M., Albert D.M., Dryja T.P.* 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* V. 323. P. 643. <https://doi.org/10.1038/323643a0>
- Han J., Soletti R.C., Sadarangani A., Sridevi P., Ramirez M.E., Eckmann L., Borges H.L., Wang J.Y.* 2013. Nuclear expression of  $\beta$ -catenin promotes RB stability and

- resistance to TNF-induced apoptosis in colon cancer cells. *Mol. Cancer Res.* V. 11. P. 207. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0670>
- Hansen K., Farkas T., Lukas J., Holm R., Rönstrand L., and Bartek J. 2001. Phosphorylation-dependent and -independent functions of p130 cooperate to evoke a sustained G<sub>1</sub> block. *EMBO J.* V. 20. P. 422. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.422>
- Kareta M.S., Gorges L.L., Hafeez S., Benayoun B.A., Marro S., Zmoos A.F., Cecchini M.J., Spacek D., Batista L.F., O'Brien M., Ng Yi-H., Ang C.E., Vaka D., Artandi S.E., Dick F.A., Brunet A. et al. 2015. Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell Stem Cell.* V. 16. P. 39. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.019>
- Kypta R.M., Waxman J. 2012. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* V. 9. P. 418. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.019>
- Lee W.H., Bookstein R., Hong F., Young L.J., Shew J.Y., Lee E.Y. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science.* V. 235. P. 1394. <https://doi.org/10.1126/science.3823889>
- Mandigo A.C., Tomlins S.A., Kelly W.K., Knudsen K.E. 2021. Relevance of pRB Loss in Human Malignancies. *Clin. Cancer Res.* V. 28. P. 255. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-1565>
- Mazor M., Kawano Y., Zhu H., Waxman J., Kypta R.M. 2004. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene.* V. 23. P. 7882. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208068>
- McNair C., Xu K., Mandigo A.C., Benelli M., Leiby B., Rodrigues D., Lindberg J., Gronberg H., Crespo M., De Laere B., Dirix L., Visakorpi T., Li F., Feng F.Y., de Bono Jye Demichelis F. et al. 2018. Differential impact of RB status on E2F1 reprogramming in human cancer. *J. Clin. Invest.* V. 128. P. 341. <https://doi.org/10.1172/JCI93566>
- Morris E.J., Ji J.Y., Yang F., Di Stefano L., Herr A., Moon N.S., Kwon E.J., Haigis K.M., Näär A.M., Dyson N.J. 2008. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature.* V. 455. P. 552. <https://doi.org/10.1038/nature07310>
- Petre C.E., Wetherill Y.B., Danielsen M., Knudsen K.E. 2002. Cyclin D1: mechanism and consequence of androgen receptor co-repressor activity. *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 2207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106399200>
- Popov B.V., Sutula G.I., Petrov N.S., Yang X.J. 2018. Preparation and characterization of the antibody recognizing AMACR inside its catalytic center. *Int. J. Oncol.* V. 52. P. 547. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4220>
- Popov B., Petrov N., Ryabov V., Evsyukov I. 2020. p130 and pRb in the maintenance of transient quiescence of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* Article ID 8883436. <https://doi.org/10.1155/2020/8883436>
- Sage J. 2012. The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes Dev.* V. 26. P. 1409. <https://doi.org/10.1101/gad.193730.112>
- Schneider J.A., Logan S.K. 2018. Revisiting the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in prostate cancer. *Mol. Cell Endocrinol.* V. 462. P. 3. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.008>
- Sharma A., Yeow W.S., Ertel A., Coleman I., Clegg N., Thangavel C., Morrissey C., Zhang X., Comstock C.E., Witkiewicz A.K. et al. 2010. The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J. Clin. Invest.* V. 120. P. 4478. <https://doi.org/10.1172/JCI44239>
- Sherr C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science.* V. 274. P. 1672. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1672>
- Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. 2021. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* V. 71. P. 7. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Tomlins S.A., Laxman B., Varambally S., Cao X., Yu J., Helgeson B.E., Cao Q., Prensner J.R., Rubin M.A., Shah R.B., Mehra R., Chinnaiyan A.M. 2008. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia.* V. 10. P. 177. <https://doi.org/10.1593/neo.07822>
- Truica C.I., Byers S., Gelmann E.P. 2000. Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res.* V. 60. P. 4709.
- Viatour P., Sage J. 2011. Newly identified aspects of tumor suppression by RB. *Dis. Model. Mech.* V. 4. P. 581. <https://doi.org/10.1242/dmm.008060>
- Voeller H.J., Truica C.I., Gelmann E.P. 1998. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res.* V. 58. P. 2520.
- Wang C.Y., Xu Z.B., Wang J.P., Jiao Y., Zhang B. 2017. Rb deficiency accelerates progression of carcinoma of the urinary bladder in vivo and in vitro through inhibiting autophagy and apoptosis. *Int. J. Oncol.* V. 50. P. 1221. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3889>
- Weber J.D., Kuo M.L., Bothner B., DiGiammarino E.L., Kriwacki R.W., Roussel M.F., Sherr C.J. 2000. Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol. Cell Biol.* V. 20. P. 2517. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.7.2517-2528.2000>
- Weinberg R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* V. 81. P. 323. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)
- Wodarz A., Nusse R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* V. 14. P. 59. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.59>
- Yang X., Chen M.W., Terry S., Vacherot F., Bemis D.L., Capodice J., Kitajewski J., de la Taille A., Benson M.C., Guo Y., Buttyan R. 2006. Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells. *Oncogene.* V. 25. P. 3436. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209366>
- Yu X., Wang Y., Jiang M., Bierie B., Roy-Burman P., Shen M.M., Taketo M.M., Wills M., Matusik R.J. 2009. Activation of beta-catenin in mouse prostate causes HGPIN and continuous prostate growth after castration. *Prostate.* V. 69. P. 249. <https://doi.org/10.1002/pros.20877>
- Xu Y., Chen S.Y., Ross K.N., Balk S.P. 2006. Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res.* V. 66. P. 7783. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4472>

## INTERACTION OF pRb AND beta-CATENIN IN CANCER AND NORMAL TISSUE IN THE HUMAN PROSTATE

V. M. Ryabov<sup>a</sup>, N. I. Tyapkin<sup>b</sup>, A. P. Rodimzev<sup>a</sup>, O. G. Lyublinskaya<sup>a</sup>,  
I. V. Guzhova<sup>a</sup>, B. V. Popov<sup>a</sup>, \*

<sup>a</sup>*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russia*

<sup>b</sup>*Roman Leningrad Regional Clinical Oncological Dispensary, Ministry of Health of the Russian Federation, Kuzmolovo, 188663, Russia*

\* *E-mail: voldemryabov@yandex.ru*

Prostate cancer (PCa) is one of the most common oncological diseases, which goes through two stages in its development. The first stage, localized prostate cancer, can proceed indefinitely in a dormant form that does not require active medical intervention, or suddenly turn into an aggressive metastatic form with lethal outcome. The pathogenesis of the transition of the dormant form of PCa to the metastatic form remains not fully understood. The signaling pathways of the tumor suppressor pRb and the proto-oncogene  $\beta$ -catenin are probably the most involved in the pathogenesis of PCa but the role of their interaction in the pathogenesis of prostate cancer has not been studied. The publication on the pathogenesis of tumors in other tissues suggests that pRb may lose some properties of a tumor suppressor at the initial stage of PCa development due to its interaction with  $\beta$ -catenin that enables tumor cells to gain competitive advantages for reproduction. In this work, we have shown that the *RB* and  $\beta$ -catenin (*CTNNB1*) genes are well expressed in tumor and normal prostate tissue. Unlike  $\beta$ -catenin, pRb is not detected by immunoblotting in tumor and normal prostate tissue, but is easily determined in this way in extracts of control T98G cells. Co-immunoprecipitation with antibodies to pRb from extracts of tumor and normal prostate tissue makes it possible to detect this protein and  $\beta$ -catenin by subsequent immunoblotting, which indicates the physical interaction of these proteins in prostate tissue. On the other hand, immunoprecipitation of  $\beta$ -catenin with antibodies to its C-terminal fragment does not detect this protein in prostate extracts by subsequent immunoblotting using the same antibody. In contrast to prostate tissue,  $\beta$ -catenin is readily detected by immunoprecipitation combined with immunoblotting in T98G control cell extracts. The obtained data suggest that pRb and  $\beta$ -catenin physically interact with each other in cells of different tissue specificity. In T98G cells, this interaction probably occurs through the C-terminal fragment of  $\beta$ -catenin, but in prostate cells it occurs in a different way, since the C-fragment of  $\beta$ -catenin is shielded from such interaction, possibly due to its physical association with pRb.

**Keywords:** localized prostate cancer, signal pathway, pRb,  $\beta$ -catenin, interaction

УДК 576.31: 616.831.38

## ВИМЕНТИН В КЛЕТКАХ КОЛМЕРА У КРЫС ЛИНИИ SHR

© 2024 г. Д. Э. Коржевский<sup>1</sup>, В. А. Разенкова<sup>1,\*</sup>, О. В. Кирик<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376, Россия

\* E-mail: [valeriya.raz@yandex.ru](mailto:valeriya.raz@yandex.ru)

Поступила в редакцию 26.07.2023 г.

После доработки 20.09.2023 г.

Принята к публикации 29.09.2023 г.

Клетки Колмера — это особая популяция фагоцитирующих клеток сосудистого сплетения, участвующих в поддержании гематоликворного барьера головного мозга. В нашей работе была изучена структурная организация этих клеток у крыс Wistar, Wistar-Kyoto и спонтанно-гипертензивных крыс линии SHR. Проведенное сравнительное иммуногистохимическое исследование с использованием антител против макрофагальных маркеров Iba-1 и CD68 и белка промежуточных филаментов виментина позволило показать, что клетки Колмера у трех исследованных групп животных различаются по своей функциональной активности. У крыс линий Wistar-Kyoto и SHR отмечали не только признаки активации клеток Колмера, заключающиеся в исчезновении отростков и приобретении клетками округлой формы, но и присутствие в активированных клетках виментина. Полученный результат свидетельствует о взаимосвязи экспрессии виментина с активацией фагоцитирующих клеток головного мозга.

**Ключевые слова:** клетка Колмера, крыса SHR, головной мозг, сосудистое сплетение, иммуногистохимия

**Принятые сокращения:** ИП — иммунопозитивные клетки; ChPI — сосудистое сплетение; SHR — спонтанно-гипертензивные крысы; WKY — крысы Wistar-Kyoto.

**DOI:** 10.31857/S0041377124010075, **EDN:** IBWCG

Клетки Колмера — это популяция клеток, ассоциированных с факторами врожденного иммунитета, которые вместе с тканевыми структурами сосудистого сплетения (*Choroid Plexus* — ChPI) участвуют в поддержании гематоликворного барьера головного мозга (Maslieieva, Thompson, 2014), защищают мозг от проникновения в него через ликвор чужеродных веществ (Ling et al., 1998).

Артериальная гипертензия приводит к изменению показателей мозгового кровообращения (Fujishima et al., 1995), что не может не сказаться на функциональном состоянии ChPI. Было показано, что длительное повышение артериального давления приводит к ремоделированию стенки кровеносных сосудов, изменению расположения слоев гладкомышечных клеток, утолщению базальной мембраны в связи с накоплением коллагена (Gonzalez-Marrero et al., 2022).

Моделирование данной патологии на животных позволяет изучать возможные механизмы длительного влияния высокого артериального давления на мозг. В настоящее время крысы линии SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) считаются лучшей биологической моделью артериальной гипертензии (Amenta et al., 2003).

Использование трансмиссионной электронной микроскопии показало, что в эпителии сосудистого сплетения молодых крыс со спонтанной гипертензией происходит частичная потеря микроворсинок и базолатеральной складчатости, гипертрофия аппарата Гольджи, увеличение количества везикул и митохондрий (Ruchoux et al., 1992).

Кроме того, было обнаружено, что хроническая гипертензия у крыс линии SHR вызывает изменения целостности гематоликворного барьера (Al-Sarraf, Philip, 2003; González-Marrero et al., 2012, 2013). Несмотря на выраженные морфологические изменения ChPI, до сих пор не было проведено анализа морфофункционального состояния клеток Колмера при данной патологии. Клетки Колмера хорошо выявляются при использовании микроглиального и макрофагального маркера — белка Iba-1 (Кирик и др., 2021).

Белок промежуточных филаментов III типа виментин является маркером клеток мезенхимного происхождения, в том числе макрофагов и фибробластов (Castro-Muñozledo et al., 2017). Согласно данным литературы, уровень содержания виментина выше в активированных макрофагах, при этом данный белок может поступать и

в межклеточное пространство (Mor-Vaknin et al., 2002; Beneš et al., 2006; Mahesh et al., 2016).

Содержание виментина в клетках Колмера ранее не изучалось, хотя принадлежность этих клеток к популяции микроглии и макрофагов предполагает возможность присутствия его в этих клетках. Поэтому цель данной работы состояла в изучении структурной организации клеток Колмера у крыс линий SHR, Wistar-Kyoto (WKY) и Wistar, определении фенотипических особенностей данных клеток с использованием реакции на виментин.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В исследовании был использован головной мозг половозрелых крыс, самцов нормотензивных линий Wistar (АД  $90 \pm 12$  мм рт. ст.,  $n = 3$ ) и WKY (АД  $105 \pm 15$  мм рт. ст.,  $n = 3$ ) и спонтанно-гипертензивной линии SHR (АД  $> 220$  мм рт. ст.,  $n = 3$ ). Животные были получены из биоколлекции Института физиологии РАН им. И.П. Павлова (SHR, WKY) и питомника Рапполово (Wistar).

Артериальное давление измеряли неинвазивным способом с помощью прибора PowerLab 4/35+NIPB Controller (AD instruments, Новая Зеландия) и программного обеспечения LabChart 8.1.5 2016 (AD instruments, Новая Зеландия).

При содержании и эвтаназии животных соблюдали принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.) и Правила надлежащей лабораторной практики (приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при Институте экспериментальной медицины (протокол № 1/22 от 18.02.2022).

Эвтаназию животных проводили под эфирным наркозом. Головной мозг извлекали и фиксировали погружением в цинк-этанол-формальдегид (Korzhevskii et al., 2015). Заливку в парафин проводили по общепринятой методике. Фронтальные срезы головного мозга толщиной 5 мкм изготавливали при помощи ротационного микротомы (Leica, Германия).

Для исследования была взята зона на уровне от  $-2,92$  мм до  $-3,60$  мм относительно брегмы (Paxinos, Watson, 1982), которая соответствовала основной части (main part) боковых желудочков по классификации Левингера (Levinger, 1971). В качестве обзорной гистологической окраски использовали окраску толуидиновым синим по методу Ниссля.

После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации срезы использовали для иммуногистохимического окрашивания. Для этого их предварительно подвергали тепловому демаскированию в 10%-ном водном растворе тиосульфата (патент No RU 2719163 C1), для предотвращения неспецифического связывания использовали раствор Protein block DPB-125 (Spring Bioscience, США).

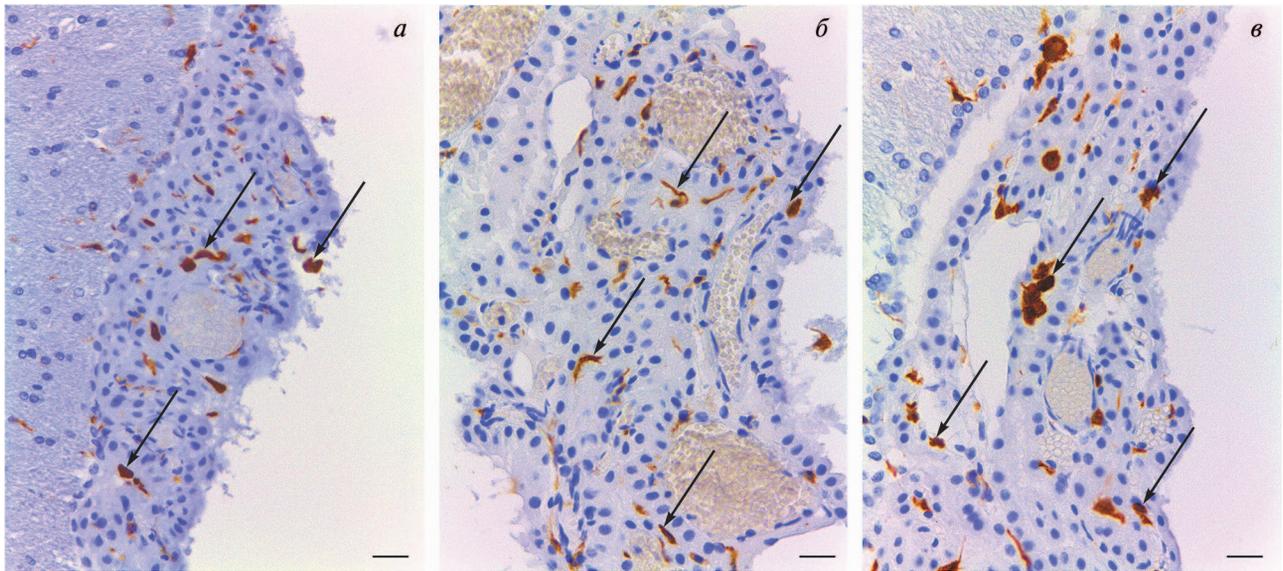
Маркирование клеток Колмера проводили с использованием кроличьих поликлональных антител к Iba-1 в разведении 1:1500 (Biocare Medical, США). Для иммуномаркирования макрофагов были использованы мышинные моноклональные антитела к CD68 (клон ED1) в разведении 1:4000 (AbCam, Великобритания).

Для сравнения Iba-1 и CD68 постановку иммуногистохимических реакций проводили на соседних последовательных срезах. Инкубацию в первичных реагентах вели в течение 18 ч при температуре 27 °С. В качестве вторичных реагентов использовали антитела из набора Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (Abcam, Великобритания).

Виментин выявляли при помощи мышинных моноклональных антител (клон V9) в разведении 1:100 (Agilent, США) при температуре 27 °С в течение 18 ч. В качестве вторичных реагентов использовали набор UltraVision Quanto HRP DAB Detection System (TL-060-QHL, Thermo Fisher Scientific, США). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3'-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). После постановки иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали гематоксилином.

Микроскопическое исследование препаратов в проходящем свете и фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и цифровую фотокамеру Leica ICC50 (Leica, Германия).

Для постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции на Iba-1 и виментин были использованы кроличьи поликлональные антитела к Iba-1 в разведении 1:500 (Biocare Medical, США) и мышинные моноклональные антитела к виментину клон V9 разведении 1:100 (Agilent, США) при температуре 27 °С в течение 18 ч. В качестве вторичных реагентов были выбраны антитела осла против кролика, конъюгированные с RRX (Jackson ImmunoResearch, США), моновалентный Fab фрагмент антимишного иммуноглобулина осла, меченный биотином (Jackson ImmunoResearch, США) и конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch, США).



**Рис. 1.** Фрагменты сосудистого сплетения боковых желудочков головного мозга крыс линии Wistar (*a*), Wistar-Kyoto (*б*), SHR (*в*). Иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1 с подкраской ядер гематоксилином. Объектив Plan-Apochromat 10×/0.22. Стрелки указывают на клетки Колмера. Масштабный отрезок равен 20 мкм.

Инкубацию со вторичными антителами проводили согласно рекомендациям производителя. Полученные препараты исследовали при помощи конфокального микроскопа LSM 800 (Zeiss, Германия). Параметры съемки препаратов были идентичными для всех исследуемых случаев.

Анализ полученных изображений проводили при помощи компьютерных программ ZEN-2012 (Zeiss, Германия) и ImageJ (NIH, США) (Rueden et al., 2017).

Для постановки отрицательного контроля антител на один из срезов обрабатываемой серии препаратов вместо раствора первичных антител наносили раствор для разведения антител Antibody Diluent (Spring Bioscience, США). Внутренним положительным контролем для иммуногистохимической реакции на виментин являлись мозговая оболочка и клетки эпендимной выстилки, а для реакции на Iba-1 — микроглия полушарий головного мозга.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На препаратах, окрашенных толуидиновым синим по Нисслю, не было выявлено видимых отличий в состоянии ChPI между разными группами животных. У крыс исследуемых линий отсутствовали морфологические признаки гидроцефалии. Эпителициты ChPI имели ровные контуры, ядра клеток были округлой или овальной формы. Капилляры ChPI имели широкий просвет без признаков дистрофии стенки (гиалиноза) и десквамации эндотелия. У крыс Wistar ворсинки сплетения

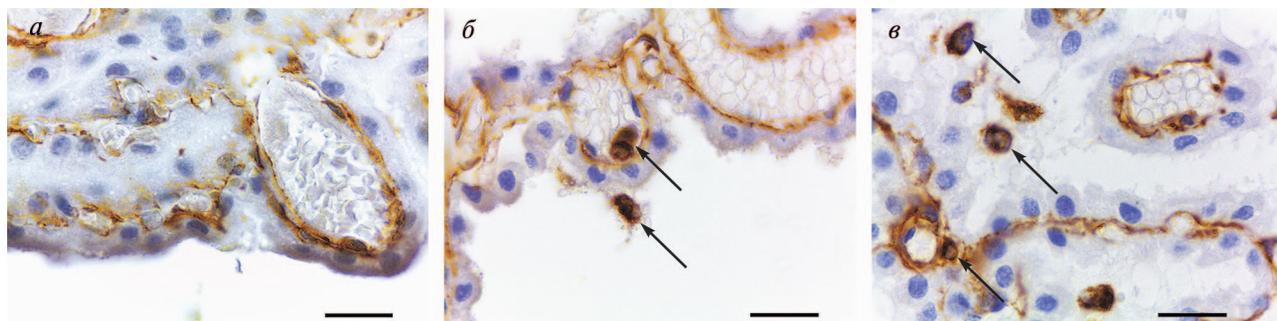
располагались более компактно вблизи стенки желудочка, чем у крыс WKY и SHR.

После проведения иммуногистохимической реакции на белок Iba-1, который является маркером микроглии и макрофагов, в полости желудочков на поверхности эпителия ворсинок ChPI выявлялись Iba-1-иммунопозитивные клетки (Iba-1-ИП) коричневого цвета, по своим морфологическим особенностям соответствующие клеткам Колмера. Iba-1-ИП — клетки округлой или овальной формы — располагались в непосредственной близости к сосудам в периваскулярном пространстве, строме ChPI, супраэпендимной зоне и свободно в ликворе за пределами ChPI (рис. 1).

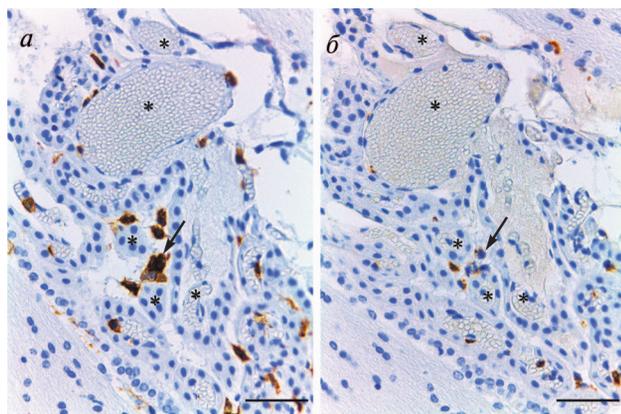
У крыс нормотензивных линий Wistar и WKY на срезах ChPI между ворсинками Iba-1-ИП клетки распределены равномерно. В срезах обнаруживаются как целиком попавшие в плоскость среза клетки, так и их фрагменты разной величины и формы. На поверхности ворсинок, обращенных в полость желудочков, встречаются клетки округлой формы, некоторые из них отдалены от поверхности ChPI на различные расстояния.

У крыс гипертензивной линии SHR распределение Iba-1-ИП клеток неравномерное, среди них появляются крупные округлые малоотростчатые или безотростчатые клетки Iba-1-ИП, которые формируют группы из 2–3 клеток (см. рис. 1*в*). В полости желудочка также выявляются единичные клетки на различном расстоянии от ChPI.

После проведения иммуногистохимической реакции на виментин у всех изученных животных на



**Рис. 2.** Виментин-иммунопозитивные клетки, ассоциированные с сосудистым сплетением в желудочках крыс линии Wistar (а), Wistar-Kyoto (б), SHR (в). Иммуноцитохимическая реакция на белок виментин с подкраской ядер гематоксилином. Объектив Plan-Apochromat 100×/1.25 Oil (масляная иммерсия). Стрелки указывают на виментин-положительные клетки. Масштабный отрезок равен 20 мкм.



**Рис. 3.** Совместная локализация Iba-1 и CD68 в клетках сосудистого сплетения крысы SHR на последовательных срезах. Иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1 (а) и CD68 (б) с подкраской ядер гематоксилином. Стрелки указывают на клетки Колмера, звездочки — топографические маркеры, указывающие на одни и те же структуры на а, б. Объектив Plan-Apochromat 40×/0.65. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

срезах головного мозга реакция высокой интенсивности наблюдалась в эпендимоцитах, клетках выстилающих полость желудочков, и в эндотелии капилляров. У крыс линий WKY и SHR выявлялись отдельные виментин-иммунопозитивные клетки (виментин-ИП) в просвете сосудов и на поверхности эпителия ворсинок ChP1 (рис. 2).

Постановка иммуногистохимической реакции на маркер, ассоциированный с провоспалительным фенотипом макрофагов — CD68 — показала, что не все Iba-1-ИП клетки экспрессируют данный маркер. Гранулярный продукт реакции CD68 выявляли только в крупных Iba-1-ИП безотростчатых клетках неправильной формы и в округлых клетках в ликворе (рис. 3).

У крыс линии Wistar после проведения двойной иммунофлуоресцентной реакции на белок Iba-1 и виментин не удалось выявить клетки,

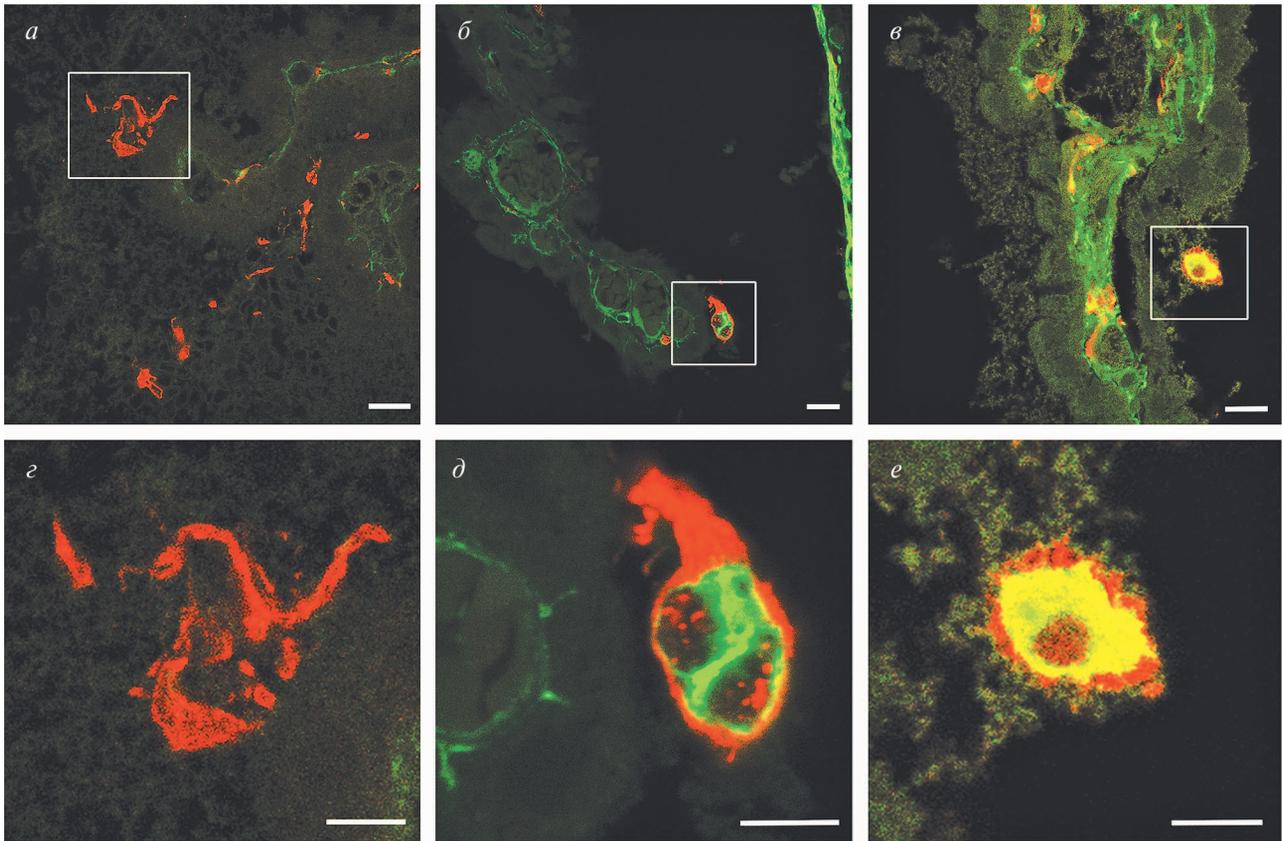
экспрессирующие оба маркера одновременно. На апикальной поверхности эпителия ворсинок располагались отростчатые клетки. Они имели крупные неветвящиеся отростки, напоминавшие цитоподии (рис. 4а, з).

У крыс линии WKY клетки, экспрессирующие оба маркера, встречались только на поверхности ворсин ChP1 и отсутствовали в строме (см. рис. 4б). Эти клетки, как правило, были округлой формы с одним утолщенным коротким отростком. Промежуточные филаменты, содержащие виментин, распределялись равномерно по телу клетки, за исключением одной или двух округлых зон (соответствующих ядру клетки), и не проникали в отростки. В свободном от виментина пространстве располагался гранулярный Iba-1ИП продукт реакции.

У крыс линии SHR на поверхности ворсин ChP1, обращенных друг к другу, и на поверхности, обращенной в полость желудочка, встречались отдельные клетки, экспрессирующие Iba-1 и виментин одновременно. Данные клетки имели овальную форму и короткие отростки. Виментин равномерно распределялся по всей цитоплазме (за исключением краевой зоны) вне области клеточного ядра. Iba-1-ИП мелкозернистый продукт реакции присутствовал как в отростках клеток Колмера, так и в цитоплазме (см. рис. 4е). Виментиновые промежуточные филаменты распределялись только по телу клетки и не проникали в Iba-1-ИП отростки, которые по своему виду напоминали складки плазматической мембраны.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1, который считается селективным макрофагальным маркером (Korzhevskii, Kirik, 2016),



**Рис. 4.** Клетки Колмера в сосудистом сплетении бокового желудочка в головном мозге крысы линии Wistar (*a, c*), WKY (*b, d*) и SHR (*g, e*). Двойная иммунофлуоресцентная окраска на Iba-1 и виментин, визуализация при помощи флуорохромов RRX (красный цвет) и Cy2 (зеленый цвет) соответственно. Конфокальная лазерная микроскопия. Объектив Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия); *a–g* — общий вид. Рамки ограничивают области, представленные на *c–e*. Масштабный отрезок — 10 мкм. *c, d, e* — отдельные клетки Колмера на поверхности сосудистого сплетения крыс линии Wistar (*c*), WKY (*d*) и SHR (*e*). Масштабный отрезок равен 5 мкм.

хорошо выявляет макрофаги на поверхности сосудистого сплетения, которые по своим морфологическим признакам и расположению относительно эпителия ворсинок ChPI, могут быть определены как клетки Колмера.

По данным литературы, типичные клетки Колмера имеют от трех до пяти основных цитоплазматических отростков (Ling et al., 1998), которые увеличивают площадь поверхности клеток и способствуют их прикреплению к апикальной поверхности эпителия ChPI в условиях тока ликвора. При активации клеток Колмера, как и клеток микроглии, наблюдается сокращение и утолщение отростков. Такое уменьшение площади соприкосновения способствует их отрыву от поверхности эпителия и перемещению с током ликвора.

Единичные клетки Колмера из обнаруженных в полости желудочка у крыс линии Wistar сохраняют свою отростчатую форму, и в них отсутствует виментин. Это может быть обусловлено тем, что в неактивированных клетках содержание этого

белка ниже минимального порогового уровня, необходимого для иммуногистохимической детекции.

Присутствие клеток Колмера в ликворе может свидетельствовать в пользу существования механизма, при котором небольшое количество таких клеток попадает в цереброспинальную жидкость и циркулирует в ее составе. Поскольку ChPI является зоной локализации гематоликворного барьера, его функциональная дисрегуляция может привести к попаданию в ликвор веществ, мониторинг и утилизацию которых осуществляют клетки Колмера.

Признаками активации клеток Колмера были округлая форма клеток, исчезновение крупных отростков и присутствие виментина (Jiang et al., 2012). Выявленные признаки активации не дают однозначного ответа на вопрос, с чем она связана. Наиболее вероятной представляется гипотеза о повреждении гематоликворного барьера при артериальной гипертензии у исследуемых животных.

По данным, полученным ранее с помощью электронной микроскопии (Ruchoux et al., 1992), у крыс линии SHR в эпителиальных клетках ChP1 гипертрофирован секреторный аппарат, что косвенно свидетельствует в пользу нарушения проницаемости гематоликворного барьера.

Интересным фактом, установленным в рамках проведенного исследования, является обнаружение признаков активации клеток Колмера у крыс нормотензивной линии Wistar-Kyoto. Крысы этой линии нередко используются в фундаментальных и клинических исследованиях в качестве контрольной группы к крысам линии SHR (H'Doubler et al., 1991; Yang et al., 2017). Однако отмечается, что крысы линии WKY демонстрируют повышенное тревожное и депрессивноподобное поведение, а также изменения в гипоталамо-гипофизарно-адреналовой, серотонинергической и дофаминергической системах, которые сопровождаются нейровоспалением (Millard et al., 2020). Все это свидетельствует о необходимости использования в исследованиях, выполняемых на крысах SHR, дополнительного контроля, в качестве которого могут быть использованы крысы Wistar.

Другим важным фактом, выявленным в рамках проведенного исследования, является присутствие гранулярных скоплений Iba-1 в ядре клеток Колмера у исследуемых животных. Этот феномен, как было установлено ранее (Korzhevskii et al., 2017), характерен для типичных клеток микроглии.

Таким образом, полученные данные согласуются с представлениями о родстве популяций микроглиоцитов и клеток Колмера. В настоящее время известно, что микроглиоциты происходят из клеток желточного мешка (Li, Vargas, 2017). О происхождении клеток Колмера сведения противоречивы. Не исключено, что клетки Колмера и микроглиоциты могут иметь общее происхождение.

Таким образом, проведенное исследование позволило охарактеризовать фенотипические особенности клеток Колмера у различных линий крыс. Показано, что клетки Колмера у трех исследованных групп животных различаются по своей функциональной активности.

Признаки активации клеток Колмера, включающие сокращение и утолщение отростков, приводящее к изменению формы клеток с отростчатой на округлую, отсутствуют у крыс линии Wistar, отмечаются у крыс линии WKY и ярко выражены у крыс линии SHR. Положительная иммуногистохимическая реакция на виментин в активированных клетках Колмера свидетельствует о взаимо-

связи его экспрессии с активацией микроглии и тканевых макрофагов и может служить дополнительным маркером активированных клеток.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования животных. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (заключение № 1/22 от 18.02.2022).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кирик О.В., Цыба Д.Л., Алексеева О.С., Колпакова М.Э., Яковлева А.А., Коржевский Д.Э.* 2021. Изменения клеток Колмера у крыс линии SHR после ишемии головного мозга. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. Т. 107. № 2. С. 177. <https://doi.org/10.31857/S0869813921010052> (*Kirik O.V., Tsyba D.L., Alekseeva O.S., Kolpakova M.E., Yakovleva A.A., Korzhevskii D.E.* 2021. Alterations in Kolmer cells in SHR line rats after brain ischemia. *Ross. Fiziol. Zh. im. I. M. Sechenova.* V. 107. No 2. P. 177)
- Al-Sarraf H., Philip L.* 2003. Effect of hypertension on the integrity of blood brain and blood CSF barriers, cerebral blood flow and CSF secretion in the rat. *Brain Res.* V. 975. P. 179. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02632-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02632-5)
- Amenta F., Di Tullio M.A., Tomassoni D.* 2003. Arterial hypertension and brain damage — evidence from animal models (review). *Clin. Exp. Hypertens.* V. 25. P. 359. <https://doi.org/10.1081/CEH-120023545>
- Beneš P., Macečková V., Zdráhal Z., Konečná H., Zahradníčková E., Mužík J., Šmarda J.* 2006. Role of vimentin in regulation of monocyte/macrophage differentiation. *Differentiation.* V. 74. P. 265. <https://doi.org/10.1111/J.1432-0436.2006.00077.X>
- Castro-Muñozledo F., Meza-Aguilar D.G., Domínguez-Castillo R., Hernández-Zequinely V., Sánchez-Guzmán E.* 2017. Vimentin as a marker of early differentiating, highly motile corneal epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* V. 232. P. 818. <https://doi.org/10.1002/JCP.25487>
- Fujishima M., Ibayashi S., Fujii K., Mori S., Fujishima M.* 1995. Cerebral blood flow and brain function in hypertension.

- Hypertens. Res. V. 18. P. 111. <https://doi.org/10.1291/HYPRES.18.111>
- González-Marrero I., Castañeyra-Ruiz L., González-Toledo J.M., Castañeyra-Ruiz A., De Paz-Carmona H., Castro R., Hernandez-Fernaund J.R., Castañeyra-Perdomo A., Carmona-Calero E.M.* 2013. High blood pressure effects on the blood to cerebrospinal fluid barrier and cerebrospinal fluid protein composition: a two-dimensional electrophoresis study in spontaneously hypertensive rats. *Int. J. Hypertens.* V. 2013: 164653. <https://doi.org/10.1155/2013/164653>
- González-Marrero I., Castañeyra-Ruiz L., M. González-Toledo J., Castañeyra-Ruiz A., de Paz-Carmona H., Ruiz-Mayor L., Castañeyra-Perdomo A., M. Carmona-Calero E.* 2012. High blood pressure effects on the brain barriers and choroid plexus secretion. *Neurosci. Med.* V. 3. P. 60. <https://doi.org/10.4236/NM.2012.31009>.
- González-Marrero I., Hernández-Abad L.G., Castañeyra-Ruiz L., Carmona-Calero E.M., Castañeyra-Perdomo A.* 2022. Changes in the choroid plexuses and brain barriers associated with high blood pressure and ageing. *Neurología (English Edition).* V. 37. P. 371. <https://doi.org/10.1016/J.NRLENG.2020.05.007>
- H'Doubler P.B., Peterson M., Shek W., Auchincloss H., Abbott W.M., Orkin R.W.* 1991. Spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats are genetically disparate. *Lab. Anim. Sci.* V. 41. P. 471. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1666150/>
- Jiang S.X., Slinn J., Aylsworth A., Hou S.T.* 2012. Vimentin participates in microglia activation and neurotoxicity in cerebral ischemia. *J. Neurochem.* V. 122. P. 764. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2012.07823.X>
- Korzhevskii D.E., Kirik O.V.* 2016. Brain microglia and microglial markers. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 46. P. 284. <https://doi.org/10.1007/S11055-016-0231-Z/METRICS>
- Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Alekseeva O.S., Sukhorukova E.G., Syrsova M.A.* 2017. Intranuclear accumulation of Iba-1 protein in microgliaocytes in the human brain. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 47. P. 435. <https://doi.org/10.1007/S11055-017-0417-Z/METRICS>
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O. V., Grigorev I.P.* 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur. J. Histochem.* V. 59. P. 5. <https://doi.org/10.4081/EJH.2015.2530>
- Levinger I.M.* 1971. The cerebral ventricles of the rat. *J. Anat.* V. 108. P. 447.
- Li Q., Barres B.A.* 2017. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* V. 18. P. 225. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
- Ling E.-A., Kaur C., Lu J.* 1998. Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the ependymal cells. *Microsc. Res. Tech.* V. 41. P. 43. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980401\)41:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1)
- Mahesh P.P., Retnakumar R.J., Mundayoor S.* 2016. Down-regulation of vimentin in macrophages infected with live *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by reactive oxygen species. *Sci. Rep.* V. 6. P. 21526. <https://doi.org/10.1038/srep21526>
- Maslieieva V., Thompson R.J.* 2014. A critical role for pannexin-1 in activation of innate immune cells of the choroid plexus. *Channels (Austin).* V. 8. P. 131. <https://doi.org/10.4161/CHAN.27653>
- Millard S.J., Weston-Green K., Newell K.A.* 2020. The Wistar-Kyoto rat model of endogenous depression: A tool for exploring treatment resistance with an urgent need to focus on sex differences. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* V. 101. P. 1. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2020.109908>
- Mor-Vaknin N., Punturieri A., Sitwala K., Markovitz D.M.* 2002. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat. Cell Biol.* V. 5. P. 59. <https://doi.org/10.1038/ncb898>
- Paxinos G., Watson C.* 1982. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. 480 p.
- Ruchoux M.M., Rosati C., Gelot A., Lhuintre Y., Garay R.* 1992. Ultrastructural study of the choroid plexus of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* V. 5. P. 851. <https://doi.org/10.1093/AJH/5.11.851>
- Rueden C.T., Schindelin J., Hiner M.C., DeZonia B.E., Walter A.E., Arena E.T., Eliceiri K.W.* 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinf.* V. 18. P. 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Yang F., Li H., Du Y., Shi Q., Zhao L.* 2017. Downregulation of microRNA-34b is responsible for the elevation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Med. Rep.* V. 15. P. 1031. <https://doi.org/10.3892/MMR.2017.6122>

## VIMENTIN IN KOLMER CELLS OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

**D. E. Korzhevskii<sup>a</sup>, V. A. Razenkova<sup>a, \*</sup>, O. V. Kirik<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia*

<sup>\*</sup>*E-mail: valeriya.raz@yandex.ru*

Epiplexus (Kolmer) cells are macrophage-like cells of the choroid plexus that help maintain the blood-cerebrospinal fluid barrier. Here we studied the structural organization of Kolmer cells in Wistar, Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive (SHR) rats. A comparative study using Iba-1, CD68 and vimentin immunohistochemistry showed that the functional activity of epiplexus cells differs in three examined groups of animals. Wistar-Kyoto and SHR rats showed noticeable signs of Kolmer cells activation, which consisted in the disappearance of cell processes resulting in the formation of round-shaped cells. Another significant observation was the presence of vimentin in activated epiplexus cells. The result obtained indicates that vimentin expression by phagocytic cells could be linked with their activation.

*Keywords:* Kolmer cell, spontaneously hypertensive rat, forebrain, choroid plexus, immunohistochemistry

Посвящается Маргарите Геннадьевне Белеховой, замечательному человеку, исследователю и эволюционисту, по случаю 90-летия.

УДК 57.012.3, 57.032, 57.033

## ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОБЛАСТИ CA1 ДОРСАЛЬНОГО ГИППОКАМПА У ВЗРОСЛЫХ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЮ

© 2024 г. Н. Л. Туманова<sup>1</sup>, Д. С. Васильев<sup>1</sup>, \*, Н. М. Дубровская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223, Россия

\* E-mail: dvasilyev@bk.ru

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 31.07.2023 г.

Принята к публикации 11.08.2023 г.

Работа посвящена исследованию нейродегенеративных изменений в ультраструктурной организации CA1 гиппокампа у взрослых крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию (пГГЦ). Методом электронной микроскопии в нейронных сетях области CA1 дорсального гиппокампа у взрослых крыс с пГГЦ, в отличие от контрольных животных, обнаружены признаки патологических изменений: дегенерация пирамидных нейронов, разрушение миелиновой оболочки аксонов, а также деструкция осевых цилиндров базальных и апикальных дендритов, направленных от нейронов пирамидного слоя в сторону *tractus temporoammonic* или коллатералей Шаффера соответственно. У контрольных животных на дистальных ответвлениях дендритов в слоях *stratum oriens* и *stratum radiatum* с помощью метода Гольджи выявлена густая сеть варикозных дендритных расширений, обеспечивающих увеличение площади синаптических контактов. У крыс, перенесших пГГЦ, в этих дендритных варикозных расширениях обнаруживаются значительные деструктивные изменения: разрушение крист митохондрий и появление расширенных цистерн. У взрослых крыс с пГГЦ полностью нивелирует предпочтение запаха валерианы, являющегося в норме физиологически значимым стимулом, что свидетельствует о негативном влиянии пГГЦ на работу обонятельного анализатора, деятельность которого тесно связана с гиппокампом. Полученные факты свидетельствуют о пагубном действии гомоцистеина на структуру и межнейронные связи в нервной ткани области CA1 дорсального гиппокампа как морфологического субстрата для интеграции поступающих в него стимулов.

**Ключевые слова:** крыса, гиппокамп, онтогенез, гипергомоцистеинемия, ультраструктурная организация, варикозное расширение дендритов, нейродегенеративное изменение, обоняние

**Принятые сокращения:** ГГЦ — гипергомоцистеинемия; пГГЦ — пренатальная ГГЦ; ГО — гликопротеин олигодендроцитов; ANOVA — дисперсионный анализ.

**DOI:** 10.31857/S0041377124010083, **EDN:** HZKQJJ

Гипергомоцистеинемия — состояние организма при повышенном уровне содержания в тканях токсичной аминокислоты гомоцистеина, которая способна вызывать эксайтотоксическую гибель нейронов головного мозга и дисфункцию различных систем организма. В случае ГГЦ в организме матери отмечаются нарушение плацентарного кровотока и выработки ряда трофических факторов, что в свою очередь может привести к серьезным изменениям в процессе формирования мозга потомства в эмбриогенезе, а также его созревания и функционирования в раннем постнатальном онтогенезе (Vasilev et al., 2023).

В коре и гиппокампе мозга потомства крыс, подвергшихся действию экспериментально вы-

званной пренатальной ГГЦ (пГГЦ), в период с четвертых суток беременности до родоразрешения нами ранее были выявлены признаки отставания в развитии и нейродегенеративных изменений (Shcherbitskaia et al., 2021).

Среди наиболее характерных структурных изменений отмечали гибель проекционных пирамидных нейронов в новой коре и дорсальном гиппокампе на фоне развития нейровоспаления. Наибольшей выраженности нейровоспалительные процессы достигали в области CA1 дорсального гиппокампа, которая является важным интегративным центром, тесно связанным с неокортексом. Область CA1 играет важную роль в поведенческих ответах на внутреннюю и внешнюю

обонятельную, соматосенсорную, слуховую и зрительную информацию, а также принимает активное участие в организации сложных форм поведения крыс.

Развитие нейродегенеративного процесса, вызванного пГГЦ, сопровождалось нарушением функции синаптической передачи, что, в частности, выразилось в снижении долговременной потенциации и уменьшении пула лабильных грибовидных дендритных шипиков с шипиковым аппаратом, вовлеченных в ее обеспечение (Postnikova et al., 2022), что приводило к когнитивному дефициту.

Обонятельная система у животных имеет решающее значение для выживания во время решения таких задач, как выбор пищи и идентификация запаха хищника. Она также оказывает значительное влияние на социальные взаимодействия, репродуктивную функцию и многие другие формы поведения. Обоняние является уникальным среди сенсорных систем по своей относительной структурной консервативности на протяжении всей эволюции млекопитающих.

Было показано, что по сравнению с другими сенсорными системами, первичная обонятельная кора, включая переднее обонятельное ядро, обонятельный бугорок и пириформную кору, имеет функциональную связь с нейронными сетями гиппокампа (Zhou et al., 2021). Считается, что в отличие от других сенсорных систем связь гиппокампа с обонятельным анализатором достаточно тесна, что можно проследить в ходе эволюции млекопитающих (Allen, Fortin, 2013; Schwarz et al., 2013; Gass et al., 2014; Mechling et al., 2014; Liska et al., 2015; Lu et al., 2019). Между тем в ходе эволюции плацентарных млекопитающих неокортекс расширился, сместив функциональные сети гиппокампа от первичной сенсорной коры к ассоциативной коре (Buckner, Krienen, 2013). Так, функциональные сети гиппокампа человека преимущественно включают высшие ассоциативные области коры, в то время как у грызунов сохраняются связи с первичной сенсорной корой (Bergmann et al., 2016).

На модели пГГЦ обонятельную функцию ранее не рассматривали. Интеграция между различными отделами головного мозга особенно важна в пределах сенсорных анализаторов (в частности, обонятельного) и при организации двигательной активности животных.

Большинство структурных нарушений на модели пГГЦ было нами исследовано в первый месяц

постнатального онтогенеза, когда происходит нормализация уровня гомоцистеина и отмечаются нейровоспалительные процессы, тогда как информация об изменениях на взрослой стадии обрывочна, что определяет актуальность микроскопического и ультраструктурного изучения ткани гиппокампа взрослых пГГЦ животных.

Исходя из изложенного, цель настоящей работы заключалась в исследовании нейродегенеративных изменений ультраструктурной организации области CA1 дорсального гиппокампа у взрослых крыс, перенесших пГГЦ, а также нарушения поведения животных, связанного с обонятельной функцией.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проведена на крысах линии Wistar из питомника Рапполово (Санкт-Петербург, Россия). При проведении работ использовали разработанный ранее метод моделирования гипергомоцистеинемии (ГГЦ), основанный на дозированной метиониновой нагрузке, создаваемой путем принудительного перорального введения экспериментальным животным 0.15%-го водного раствора L-метионина (0.10–0.15 г в расчете на животное ежедневно), начиная с четвертых суток после оплодотворения и до родоразрешения (Арутюнян и др., 2012).

Самкам крыс контрольной группы в эти же сроки дополнительно перорально вводили воду. Морфологическое и поведенческое исследования проводили на самцах из потомства этих самок. С использованием световой и электронно-микроскопической техники проведено морфофункциональное исследование структурной организации области CA1 дорсального гиппокампа контрольных крыс и деструктивных изменений в ней у крыс, перенесших пГГЦ, через три месяца (стадия P90) после рождения.

**Световая микроскопия. Метод Ниссля.** Морфологический анализ состояния нервных клеток мозга проводили на других выборках животных: у контрольных и экспериментальных крыс на взрослой стадии развития, по девять животных в каждой группе. После транскардиальной перфузии 10%-ным нейтральным формалином на фосфатном буфере мозг резали на криостате Leica SM15105 (Leica, Германия), а полученные срезы дорсального гиппокампа толщиной 20 мкм окрашивали крезилвиолетом по методу Ниссля.

**Метод Гольджи.** Исследование особенностей направления и характера ветвления дендритных

отростков, расположение шипиков и варикозных расширений дендритов проводили хромосеребряным методом Гольджи. Взрослых контрольных крыс ( $n=10$ ) наркотизировали Золетилом (30 мг на 1 кг веса), декапитировали, извлекали мозг и фиксировали блок с тканью конечного мозга, содержащий гиппокамп. Использовали классический метод с двухнедельным осмированием и серебрением, сроком до одной недели. Процедуру подготовки материала проводили по протоколу, подробно описанному нами ранее (Белехова, Туманова, 1988). Мозг заливали в целлоидин и готовили серии фронтальных срезов толщиной 75–100 мкм.

Морфометрический анализ применяли для подсчета варикозных расширений и дендритных шипиков в зонах базальных и апикальных дендритов области CA1 дорсального гиппокампа. Число животных в выборке контрольной группы составляло 10.

Для анализа отбирали участки ткани *stratum oriens* ( $n=7$ ) и *stratum radiatum* ( $n=9$ ), на которых были одиночные дендритные отростки нейронов, характеризующиеся равномерной импрегнацией серебром. Подсчеты среднего количества дендритных шипиков и варикозных расширений осуществляли на ровных, прямых участках дендритов из слоев *stratum oriens* и *stratum radiatum*. Для каждой области интереса гиппокампа животного анализировали по восемь таких участков дендритов.

**Ультраструктурный анализ** нервной ткани мозга проводили у контрольных и крыс с пГГЦ на взрослой стадии развития, по два животных в каждой группе. Особи наркотизировали, как было описано ранее. Для изучения межклеточных взаимоотношений, структуры нейрита и особенностей синаптических контактов в области CA1 дорсального гиппокампа крыс проводили фиксацию ткани для электронно-микроскопического исследования методом транскардиальной перфузии смесью 1%-ного глутарового альдегида и 1%-ного формальдегида на 0.1M PBS pH 7.4.

Далее область мозга с гиппокампом дофиксировали 1%-ным раствором OsO<sub>4</sub>, контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в эпон по стандартному протоколу (Shcherbitskaia et al., 2021). На ультратоме LKB-III (LKB, Швеция) изготавливали ультратонкие срезы толщиной 50 нм, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit (FEI, США).

**Иммунофлуоресценция.** С целью сравнительной оценки миелинизации на сроках P20 и P90 у крыс в норме ( $n=9$ ) и при пГГЦ ( $n=9$ ) изучали распре-

деление маркерного белка миелиновых волокон — гликопротеина олигодендроцитов (ГО) методом иммунофлуоресцентного анализа. Использовали первичные антитела ab24022 в разведении 1:1000) и FITC-конъюгированные вторичные антитела ab6785 в разведении 1:200 (Abcam, США).

Исследовали участок области CA1 дорсального гиппокампа (4.5 мм от Bregma по атласу: Paxinos, Watson, 2007), вычисляя среднюю яркость свечения на участке шириной 500 мкм, охватывающем все слои *cornu ammoni* от *stratum oriens* до *stratum radiatum*. При этом отбирали для анализа участки слоев *stratum oriens* и *stratum radiatum* для количественного анализа.

Первый срез последовательности имел случайное расположение в пределах области интереса, дистанция между последующими была 40 мкм. В работе использовали двойную систему негативного контроля. Негативный контроль “ГО<sup>+</sup>-печень” представлял собой ткань печени крысы контрольной группы. На срезах проводили полную процедуру иммунохимического окрашивания ГО как первичными, так и вторичными антителами. Помимо этого, для каждого животного подбирали негативный контроль ГО<sup>-</sup> — соседние срезы гиппокампа, иммунохимическую реакцию в которых проводили только вторичными антителами в отсутствие первичных антител.

С помощью программы VideoTest Master Morphology (VideoTest, Санкт-Петербург, Россия) на каждом анализируемом участке гиппокампа (по семь участков от каждого животного) измеряли среднюю яркость иммунофлуоресцентного свечения визуализированного гликопротеина. Затем для каждого исследуемого участка вычисляли разность между измеренной средней яркостью свечения на участке и яркостью аналогичного поля, соответствующего негативного контроля, используя ее в дальнейшей статистической обработке в качестве индекса миелинизации.

Животных контрольной группы и с пГГЦ сравнивали по значению полученного индекса миелинизации при помощи непараметрического критерия Манна—Уитни.

**Тест на предпочтение запахов.** Взрослым (P90) животным из контрольной и с пГГЦ групп ( $n=15$  в группе) в течение 8 суток ежедневно предъявляли образцы запахов. Крысу сажали в центр камеры (1000×1000×400 мм) и в течение 15 мин регистрировали количество подходов к каждой открытой стеклянной емкости (диаметром и высотой по 30 мм) с каплей, объемом 0.1 мл одного из шести

эфирных масел на дне. Емкости с одорантами располагали по кругу на одинаковом расстоянии друг от друга и от стенок камеры, в которой проводили тестирование; их положение меняли при каждом новом предъявлении.

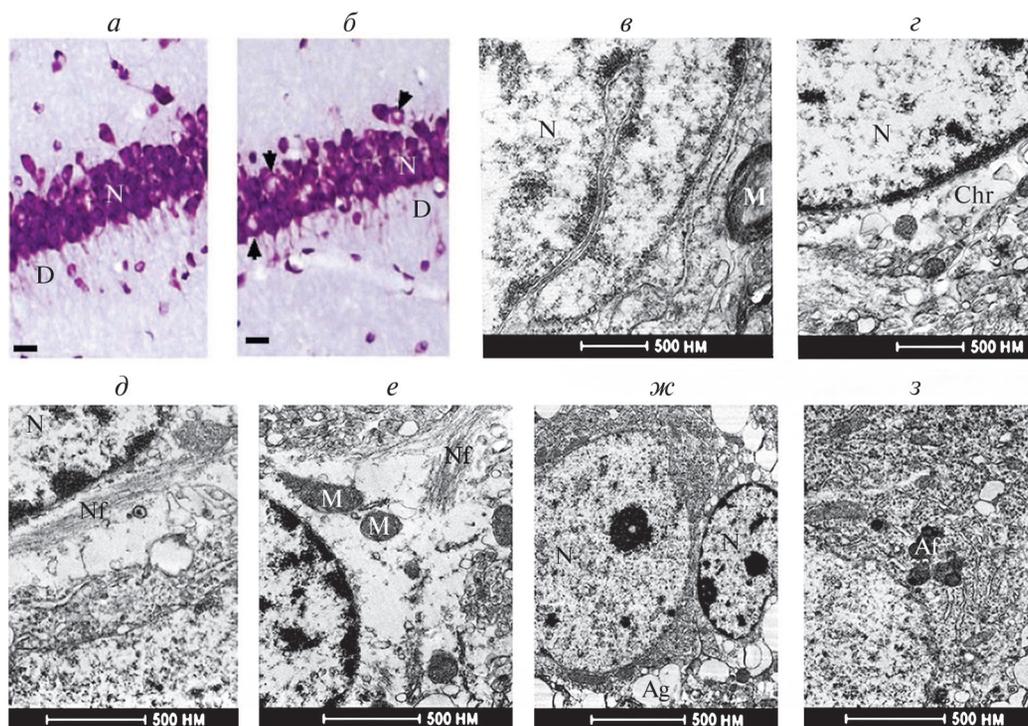
После каждого животного поверхности камеры протирали 50%-ным раствором этилового спирта. Для каждой крысы вычисляли усредненный по всем дням тестирования индекс предпочтения каждого запаха, который представлял число подходов к емкости конкретного одоранта в процентах от общего числа подходов ко всем емкостям с одорантами.

Использовали натуральные эфирные масла (гвоздики, мяты, эвкалипта, полыни, лаванды и валерианы). Из всего набора запахов только валериана обладала функционально значимым феромональным эффектом, универсальным для разных видов млекопитающих (Müller-Schwarze et al., 1974; Matsumoto-Oda et al., 2003; Мельник и др., 2009).

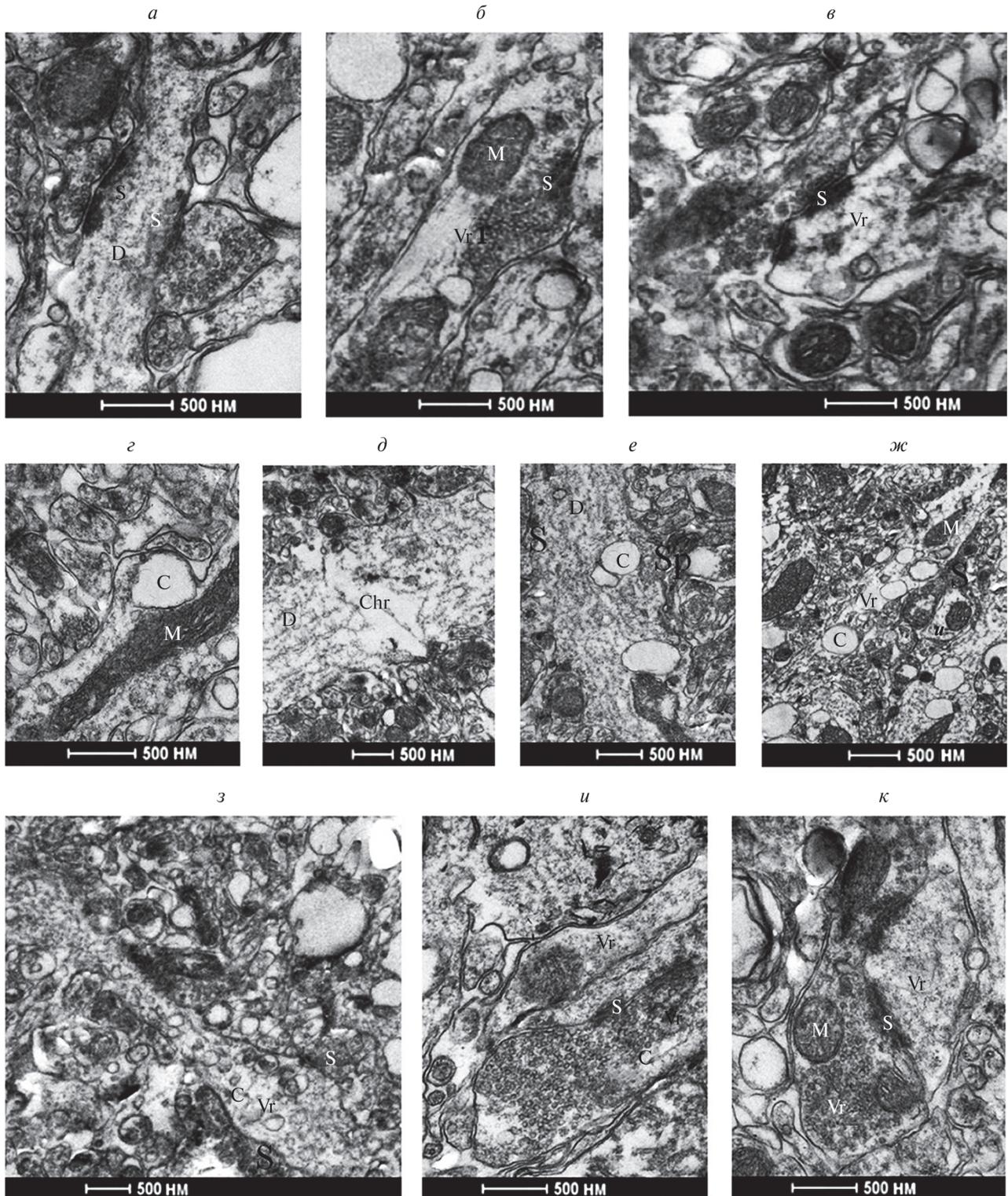
Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторной ANOVA с последующим *post hoc* анализом Бонферрони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Нейродегенеративные изменения в области CA1 дорсального гиппокампа крыс (P90), перенесших пГГЦ.** В пирамидном слое области CA1 дорсального гиппокампа взрослых крыс с пГГЦ, в отличие от контроля, обнаружены значительные изменения в строении нейронов, дегенерирующих по хроматолизному типу, с локальным исчезновением органоидов в цитоплазме. Хроматолиз наблюдался как на светооптическом уровне (рис. 1б в сравнении с рис. 1а) так и на электроннограммах (рис. 1г в сравнении с рис. 1в). Хроматолиз был нами отмечен и на ранних стадиях развития (Shcherbitskaia et al., 2021). Помимо него у взрослых животных обнаружен и нейрофиламентозный тип дегенерации, при которой происходит полное замещение цитоплазматических органелл нейрофиламентами (рис. 1д в сравнении с рис. 1в). Часто наблюдали выход этих нейрофиламентов из клетки в отростки нейронов (рис. 1е). В цитоплазме погибающих нейронов встречаются лизосомы и аутофагосомы в разных количествах и с разными формами (рис. 1з), наблюдается активация астроцитарной глии (рис. 1ж).



**Рис. 1.** Нейродегенеративные изменения клеток пирамидного слоя области CA1 дорсального гиппокампа у взрослых крыс, перенесших пГГЦ (б, г–з) в сравнении с контрольными (а, в); а, б — микрофотографии поля CA1 гиппокампа у крыс контрольных (а) и перенесших пГГЦ (б) крыс. Окраска по Ниссию, масштабная линейка: 30 мкм. Стрелками показаны пирамидные нейроны в состоянии хроматолиза; N — нейроны, D — дендриты. в–г — электроннограммы области CA1 гиппокампа крыс в контроле (в) и с пГГЦ (г–з); показаны хроматолиз (Chr, г), нейрофиламентозный тип клеточной дегенерации (д, е), выход нейрофиламентов в отросток нейрона (е), активация астроцитарной глии (ж) и аутофагосомы в цитоплазме нейрона (з). Ml — миелинизированные волокна, M — митохондрии, Nf — нейрофиламенты, Ag — отростки астроцитарной глии, Af — аутофагосомы.



**Рис. 2.** Деструктивные изменения базальных дендритов области CA1 дорсального гиппокампа. Электроннограммы крыс контрольных (*a–в*) и с пГГЦ (*г–к*) в возрасте P90. С — цистерны, CHR — хроматолит, D — дендриты, M — митохондрии, N — нейроны, S — синаптические терминалы с контактами, Sp — дендритные шипики, Vr — варикозные расширения.

По сравнению с контрольными животными у взрослых крыс с пГГЦ в зонах базальных и апикальных дендритов были обнаружены зна-

чительные разрушения в дендритных отростках. В цитоплазме осевого цилиндра дендритов появляется большое количество цистерн, полностью

разрушаются кристы митохондрий, тургор осевого цилиндра дендрита уменьшается, а его оболочка становится извитой. Эти признаки патологии наблюдаются и в базальных (рис. 2г–е), и в апикальных дендритах (рис. 3а–г) по сравнению с контролем (рис. 2а–в).

Расширенные цистерны обнаруживаются и в местах дендритов, откуда отходят шиповидные выросты и шипики (см. рис. 3в, г). Такие же деструктивные явления можно наблюдать и в строении многочисленных дендритных варикозных расширений базальных (см. рис. 2ж) и апикальных дендритов (см. рис. 3а, б).

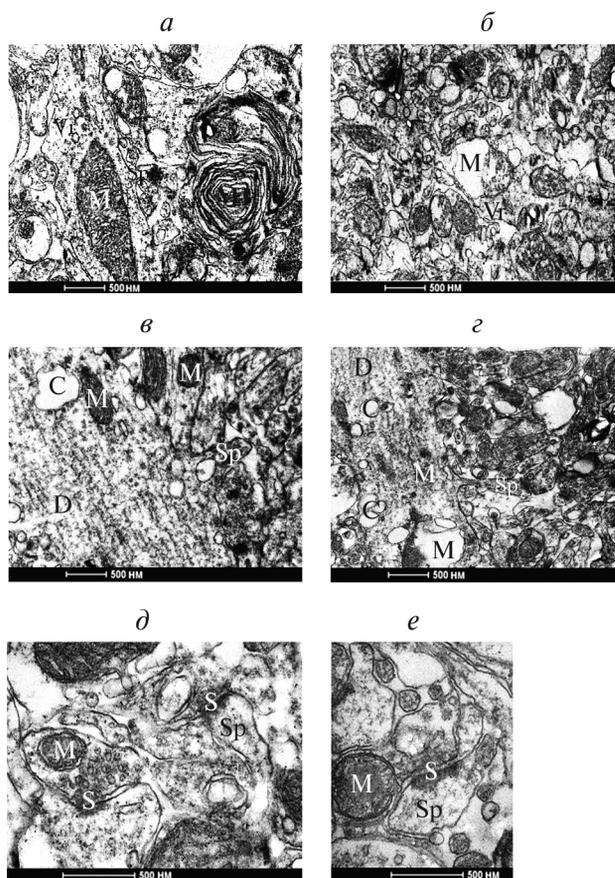
На рис. 2ж, з показаны мелкие варикозные расширения базальных дендритов. У них в осевых цилиндрах в цитоплазме заметны крупные цистерны (см. рис. 2г–е), разрушенные кристы митохондрий. Такие же признаки дегенеративных изменений обнаружены и в осевых цилиндрах апикальных дендритов (см. рис. 3а, б).

Из-за меньших размеров дистальных участков базальных дендритов, по сравнению с апикальными дендритами, варикозные расширения у первых гораздо меньшего размера и характеризуются большим количеством цистерн, занимающих значительный объем варикозного расширения (рис. 2ж, з).

Те же признаки разрушений заметны и в аксональных варикозных расширениях, у которых в зоне синаптических контактов происходит скопление синаптических пузырьков (см. рис. 2и, к). Шипики в основном находятся на дендритных ответвлениях между варикозными расширениями и имеют разнообразные формы: на длинной тонкой ножке с маленькой головкой, на толстой ножке с крупной головкой, либо встречаются шипики без головки (см. рис. 3д, е).

Для более полного понимания состояния нейронных сетей в области СА1 дорсального гиппокампа мы прибегли к данным, полученным с помощью хромосеребряного метода Гольджи у контрольных крыс. По этим данным, от тел пирамидных нейронов отходят многочисленные тонкие, длинные базальные дендриты размером до 300 мкм со вторичными и третичными ответвлениями, с многочисленными шипиками на их поверхности (рис. 4а–в).

Они направлены дорсально, перпендикулярно к поверхности гиппокампа. В слое *stratum oriens* базальные дендриты меняют направление и двигаются уже параллельно дорсальной поверхности гиппокампа, направляясь в *tractus temporo-ammoni*.

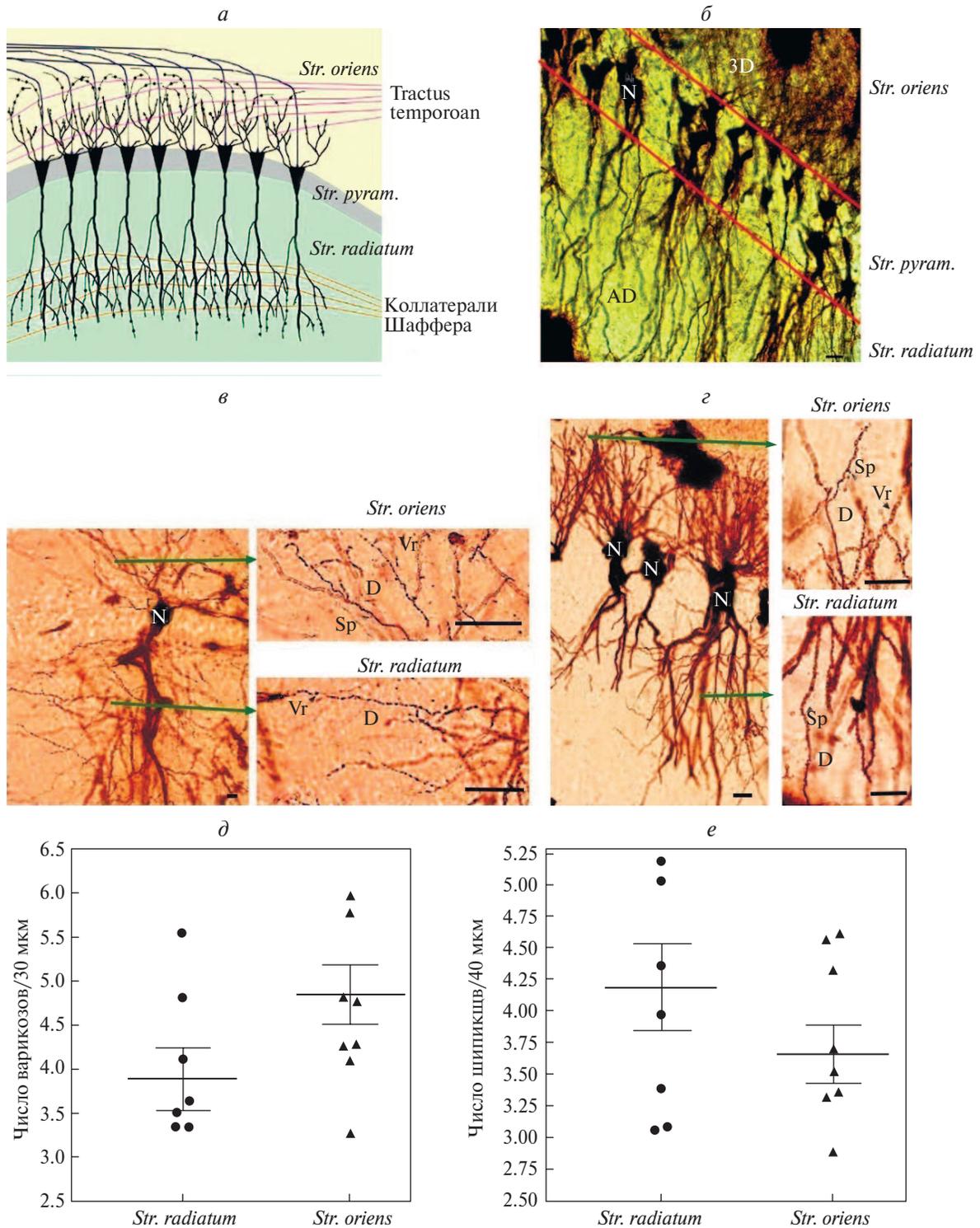


**Рис. 3.** Деструктивные изменения апикальных дендритов области СА1 дорсального гиппокампа. Электроннограммы крыс с пГГЦ в возрасте P90 (а–е). М1 — миелинизированные волокна, D — дендриты, M — митохондрии, Vg — варикозные расширения, C — цистерны, S — синаптические терминалы с контактами, Sp — дендритные шипики.

В этом тракте отмечены многочисленные варикозные расширения на ответвлениях базальных дендритов и аксонов, заметны шиповидные дендритные шипики.

Мощные апикальные дендриты с многочисленными ответвлениями, длиной до 500 мкм направлены от тел пирамидных нейронов вентрально в слой *stratum radiatum*, где проходят коллатерали Шаффера. Поверхность дендритных отростков густо усеяна многочисленными дендритными шипиками и варикозными расширениями. На дендритных ответвлениях второго и третьего порядка заметна густая сеть варикозных расширений. На рис. 4г показаны пирамидные нейроны с многочисленными отростками апикальных дендритов. Помимо многочисленных варикозных расширений, на дистальных участках дендритов встречается большое количество дендритных шипиков.

Морфометрический анализ показал, что у взрослых контрольных животных среднее чис-



**Рис. 4.** Структурная организация базальных и апикальных дендритов пирамидных нейронов области CA1 дорсального гиппокампа взрослых контрольных крыс: *a* — схематическое изображение цитоархитектоники области CA1 дорсального гиппокампа крыс; *б–г* — микрофотографии области CA1 дорсального гиппокампа взрослых (P90) контрольных крыс. Метод Гольджи, масштабная линейка 10 мкм, в центре располагается слой пирамидных нейронов (*Str. pyramidale*); *в* — варикозные расширения на базальных и апикальных дендритах пирамидных нейронов; *г* — мощные пучки базальных и апикальных дендритов с дендритными шипиками и варикозными расширениями; *д, е* — количественный анализ варикозных расширений (*д*) и дендритных шипиков (*е*) на участке базальных (*Str. oriens*) и апикальных (*Str. radiatum*) дендритов пирамидных нейронов у контрольных крыс; показаны средние значения и их ошибки. Обозначения: *Str.* — *stratum*, *N* — нейроны, *AD* — апикальные дендриты, *D* — дендриты, *BD* — базальные дендриты, *Vr* — варикозные расширения дендритов, *Sp* — дендритные шипики.

ло варикозных расширений в *stratum radiatum* в пересчете на 1 мкм длины участка дендрита составляло  $0.13 \pm 0.01$ , а в *stratum oriens* —  $0.03 \pm 0.01$  (см. рис. 4д). Распределение дендритных шипиков было неравномерным (на дистальных участках они были более многочисленны), среднее число дендритных шипиков в пересчете на 1 мкм составляло  $0.10 \pm 0.02$  в *stratum radiatum* и  $0.09 \pm 0.02$  в *stratum oriens* (см. рис. 4е). В проксимальной части дендритов, вблизи тел нейронов, шипики отсутствовали.

**Миелинизация у потомства крыс с пГГЦ.** Чтобы выявить возможные причины нарушений миелинизации аксонов у взрослых животных с пГГЦ, иммуногистохимически исследовали распределение ГО в период активной миелинизации волокон гиппокампа на P20 и P90.

У крыс, перенесших пГГЦ, в области СА1 дорсального гиппокампа наблюдали нейродегенеративные изменения по сравнению с контролем. В зонах базальных и апикальных дендритов области СА1 на взрослой стадии развития (P90) обнаружены признаки деструкции миелинизированных волокон, играющих важную роль в проведении стимулов в гиппокампе. В миелинизированных волокнах обнаружены изменение тургора аксоплазмы, деструкция крист митохондрий, появление в ней расширенных цистерн и значительное расслоение миелиновой оболочки в виде выпуклых карманов с закрученными ламеллами (рис. 5а, б; см. рис. 3а).

Для сравнения: на P20 у крыс с пГГЦ отмечено нарушение процесса миелинизации нервных волокон в области СА1 дорсального гиппокампа. Исследование распределения ГО в норме (см. рис. 5д, з) и при пГГЦ (см. рис. 5л, о) показало разницу индексов миелинизации, характеризующих темпы миелинизации нервных волокон.

Так, после пренатальной пГГЦ этот индекс в *stratum oriens* был снижен на 21.2% относительно уровня контроля (тест Манна–Уитни,  $U=10$ ,  $P=0.005$ ; см. рис. 5е), а в *stratum radiatum* — на 21.4% (тест Манна–Уитни,  $U=5$ ,  $P<0.001$ ; см. рис. 5м). На взрослой стадии (P90) статистически значимого различия между контрольной и экспериментальной группами не обнаружено ни в *stratum oriens* (тест Манна–Уитни,  $U=20$ ,  $P=0.08$ ; см. рис. 5у), ни в *stratum radiatum* (тест Манна–Уитни,  $U=26$ ;  $P=0.22$ ; см. рис. 5н).

В ткани печени крысы, в которой отсутствует ГО, иммунохимическая реакция отсутствовала. Полученные данные могут свидетельствовать об

отставании в процессе миелинизации афферентных и эфферентных волокон в области СА1 гиппокампа, а также указывать на развитие процесса расслоения миелиновой оболочки у пГГЦ-крысят, что согласуется с результатами электронной микроскопии на взрослых животных.

**Предпочтения запахов у взрослых крыс контрольных и с пГГЦ.** Результаты исследования показали, что крысы, перенесшие пГГЦ, активнее интересовались запахами: среднее число подходов к емкости с эфирными маслами у крыс с пГГЦ было выше ( $t=-2.42$ ,  $P=0.02$ , тест Стьюдента для независимых выборок), чем у контрольных животных, и составляло соответственно  $67.19 \pm 5.99$  против  $49.58 \pm 4.14$ . Контрольные животные наибольшее предпочтение отдавали маслу валерианы (рис. 6а): число подходов к емкости с ним преобладало над остальными пятью ( $F_{5, 84}=42.35$ ,  $P<0$ , однофакторный анализ ANOVA, тест post hocк Бонферрони).

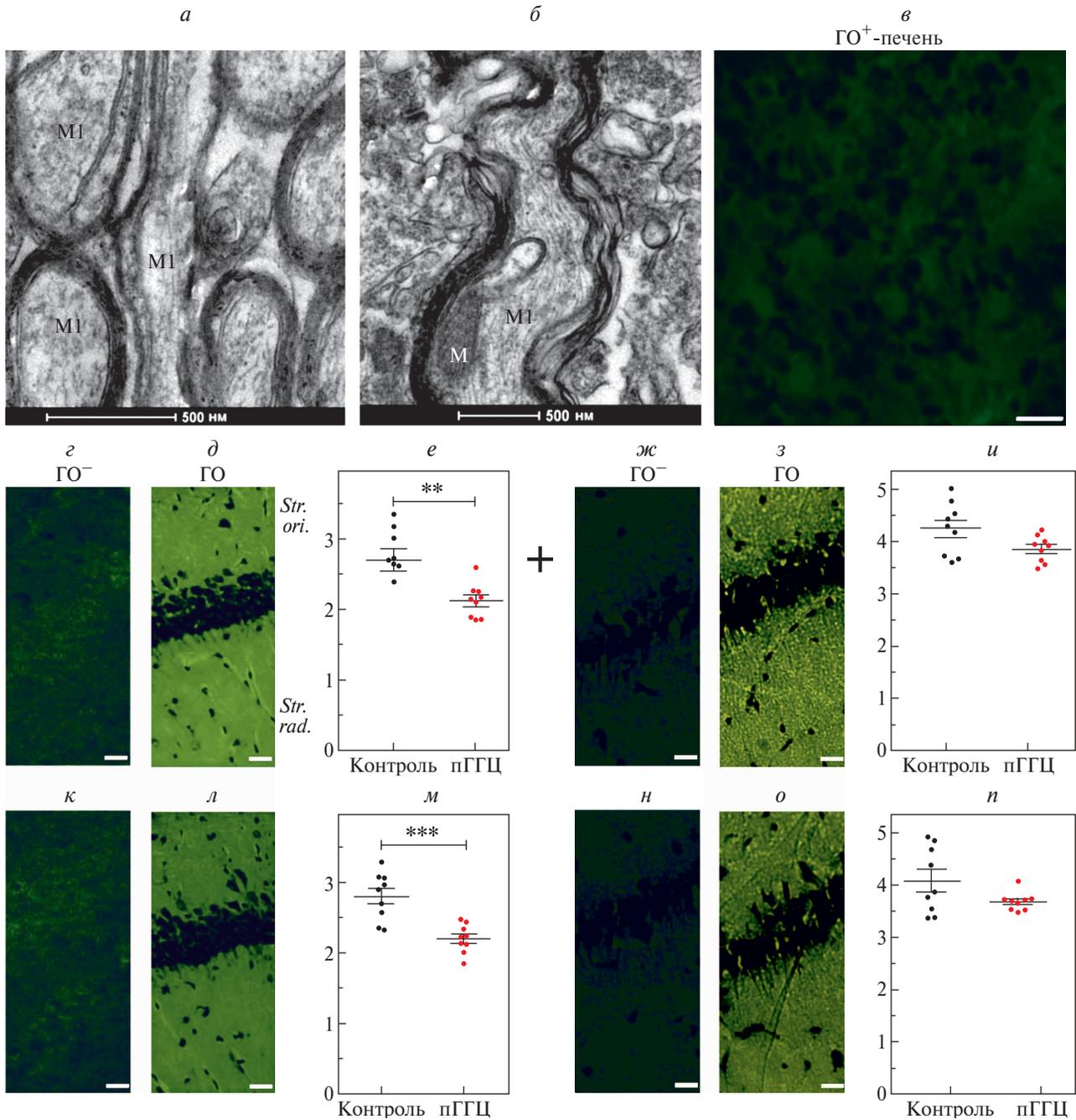
Реже всего контрольные крысы подходили к емкости с маслом полыни, однако статистически достоверной разницы с числом подходов к другим запахам, кроме валерианы, выявлено не было.

Внимание к запаху валерианы для крыс с пГГЦ находилось на уровне остальных четырех одорантов — гвоздики, мяты, эвкалипта и лаванды, за исключением запаха полыни (см. рис. 6б), характеризовавшимся наименьшим числом подходов к емкости с этим одорантом. Число подходов к емкости с запахом полыни статистически достоверно отличалось от такового для валерианы и гвоздики ( $F_{5, 84}=3.42$ ,  $P=0.039$  и  $P=0.006$  соответственно: однофакторный анализ ANOVA, тест post hocк Бонферрони).

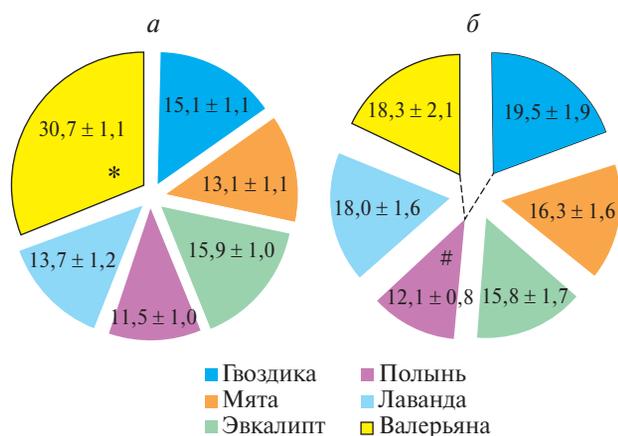
По сравнению с контрольными животными крысы, перенесшие пГГЦ, подходили к емкости с маслом валерианы в 1.5 раза реже ( $t=6.19$ ,  $P<0.0001$ , тест Стьюдента для независимых выборок). Поскольку считается, что масло валерианы обладает феромональными свойствами и является в норме физиологически значимым стимулом, можно сделать вывод о негативном влиянии пГГЦ на работу обонятельного анализатора.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При нарушении эмбрионального развития, в частности при пГГЦ, в области СА1 дорсального гиппокампа крыс обнаружены деструктивные изменения в ультраструктурной организации нейронных сетей этого важного отдела. Нами показана



**Рис. 5.** Влияние пГГЦ на миелинизацию нервных волокон в поле дорсального гиппокампа крыс: электроннограммы крыс контрольных (*a*) и с пГГЦ (*б*) в возрасте P90. MI — миелинизированные волокна, М — митохондрии; *в–п* — сравнение распределения гликопротеина олигодендроцитов (ГО, свечение FITC) в ткани печени контрольной крысы на P20 с первичными и вторичными антителами, масштаб: 40 мкм; *г, ж, к* — негативный контроль (GO<sup>-</sup> — иммунохимическая реакция на препарате ткани гиппокампа в отсутствие первичных антител); *е, и, м, п* — индекс миелинизации, усл. ед. (разница в яркости свечения между исследуемым участком ткани и соответствующем ему негативным контролем GO<sup>-</sup>) — результаты денситометрии иммунохимического окрашивания ГО в слое *stratum oriens* (*Str. ori.*: *е, и*) и в слое *stratum radium* (*Str. rad.*: *м, п*) у крыс на P20 (*е, м*) и P90 (*и, п*). Данные представлены в виде среднего и его ошибки. Звездочки показывают различия между контрольной группой и с пГГЦ на P20 при  $P=0.005$  (\*\*) и  $P=0.0008$  (\*\*\*) (непараметрический критерий Манна–Уитни).



**Рис. 6.** Схема распределения индексов предпочтения запаха одоранта взрослыми крысами — контрольными (а) и с пГГЦ (б). Индексы представлены разноцветными секторами и выражены числом подходов (средним значением и его ошибкой) к емкости с соответствующим одорантом натурального растительного масла в процентах от общего числа подходов ко всем емкостям. Черной границей выделен сектор, соответствующий физиологически значимому запаху валерианы. Штриховые линии между секторами указывают на статистически достоверные различия индексов предпочтения между одорантами у животных с пГГЦ. Объем каждой выборки  $n = 15$ . Однофакторный анализ ANOVA с последующим анализом post hoc Бонферрони. \* — предпочтение запаха валерианы относительно других пяти запахов достоверно при  $P < 0.0001$ ; # — предпочтение запаха полыни относительно гвоздики, а также запаха полыни относительно валерианы достоверны при  $P < 0.05$ .

но, что после пГГЦ в раннем онтогенезе (P5) во всех зонах CA1 дорсального гиппокампа у крыс появлялись признаки отставания в созревании и развитии основных элементов нервной ткани по сравнению с контрольными животными: большой объем межклеточного пространства, большое количество конусов роста, задержка в развитии дендритных и аксонных отростков и недостаточное развитие органоидов в цитоплазме нейронов (Shcherbitskaia et al., 2021; Vasilev et al., 2023).

В данной работе мы исследовали влияние гомоцистеина на изменения в ультраструктурной организации гиппокампа крыс пГГЦ в более поздний период онтогенетического развития — у взрослых крыс на P90. Обнаружено, что большинство дегенерирующих нейронов пирамидного слоя CA1 подвержены не только хроматолизу, но и филаментозному типу дегенерации и окружены многочисленными отростками активированной астроглии.

В цитоплазме дегенерирующих нейронов обнаружено большое количество аутофагосом и лизосом. Показано, что повышенный уровень

провоспалительных цитокинов свидетельствует о нейровоспалительной реакции в гиппокампе взрослых крыс после пГГЦ, что наблюдали и на более ранних этапах онтогенеза (Shcherbitskaia et al., 2021).

В зонах расположения базальных и апикальных дендритов происходят нейродегенеративные изменения в проводящих путях: распад миелинизированных волокон, деструкция базальных дендритов (в слое *stratum oriens*) и апикальных дендритов (в слое *stratum radiatum*), а также в дендритных варикозных расширениях, расположенных в большом количестве на дистальных участках этих дендритов, направленных в тракты *tractus temporoammoni* и коллатерали Шаффера. Согласно данным электронной микроскопии, у контрольных животных дегенеративных изменений в этих варикозных расширениях не возникает.

В более ранних наших исследованиях по влиянию гомоцистеина на формирование отделов мозга крыс было показано, что на ранних стадиях (P5) постнатального развития крыс, миелиновая оболочка у аксональных волокон в CA1 еще не сформирована (Shcherbitskaia et al., 2021). Однако на P20 в CA1 дорсального гиппокампа нами отмечено снижение иммунохимической реакции на ГО, что может свидетельствовать об отставании процесса миелинизации аксонов у крысят с пГГЦ и о нарушении слоев миелина. ГО (myelin oligodendrocyte glycoprotein) является важным маркером миелинизации. Он локализован как на поверхности олигодендроцитов, так и во всех миелинизированных волокнах гиппокампа и участвует в стабилизации и интеграции слоев миелина.

Показана его роль в патогенезе рассеянного склероза (Berger et al., 2003). Из данных литературы известно, что ГО вовлечен в стабилизацию слоев миелина и рассматривается в качестве перспективного маркера для выявления демиелинизации в экспериментальных моделях и диагностики демиелинизирующих заболеваний (Kitley et al., 2012). Его недостаточная экспрессия или нейтрализация специфическими антителами (Berger et al., 2003; Kitley et al., 2012) вызывает дезинтеграцию (расслоение) миелиновых слоев, аналогичное таковому при рассеянном склерозе (Ketelslegers et al., 2015), аутоиммунном энцефаломиелите (Kezuka et al., 2012) и нашим наблюдениям в данном исследовании. Сведения об изменении распределения ГО на P20 согласуются с результатами дезинтеграции миелиновых слоев у взрослых животных, описанными в настоящей работе.

По сравнению с контрольными крысами все перечисленные признаки дегенеративных изменений нейронов пирамидного слоя, миелинизированных волокон, немиелинизированных аксонов, дендритов и варикозных расширений зоны базальных дендритов и зоны апикальных дендритов свидетельствуют о токсическом действии гомоцистеина и серьезном нарушении строения нервной ткани в области CA1 дорсального гиппокампа крыс, перенесших пГГЦ, и указывают на возможность снижения пластичности этого важного отдела мозга, которое отражается на поведении животных.

Ранее нами было показано, что пГГЦ нарушает обучение и память у взрослых животных (Postnikova et al., 2022). Поскольку гиппокамп является одним из звеньев обонятельного анализатора, в представленной работе мы исследовали влияние пГГЦ на обоняние и обнаружили, что пГГЦ способна влиять на поведение взрослых крыс, сопряженное с обонятельной функцией.

В норме среди шести запахов натуральных эфирных масел наиболее привлекательным для всех контрольных крыс являлось валериановое масло. Этот результат согласуется с нашими данными, описанными ранее (Dubrovskaya et al., 2022) и является вполне закономерным, поскольку компоненты валерианового масла, в частности, изовалериановая кислота, имеют феромональное значение для этого вида животных и широко используются при исследовании обонятельной функции у грызунов (Борякова и др., 2007; Мельник и др., 2009, 2012). У взрослых крыс пГГЦ полностью нивелировала предпочтение запаха валерианы, являющегося в норме физиологически значимым стимулом, поэтому можно сделать вывод о пагубном влиянии пГГЦ на нормальную работу обонятельного анализатора.

У взрослых контрольных крыс с помощью метода Гольджи нами было показано, что при вхождении в тракты *temporaammonic* и коллатерали Шаффера на поверхности дистальных отрезков базальных и апикальных дендритов появляется густая сеть варикозных расширений.

Морфометрический анализ, проведенный на светооптическом уровне показал, что количество дендритных шипиков в *stratum radiatum* больше, чем в *stratum oriens*, а дендритных варикозных расширений больше в *stratum oriens*, чем в *stratum radiatum*.

Сходные признаки вхождения в тракты нервных волокон и дендритов с варикозными расширениями мы наблюдали ранее в таламусе и в амигдале

у рептилий, где также осуществлялись интегративные связи в рамках различных сенсорных систем (Белехова, Туманова, 1988). Авторы отмечали сходство принципов организации мозга, осуществляющих такую интегративную деятельность у животных в эволюционном ряду позвоночных (Белехова, Туманова, 1988). На основании полученных фактов можно судить о специфичности восприятия разномодальных импульсов и сделать принципиально важный вывод относительно появления других приспособительных систем в ряду позвоночных животных.

Факт вхождения в тракты дендритов с варикозными расширениями свидетельствует об увеличении специализированной поверхности для аксодендритических синапсов. Согласно представлениям об особенностях организации и строении отделов мозга низших позвоночных животных, истоки гетеросенсорной конвергенции базируются на филогенетически древних механизмах афферентации нейронных сетей мозга у низших позвоночных. Поэтому прогрессивная специализация сенсорных центров в эволюции позвоночных животных проходила путем преобразования этих систем (Белехова, Туманова, 1988).

Образование густой сети варикозных расширений на дендритных отростках CA1 свидетельствует о специализированном построении нейронных сетей с значительным увеличением контактной синаптической поверхности с многофункциональными волокнами, направленными в гиппокамп. Наблюдавшиеся нами признаки нейродегенеративных изменений в проводящих путях в области CA1 дорсального гиппокампа крыс с пГГЦ в раннем онтогенезе и у взрослых крыс, а также нарушенное поведение указывают на возможное изменение в построении нейронных сетей.

В литературе отмечена повышенная чувствительность сенсорных систем и когнитивных функций к действию повреждающих факторов (Rice, Barone, 2000). Нарушение этих функций наблюдается при развитии различных нейродегенеративных процессов как в случае старения (развитие нейродегенеративных заболеваний — Ribaut-Barassin et al., 2003), так и у потомства животных при различных осложнениях беременности (Rice et al., 2000).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что пГГЦ влияет на структуру ткани области CA1 дорсального гиппокампа крыс, являющейся важным интегративным центром, участвующим в обработке разномодальных стимулов. Действие пГГЦ

вызвало деструктивные изменения нервной ткани, обнаруженные нами в области CA1 дорсального гиппокампа не только в раннем онтогенезе, но и на взрослой стадии.

Наблюдаемые нарушения могут оказывать пагубное влияние на работу сенсорных систем, а также на когнитивные функции.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.В. Михель (ИЭФБ, Санкт-Петербург) за помощь в постановке модели пГГЦ. Электронную микроскопию проводили на оборудовании центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН с помощью оборудования для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ 075-00967-23-00) без сторонней финансовой поддержки.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводили в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive 86/609 for the Care of Laboratory Animals).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

Н.Л. Туманова: идея работы и планирование эксперимента, написание и редактирование текста; Н.Л. Туманова, Д.С. Васильев, Н.М. Дубровская: сбор данных и их обработка; текст и рисунки одобрены всеми соавторами.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Арутюнян А.В., Милютин Ю.П., Залозная И.В., Пустыгина А.В., Козина Л.С., Корневский А.В. Использование различных экспериментальных моделей гипергомо-

цистеинемии в нейрохимических исследованиях. *Нейрохимия*. 2012. Т. 29. № 2. С. 83. (Arutjunyan A., Kozina L., Stvolinskiy S., Bulygina Y., Mashkina A., Khavinson V. 2012. Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia. *Int. J. Clin. Exper. Med.* 5(2). P. 179).

Белехова М.Г., Туманова Н.Л. Структурные основы слухо-соматического взаимодействия в мозгу черепахи *Emys orbicularis*. Дендритный обмен между ядрами. *Журнал эвол. биохим. и физиол.* 1988. Т. 24. № 3. С. 326. (Belekhova M.G., Tumanova N.L. 1988. Structural bases of audio-somatic interactions in turtle *Emys orbicularis* brain. Dendrite exchange between nuclei. *J. Evol. Biochem. Physiol. (Russ.)* V. 24. P. 326.)

Борякова Е.Е., Гладышева О.С., Крылов В.Н. Возрастная динамика обонятельной чувствительности у самок лабораторных мышей и крыс к запаху изовалериановой кислоты. *Сенсорные системы*. 2007. Т. 21. № 4. С. 341. (Boryakova E.E., Gladysheva O.S., Krylov V.N. 2007. Age dynamics of olfactory sensitivity in female laboratory mice and rats to the smell of isovaleric acid. *Sensory systems*. V. 21. P. 341.)

Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н. Возрастные изменения обонятельной чувствительности самцов мышей к запаху изовалериановой кислоты. *Сенсорные системы*. 2009. Т. 23. № 2. С. 151. (Mel'nik S.A., Gladysheva O.S., Krylov V.N. 2009. Age-related changes in the olfactory sensitivity of male mice to the smell of isovaleric acid. *Sensory systems*. V. 23. P. 151.)

Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н. Влияние предварительного воздействия паров изовалериановой кислоты на обонятельную чувствительность самцов домашней мыши. *Сенсорные системы*. 2012. Т. 26. № 1. С. 52. (Mel'nik S.A., Gladysheva O.S., Krylov V.N. 2012. Influence of preliminary exposure to isovaleric acid vapors on the olfactory sensitivity of male house mice. *V. 26 P. 52.*)

Allen T.A., Fortin N.J. 2013. The evolution of episodic memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 110. P. 10379.

Berger T., Rubner P., Schautzer F., Egg R., Ulmer H., Mayringer I., Dilitz E., Deisenhammer F., Reindl M. 2003. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *New England J. Med.* V. 349. 139. doi:10.1056/NEJMoa022328

Bergmann E., Zur G., Bershinsky G., Kahn I. 2016. The organization of mouse and human corticohippocampal networks estimated by intrinsic functional connectivity. *Cereb. Cortex*. 26. P. 4497–4512. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw327>

Buckner R.L., Krienen F.M. 2013. The evolution of distributed association networks in the human brain. *Trends Cogn. Sci.* V. 17. P. 648. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.09.017>

Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Tumanova N.L., Alekseeva O.S., Nalivaeva N.N. 2022. Prenatal hypoxia impairs olfactory function in postnatal ontogeny in rats. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 52. P. 262. <https://doi.org/10.1007/s11055-022-01233-3>

Gass N., Schwarz A.J., Sartorius A., Schenker E., Risterucci C., Spedding M., Zheng L., Meyer-Lindenberg A., Weber-

- Fahr W.* 2014. Sub-anesthetic ketamine modulates intrinsic BOLD connectivity within the hippocampal-prefrontal circuit in the rat. *Neuropsychopharmacol.* V. 39. P. 895.
- Ketelslegers I.A., Van Pelt D.E., Bryde S., Neuteboom R.F., Catsman-Berrevoets C.E., Hamann D., Hintzen R.Q.* 2015. Anti-MOG antibodies plead against MS diagnosis in an acquired demyelinating syndromes cohort. *Multiple Sclerosis.* V. 21. P. 1513. doi:10.1177/1352458514566666
- Kezuka T., Usui Y., Yamakawa N., Matsunaga Y., Matsuda R., Masuda M., Utsumi H., Tanaka K., Goto H.* 2012. Relationship between NMO-antibody and anti-MOG antibody in optic neuritis. *J. Neuro-Ophthalmol.* V. 32. P. 107. doi:10.1097/WNO.0b013e31823c9b6c
- Kitley J., Woodhall M., Waters P., Leite M.I., Devenney E., Craig J., Palace J., Vincent A.* 2012. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology.* 79 (12). P. 1273–1277. doi:10.1212/WNL.0b013e31826aac4e
- Liska A., Galbusera A., Schwarz A.J., Gozzi A.* 2015. Functional connectivity hubs of the mouse brain. *Neuroimage.* V. 115. P. 281. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.04.033
- Lu J., Testa N., Jordan R., Elyan R., Kanekar S., Wang J., Eslinger P., Yang Q., Zhang B., Karunanayaka P.* 2019. Functional connectivity between the resting-state olfactory network and the hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain Sci.* V. 9. P. 338. https://doi.org/10.3390/brainsci9120338
- Matsumoto-Oda A., Oda R., Hayashi Y., Murakami H., Maeda N., Kumazaki K., Shimizu K., Matsuzawa T.* 2003. Vaginal fatty acids produced by chimpanzees during menstrual cycles. *Folia Primatol (Basel).* V. 74. P. 75. https://doi.org/10.1159/000070000
- Mechling A.E., Hübner N.S., Lee H-L., Hennig J., von Elverfeldt D., Harsan L-A.* 2014. Fine-grained mapping of mouse brain functional connectivity with resting-state fMRI. *Neuroimage.* V. 96. P. 203. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.03.078
- Müller-Schwarze D., Müller-Schwarze C., Singer A.G., Silverstein R.M.* 1974. Mammalian pheromone: identification of active component in the subauricular scent of the male pronghorn. *Science.* V. 183. P. 860. https://doi.org/10.1126/science.183.4127.860
- Paxinos G., Watson C.* 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier: Amsterdam-Boston.
- Postnikova T.Y., Amakhin D.V., Trofimova A.M., Tumanova N.L., Dubrovskaya N.M., Kalinina D.S., Kovalenko A.A., Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Zaitsev A.V.* 2022. Maternal Hyperhomocysteinemia Produces Memory Deficits Associated with Impairment of Long-Term Synaptic Plasticity in Young Rats. *Cells.* V. 12. P. 58. https://doi.org/10.3390/cells12010058
- Ribaut-Barassin C., Dupont J-L., Haeberlé a-M., Bombarde G., Huber G., Moussaoui S., Mariani J., Bailly Y.* 2003. Alzheimer's disease proteins in cerebellar and hippocampal synapses during postnatal development and aging of the rat. *Neurosci.* V. 120. P. 405. doi:10.1016/S0306-4522(03)00332-4
- Rice D., Barone S.* 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* V. 108. P. 511. https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511
- Schwarz A.J., Gass N., Sartorius A., Zheng L., Spedding M., Schenker E., Risterucci C., Meyer-Lindenberg A., Weber-Fahr W.* 2013. The low-frequency blood oxygenation level-dependent functional connectivity signature of the hippocampal-prefrontal network in the rat brain. *Neurosci.* V. 228. P. 243. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.032
- Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Y.P., Tumanova N.L., Mikhel A.V., Zalozniaia I.V., Arutjunyan A.V.* 2021. Prenatal hyperhomocysteinemia induces glial activation and alters neuroinflammatory marker expression in infant rat hippocampus. *Cells.* V. 10. P. 1536. https://doi.org/10.3390/cells10061536
- Vasilev D.S., Shcherbitskaia A.D., Tumanova N.L., Mikhel A.V., Milyutina Y.P., Kovalenko A.A., Dubrovskaya N.M., Inozemtseva D.B., Zalozniaia I.V., Arutjunyan A.V.* 2023. Maternal hyperhomocysteinemia disturbs the mechanisms of embryonic brain development and its maturation in early postnatal ontogenesis. *Cells.* V. 12. P. 189. https://doi.org/10.3390/cells12010189
- Zhou G., Olofsson J.K., Koubeissi M.Z., Menelaou G., Rosenow J., Schuele S.U., Xug P., Voss J.L., Lane G., Zelano C.* 2021. Human hippocampal connectivity is stronger in olfaction than other sensory systems. *Progress Neurobiol.* V. 201. P. 102027. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102027

## STUDY OF NEURODEGENERATIVE CHANGES IN THE CA1 AREA OF THE DORSAL HIPPOCAMPUS IN ADULT RATS AFTER PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA

N. L. Tumanova<sup>a</sup>, D. S. Vasiliev<sup>a,\*</sup>, N. M. Dubrovskaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,  
Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223, Russia*

*\*E-mail: dvasilyev@bk.ru*

The work is devoted to the study of neurodegenerative changes in the ultrastructural organization in CA1 of the hippocampus in adult rats subjected to prenatal hyperhomocysteinemia (pHHC). Electron microscopy revealed signs of pathological changes in the CA1 neural networks of the dorsal hippocampus in adult pHHC rats, unlike in control ones: cell degeneration, destruction of the myelin sheath of axons, and destruction of axial cylinders of basal and apical dendrites directed from the pyramidal neurons to the Schaffer collaterals and the temporo-ammonic tractus. In control animals, a dense network of varicose extensions in the distal branches of the dendrites in the stratum oriens and stratum radiatum layers was detected using the Golgi method, providing an increased area for synaptic contacts. In pHHC rats, significant destructive changes are found in these dendritic varicosities: destruction of mitochondrial cristae and appearance of huge cisterns. In adult rats, pHHC completely negated the preference for the smell of valerian, which is a physiologically significant stimulus in the norm, indicating the negative effect of pHHC on the work of the olfactory analyzer, whose activity is closely connected with the hippocampus. These findings indicate the deleterious effect of homocysteine on the formation of the dorsal hippocampus as a morphological substrate for the integration of the incoming impulses.

*Keywords:* hippocampus, rat, hyperhomocysteinemia, ontogenesis, ultrastructural organization, neurodegenerative change, dendrite varicose, olfaction

УДК 612.816:612.815.2:576.5:577.25

## ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИСТРОФИНА, АКТИНА, ЛЕГКИХ И ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *Lumbricus terrestris*

© 2024 г. Л. Ф. Нуруллин<sup>1, 2, \*</sup>, Е. М. Волков<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012, Россия

<sup>2</sup> Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, 420111, Россия

\* E-mail: lenizn@yandex.ru

\*\* E-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 11.09.2023 г.

Принята к публикации 11.09.2023 г.

В мышечных клетках двигательной мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris* методами флуоресцентной микроскопии определены белки дистрофин, актин, быстрые и медленные изоформы тяжелых цепей миозина. Можно думать, что экспрессия этих белков осуществлялась на самых ранних этапах эволюционного формирования внутриклеточного сократительного аппарата двигательной ткани как у беспозвоночных, так и у позвоночных животных. Данное исследование позволит дополнить картину эволюционного формирования двигательной мышечной ткани.

**Ключевые слова:** дистрофин, актин, миозин, соматическая мышца, аннелиды

**Принятые сокращения:** TMP — тетраметилродамин.

**DOI:** 10.31857/S0041377124010099, **EDN:** НХУКМЖ

Белок дистрофин с молекулярной массой в 427 кДа широко представлен как в мышечной, так и нервной тканях позвоночных (Florczyk-Soluch et al., 2021; Sadoulet-Puccio, Kunkel, 1996). Подобный ему белок с массой в 140 кДа присутствует в аналогичных тканях морской пиявки *Pontobdella muricata* (Royuela et al., 1999, 2001).

Дистрофин стабилизирует сарколемму, прикрепляя внеклеточный матрикс к цитоскелету через F-актин и ряд других дистрофин-ассоциированных белков (Wilson et al., 2022). Показано, что дистрофин-ассоциированные белки вовлечены в процессы внутриклеточной сигнализации с участием нейрональной NO-синтазы, фосфоинозитолтрифосфата 2 и кальмодулина (Pilgram et al., 2010). Кроме того, дистрофин-ассоциированные белки необходимы для кластеризации рецепторов нейротрансмиттеров и ионных каналов, а также поддержания внутриклеточного гомеостаза Ca<sup>2+</sup> (Pilgram et al., 2010).

Основными моторными белками в соматических мышцах, обеспечивающими их сократительную функцию, являются молекулы актина и миозина (Sweeney, Holzbaaur, 2018). Последние состоят из легких и тяжелых цепей (Lowey et al., 1993).

У морской полихеты *Urechis unicinctus* обнаруживаются легкие и тяжелые цепи миозина (Kanzawa et al., 1991).

Легкие цепи миозина относятся к большому семейству Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков (Niezanski et al., 2003). У беспозвоночных увеличение внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> приводит к связыванию этих ионов с легкими цепями миозина и запуску каскада биохимических реакций. Так, актин взаимодействуя с миозиновой АТФазой приводит к гидролизу АТФ, что и запускает сокращение тяжелых цепей миозина (Fromherz, Szent-Györgyi, 1995). При этом главными сократительными белками толстых мышечных филаментов выступают именно тяжелые цепи миозина (Wells et al., 1996). Известно, что в соматической мускулатуре представлены быстрые и медленные изоформы тяжелых цепей миозина (Hooper, Thuma, 2005).

Актин играет важную роль в физиологических процессах, связанных с внутриклеточным Ca<sup>2+</sup>.

Актиновый цитоскелет модулирует вход  $\text{Ca}^{2+}$  через мембранные лиганд- и потенциал-активируемые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы. Освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума при участии IP3- и рианодиновых рецепторов модулируется полимеризацией и деполимеризацией актина (Wang et al., 2002). F-актин мышечной системы хорошо охарактеризован у представителей класса полихет (Filipova et al., 2006, 2010; Rüchel, Müller, 2007; Han et al., 2020). Следует отметить, что прямые доказательства присутствия дистрофина, актина и миозина в мышечных клетках соматической мышцы олигохет к настоящему времени отсутствуют.

С учетом изложенного целью настоящей работы стало иммунофлуоресцентное определение белков дистрофина, актина, легких и тяжелых изоформ миозина в мышечных клетках эволюционно первичной двигательной мускулатуры олигохеты *Lumbricus terrestris*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для приготовления препарата, дождевого червя *Lumbricus terrestris* разрезали сбоку по всей длине, отрезали головной и хвостовой концы, червя раскрывали и удаляли внутренние органы и перегородки между сегментами (Volkov et al., 2000). Далее фрагменты кожно-мышечного мешка дождевого червя длиной 10–15 сегментов закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древесы–Пакса (состав в мМ: 77 NaCl, 4 KCl, 43  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 6  $\text{CaCl}_2$ , 2 триса, 167 сахарозы, pH 7.4) около 30 мин при комнатной температуре ( $22 \pm 1$  °C). Затем в течение 30 мин препараты фиксировали в 2%-ном растворе р-формальдегида, отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатном буферном растворе. Препарат последовательно инкубировали 30 мин в 0.5%-ном растворе Тритона X-100, 15 мин в растворе, содержащем 5% нормальной козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% Тритона X-100 и еще 15 мин в растворе 1%-ного бычьего сывороточного альбумина и 0.5%-ного Тритона X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на фосфатно-солевом буфере.

Далее препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4 °C в растворе А с поли- и моноклональными антителами к дистрофину, быстрым и медленным изоформам тяжелых цепей миозина (все в разведении 1:100). Антитела к быстрым и медленным изоформам тяжелых цепей

миозина были выработаны в кролике и мышши, что позволяло проводить двойное иммуномечение исследуемых белков. Препараты отмывали в растворе А 3 раза по 30 мин. и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 488 или 647 (разведение 1:200) в растворе А.

Для подтверждения специфичности связывания антител с соответствующими белками проводили контрольные эксперименты. Для негативного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля проводили предварительную часовую инкубацию первичных антител с иммуногенным пептидом (в соотношении 1:10), на который вырабатывались первичные антитела. Затем в полученном растворе первичных антител с иммуногенным пептидом инкубировали препараты (Li et al., 2016). Отсутствие мечения антителами в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами.

Для окрашивания F-актина использовали токсин фаллоидин, конъюгированный с тетраметилродамином (TMR) в концентрации 10 мкМ. Мечение клеточных ядер проводили в присутствии красителя DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) при концентрации 5 мкМ.

После отмывки в фосфатном буфере препараты помещали в раствор фосфатного буфера с глицерином (1:1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США) с применением масляно-иммерсионного объектива 63×/1.4. Для возбуждения эмиссии флуорофоров применяли мультифотонный, Ar и He-Ne лазеры. Длины волн возбуждения: для флуорофоров Alexa 488 — 488, TMR — 543, Alexa 647 — 633, DAPI — 340 нм. Анализ полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (NIH, США).

Использовали следующие реактивы: р-формальдегид, трис, фосфатный буфер (137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1.4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2), Тритон X-100, нормальную козью сыворотку, бычий сывороточный альбумин, TMR-фаллоидин, DAPI, глицерин (Sigma-Aldrich, США); первичные кроличьи поликлональные антитела к дистрофину (ab85302; Abcam, Великобритания); первичные кроличьи поликлональные антитела к быстрой изоформе тяжелой цепи миозина (ab91506; Abcam, Велико-

британия); первичные мышечные моноклональные антитела к медленной изоформе тяжелой цепи миозина (ma1064; Bosterbio, США); иммуногенные пептиды, соответствующие поли- и моноклональным антителам (Abcam, Bosterbio); антитела вторичные конъюгированные с Alexa 488 или Alexa 647 (Invitrogen, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что антитела, выработанные против белка дистрофина позвоночных, способны метить также и дистрофин в соматических мышцахannelid (Royuela et al., 2001). В экспериментах мы окрашивали мышечные препараты дождевого червя антителами против дистрофина позвоночных.

На изображениях видно, что дистрофин присутствует во всех областях мышечной ткани, причем имеются участки с бледным (рис. 1, стрелки вниз) и более интенсивным (рис. 1, стрелки вверх) окрашиванием.

Таким образом, белок дистрофин широко представлен в мышечных клетках двигательной мышцы дождевого червя. Можно думать, что структурно и функционально он близок к своему аналогу в мышечной ткани высших хордовых и беспозвоночных. Последнее говорит в пользу того, что этот белок является обязательным и

функционально важным компонентом моторных мышечных клеток начиная с наиболее ранних этапов филогенетического развития двигательной мускулатуры животных.

Токсин фаллоидин, выделенный из гриба *Amanita phalloides* специфически связывается с фибриллярным F-актином (Dancker et al., 1975). Мы окрашивали мышечные препараты фаллоидином, меченым флуоресцентным красителем, и красителем DAPI (с родством к ядерной ДНК).

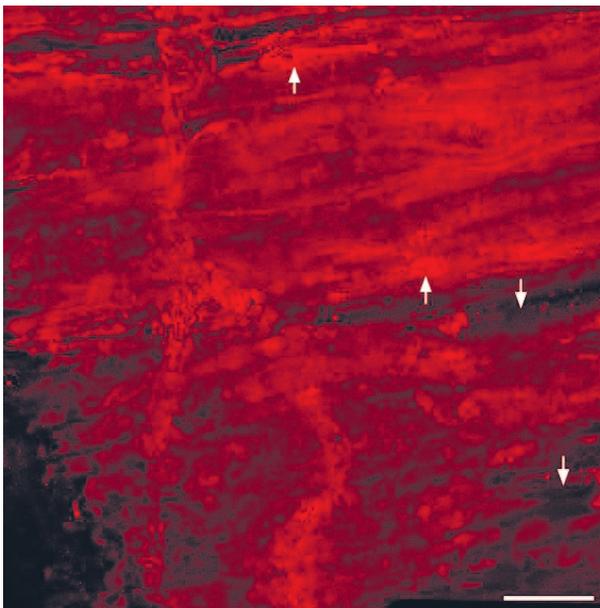
Аппликация флуоресцентномеченого фаллоидина выявила непрерывное окрашивание мышечных филаментов по всей их длине (рис. 2а). Таким образом, актиновый цитоскелет присутствует во всех частях мышечных клеток. Окрашивание DAPI выявило типичные интерфазные клеточные ядра с гетеро- и эухроматином (рис. 2б). На наших изображениях видно, что каждой мышечной клетке принадлежит одно или два клеточных ядра (рис. 2в, г). Этот факт подтверждает, что соматическая мускулатура дождевого червя состоит из мышечных клеток (рис. 2), в отличие от мускулатуры позвоночных, содержащей мышечные волокна, что согласуется с данными из литературы (Давид, 1990; Cadot et al., 2015).

Препараты дождевого червя метили антителами на быстрые и медленные изоформы тяжелых цепей миозина и наблюдали характерную косую исчерченность окрашивания мышечных клеток (рис. 3).

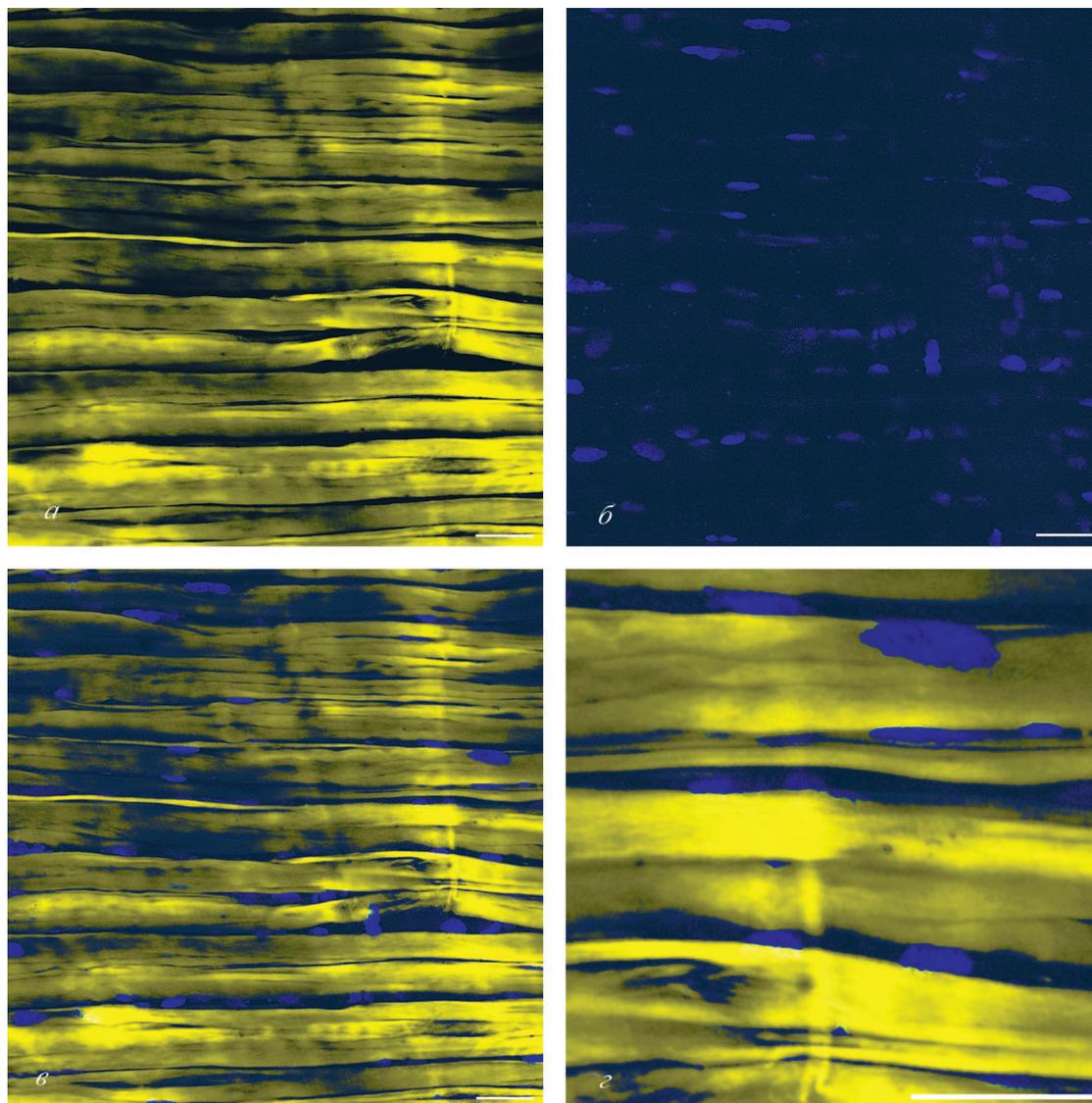
Были выявлены обе изоформы миозинов (рис. 3а, б). При этом такое окрашивание во многом совпадало, но в некоторых участках окрашивание на медленную изоформу находилось между участками, окрашенных на быструю изоформу (см. рис. 3в). Высокая специфичность связывания антител при мечении на быструю изоформу тяжелых цепей миозина позволила сделать более детальный снимок. Можно видеть, что блоки миофибрилл состоят из более мелких филаментов (рис. 4).

Таким образом, проведенные исследования показали наличие белков дистрофина, актина, быстрых и медленных изоформ тяжелых цепей миозина в мышечных клетках двигательной мышцы дождевого червя.

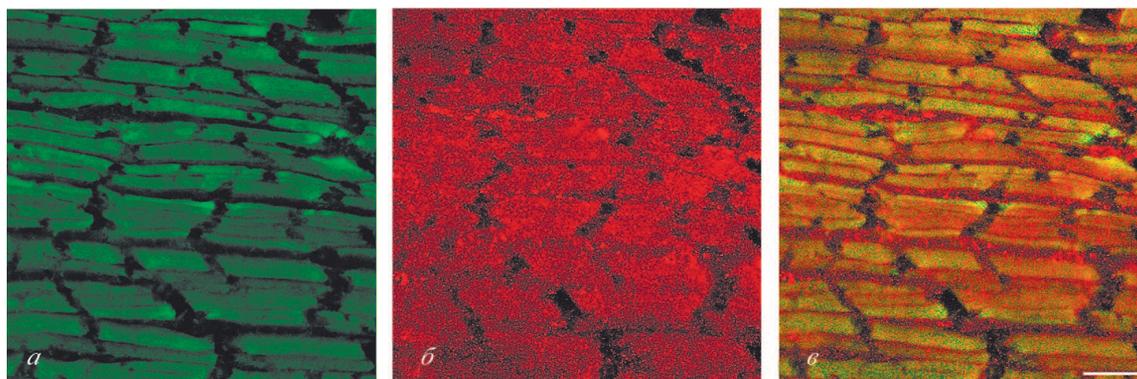
Согласно данным литературы, экспрессия дистрофина, актина и миозина обнаруживается у самого широкого круга представителей животного мира, включая хордовых, членистоногих и нематод (Meedel, 1983; Miller et al., 1983; Roberts, Bobrow, 1998; Giugia et al., 1999; Lovato et al., 2001; Mercer et al., 2011; Ono, Pruyne, 2012).



**Рис. 1.** Окрашивание препарата соматических мышечных клеток дождевого червя антителами к дистрофину. Стрелки вниз и вверх указывают соответственно на участки препарата с бледным окрашиванием и на районы с более интенсивным окрашиванием. Масштабная линейка: 20 мкм.



**Рис. 2.** Двойное окрашивание препарата соматических мышечных клеток дождевого червя на F-актин фаллоидином, меченым флуоресцентным красителем, и DAPI для выявления ядер клеток: *a* — окрашивание TMP-фаллоидином; *б* — окрашивание DAPI; *в* — наложение изображений *a* и *б*; *г* — увеличенная область изображения *в*. Масштабная линейка: 20 мкм.



**Рис. 3.** Выявление быстрой и медленной изоформ тяжелых цепей миозина в препарате соматических мышечных клеток дождевого червя при двойном флуоресцентном окрашивании антителами: *a* — окрашивание антителами на быструю изоформу тяжелых цепей миозина (зеленый цвет); *б* — окрашивание антителами на медленную изоформу тяжелых цепей миозина (красный цвет); *в* — наложение изображений *a* и *б*. Масштабная линейка: 20 мкм.

Можно думать, что экспрессия этих белков осуществлялась на самых ранних этапах эволюционного формирования внутриклеточного сократительного аппарата двигательной ткани как у беспозвоночных, так позвоночных животных. Проведенное исследование позволит дополнить картину эволюционного формирования двигательной мышечной ткани.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда № 23-24-00239 (<https://rscf.ru/project/23-24-00239/>).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют, что все манипуляции с животными соответствовали нормам российского законодательства, а также рекомендациям Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (<http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309053773>).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Давид О.Ф.* Морфофизиологические основы локомоцииannelid. АН СССР. Ин-т эвол. физиол. и биохим. им. И.М. Сеченова. Л.: Наука, 1990. 168 с. (*David O.F.* 1990. Morfofiziologicheskie osnovy lokomocii annelid. AN SSSR. In-t evoluc. fiziologii i biohimii im. I.M. Sechenova. L.: Nauka. 168 p.)
- Cadot B., Gache V., Gomes E.R.* 2015. Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle — one step at a time. *Nucleus*. V. 6. P. 373. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1090073>
- Dancker P., Löw I., Hasselbach W., Wieland T.* 1975. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 400. P. 407. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(75\)90196-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(75)90196-8)
- Filippova A., Purschke G., Tzetlin A.B., Müller M.C.M.* 2006. Three-dimensional reconstruction of the F-actin musculature of *Dorvillea kastjani* (Dorvilleidae, Polychaeta) by means of phalloidin-labelling and cLSM. *Scientia Marina*. V. 70(S3). P. 293. <https://doi.org/10.3989/scimar.2006.70s3293>
- Filippova A., Purschke G., Tzetlin A.B., Müller M.C.M.* 2010. Musculature in polychaetes: comparison of *Myrianida prolifera* (Syllidae) and *Sphaerodoropsis* sp. (Sphaerodoridae). *Invertebrate Biology*. V. 129. P. 184. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2010.00191.x>
- Florczyk-Soluch U., Polak K., Dulak J.* 2021. The multifaceted view of heart problem in Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Mol. Life. Sci.* V. 78. P. 5447. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03862-2>
- Fromherz S., Szent-Györgyi A.G.* 1995. Role of essential light chain EF hand domains in calcium binding and regulation of scallop myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92. P. 7652. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7652>
- Giugia J., Gieseler K., Arpagaus M., Ségalat L.* 1999. Mutations in the dystrophin-like *dys-1* gene of *Caenorhabditis elegans* result in reduced acetylcholinesterase activity. *FEBS Lett.* V. 463. P. 270. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01651-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01651-8)
- Han Y.H., Ryu K.B., Medina Jiménez B.I., Kim J., Lee H.Y., Cho S.J.* 2020. Muscular development in *Urechis unicinctus* (Echiura, Annelida). *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms21072306>
- Hooper S.L., Thuma J.B.* 2005. Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. *Physiol. Rev.* V. 85. P. 1001. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2004>
- Kanzawa N., Kawamura Y., Matsuno A., Maruyama K.* 1991. Characterization of myosin isolated from bodywall smooth muscle of the annelid, *Urechis unicinctus*. *Proc. Japan Acad.* V. 67. P. 176. <https://doi.org/10.2183/pjab.67.176>
- Li Y., Hu H., Butterworth M.B., Tian J.B., Zhu M.X., O'Neil R.G.* 2016. Expression of a Diverse array of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (SK1/3, IK1, BK) that functionally couple to the mechanosensitive TRPV4 channel in the collecting duct system of kidney. *PLoS One*. V. 11: e0155006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155006>
- Lovato T.L., Meadows S.M., Baker P.W., Sparrow J.C., Cripps R.M.* 2001. Characterization of muscle actin genes in *Drosophila virilis* reveals significant molecular complexity in skeletal muscle types. *Insect. Mol. Biol.* V. 10. P. 333. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00270.x>
- Lowey S., Waller G.S., Trybus K.M.* 1993. Function of skeletal muscle myosin heavy and light chain isoforms by an in vitro motility assay. *J. Biol. Chem.* V. 268. P. 20414. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)80744-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)80744-3)
- Meedel T.H.* 1983. Myosin expression in the developing ascidian embryo. *J. Exp. Zool.* V. 227. P. 203. <https://doi.org/10.1002/jez.1402270205>
- Mercer R.C., Mudalige W.A., Ige T.O., Heeley D.H.* 2011. Vertebrate slow skeletal muscle actin — conservation, distribution and conformational flexibility. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1814. P. 1253. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.06.009>
- Miller D.M. 3rd, Ortiz I., Berliner G.C., Epstein H.F.* 1983. Differential localization of two myosins within nematode thick filaments. *Cell*. V. 34. P. 477. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90381-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90381-1)
- Nieznanski K., Nieznanska H., Skowronek K., Kasprzak A.A., Stepkowski D.* 2003. Ca<sup>2+</sup> binding to myosin regulatory light chain affects the conformation of the N-terminus of essential light chain and its binding to actin. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 417. P. 153. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(03\)00382-5](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00382-5)
- Ono S., Pruyne D.* 2012. Biochemical and cell biological analysis of actin in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

- Methods. V. 56. P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.09.008>
- Pilgram G.S., Potikanond S., Baines R.A., Fradkin L.G., Noor-dermeer J.N.* 2010. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol. Neurobiol.* V. 41. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8089-5>
- Roberts R.G., Bobrow M.* 1998. Dystrophins in vertebrates and invertebrates. *Hum. Mol. Genet.* V. 7. P. 589. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.4.589>
- Royuela M., Hugon G., Rivier F., Paniagua R., Mornet D.* 2001. Dystrophin-associated proteins in obliquely striated muscle of the leech *Pontobdella muricata* (Annelida, Hirudinea). *Histochem. J.* V. 33. P. 135. <https://doi.org/10.1023/A:1017979623095>
- Royuela M., Paniagua R., Rivier F., Hugon G., Robert A., Mornet D.* 1999. Presence of invertebrate dystrophin-like products in obliquely striated muscle of the leech, *Pontobdella muricata* (Annelida, Hirudinea). *Histochem. J.* V. 31. P. 603. <https://doi.org/10.1023/A:1003855108802>
- Rüchel J., Müller M.C.M.* 2007. F-actin framework in *Spirorbis cf. spirorbis* (Annelida: Serpulidae): phalloidin staining investigated and reconstructed by cLSM. *Invertebr. Biol.* V. 126. P. 173. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2007.00087.x>
- Sadoulet-Puccio H.M., Kunkel L.M.* 1996. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol.* V. 6. P. 25. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1996.tb00780.x>
- Sweeney H.L., Holzbaur E.L.F.* 2018. Motor proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 10: a021931. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021931>
- Volkov E.M., Nurullin L.F., Svandová I., Nikolsky E.E., Vyskocil F.* 2000. Participation of electrogenic Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the membrane potential of earthworm body wall muscles. *Physiol. Res.* V. 49. P. 481. [http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/49/49\\_481.pdf](http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/49/49_481.pdf)
- Wang Y., Mattson M.P., Furukawa K.* 2002. Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J. Neurochem.* V. 82. P. 945. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01059.x>
- Wells L., Edwards K.A., Bernstein S.I.* 1996. Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *EMBO J.* V. 15. P. 4454. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00822.x>
- Wilson D.G.S., Tinker A., Iskratsch T.* 2022. The role of the dystrophin glycoprotein complex in muscle cell mechanotransduction. *Commun. Biol.* V. 5. P. 1022. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03980-y>

## IMMUNOFLUORESCENT IDENTIFICATION OF DYSTROPHIN, ACTIN, MYOSIN LIGHT AND HEAVY CHAINS IN SOMATIC MUSCLE CELLS OF EARTHWORM *Lumbricus terrestris*

L. F. Nurullin<sup>a, b, \*</sup>, E. M. Volkov<sup>a, \*\*</sup>

<sup>a</sup> Kazan state medical university, Kazan, 420012, Russia

<sup>b</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, 420111, Russia

\* E-mail: lenizn@yandex.ru

\*\* E-mail: euroworm@mail.ru

In muscle cells of the motor muscles of the earthworm *Lumbricus terrestris* dystrophin, actin, fast and slow isoforms of myosin heavy chains were identified by fluorescence microscopy. It can be assumed that the expression of these proteins was carried out at the earliest stages of the evolutionary formation of the intracellular contractile apparatus of the motor tissue in both invertebrates and vertebrates. This study will complement the picture of the evolutionary formation of motor muscle tissue.

*Keywords:* dystrophin, actin, myosin, somatic muscle, annelids