

Том 88, Номер 8

ISSN 0320-9725

Август 2023



# БИОХИМИЯ

[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)



# СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 8, 2023

- Генерация супероксидного анион-радикала в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (обзор)  
*М.А. Козулева, Б.Н. Иванов* 1283
- Агонист конститутивного андростанового рецептора инициирует метаболическую активность, необходимую для пролиферации гепатоцитов  
*М.Э. Мазин, А.М. Перевалова, А.А. Ярушкин, Ю.А. Пустыльняк, А.Д. Рогачев, Е.А. Прокопьева, Л.Ф. Гуляева, В.О. Пустыльняк* 1302
- Влияние сверхэкспрессии дофаминового нейротрофического фактора мозга (CDNF) в гиппокампе на поведение мышей с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению  
*Я.П. Каминская, Т.В. Ильчибаева, Н.В. Хоцкин, В.С. Наumenко, А.С. Цыбко* 1313
- SkQ1 улучшает показатели иммунного статуса и нормализует активность антиоксидантных и NADPH-генерирующих ферментов при адьювант-индуцированном ревматоидном артрите у крыс  
*Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова, Д.А. Жаглин, Г.А. Разуваев, С.А. Олейник* 1337
- Анализ трансферрина в моче у больных раком мочевого пузыря с помощью нанотел  
*А.М. Сачко, О.С. Горяйнова, Т.И. Иванова, И.Ю. Николаева, М.Е. Тарнопольская, А.Ю. Бычков, М.Я. Гаас, Н.В. Воробьев, А.Д. Каприн, П.В. Шегай, С.В. Тиллиб* 1352
- Гибридные имплантаты на основе кальций-магниево-силикатной керамики диопсида в качестве носителя рекомбинантного BMP-2 и деминерализованного костного матрикса в качестве каркаса: эктопический остеогенез при внутримышечной имплантации у мышей  
*А.С. Карягина, П.А. Орлова, А.В. Жулина, М.С. Кривоzubов, Т.М. Грунина, Н.В. Струкова, К.Е. Никитин, В.Н. Манских, Ф.С. Сенатов, А.В. Громов* 1366
- Целостность и барьерная функция макрососудистого эндотелия не нарушаются при длительной экспериментальной гипергликемии *in vitro*  
*А.Ю. Хапчаев, О.А. Антонова, О.А. Казакова, М.В. Самсонов, А.В. Воротников, В.П. Ширинский* 1378
- Регуляция ДНК-праймазы-полимеразы PrimPol человека (обзор)  
*Е.О. Болдинова, А.В. Макарова* 1392
- Защитные эффекты пероксиредоксина 6 при моделировании провоспалительного ответа с использованием макрофагов RAW 264.7  
*С.Б. Парфенюк, О.В. Глушкова, М.Г. Шарапов, М.О. Хренов, С.М. Лунин, А.А. Кузеева, Э.К. Мубаракшина, Т.В. Новоселова, Д.А. Черенков, Е.Г. Новоселова* 1412
- Комплексы и высокомолекулярные ассоциаты додецил-содержащих олигонуклеотидов с сывороточным альбумином  
*А.С. Павлова, В.В. Илющенко, М.С. Купрюшкин, Т.Д. Жарков, Е.С. Дюдеева, И.А. Бауэр, А.С. Чубаров, Д.В. Пышный, И.А. Пышная* 1423

# CONTENTS

Vol. 88, Issue 8, 2023

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Superoxide Anion Radical Generation in Photosynthetic Electron Transport Chain (Review)<br><i>M. A. Kozuleva and B. N. Ivanov</i>                                                                                                                                                                                                                                                     | 1283 |
| Constitutive Androstane Receptor Agonist Initiates Metabolic Activity Required for Hepatocyte Proliferation<br><i>M. E. Mazin, A. M. Perevalova, A. A. Yarushkin, Y. A. Pustyl'nyak, A. D. Rogachev, E. A. Prokopyeva, L. F. Gulyaeva, and V. O. Pustyl'nyak</i>                                                                                                                      | 1302 |
| The Effect of Hippocampal Overexpression of Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF) on the Behavior of Mice with Genetic Predisposition to Depressive-Like Behavior<br><i>Y. P. Kaminskaya, T. V. Ilchibaeva, N. V. Khotskin, V. S. Naumenko, and A. S. Tsybko</i>                                                                                                                        | 1313 |
| SkQ1 Improves Immune Status and Normalises the Activity of Antioxidant and NADPH-Generating Enzymes in Adjuvant-Induced Rheumatoid Arthritis in Rats<br><i>E. D. Kryl'skii, T. N. Popova, D. A. Zhaglin, G. A. Razuvaev, and S. A. Oleynik</i>                                                                                                                                        | 1337 |
| Analysis of Transferrin in Urine in Patients with Bladder Cancer Using Nanobodies<br><i>A. M. Sachko, O. S. Goryainova, T. I. Ivanova, I. Yu. Nikolaeva, M. E. Tarnopolskaia, A. Yu. Bychkov, M. Ya. Gaas, N. V. Vorob'ev, A. D. Kaprin, P. V. Shegay, and S. V. Tillib</i>                                                                                                           | 1352 |
| Hybrid Implants Based on Calcium-Magnesium Silicate Ceramic Diopside as a Carrier of Recombinant BMP-2 and Demineralized Bone Matrix as a Scaffold: Ectopic Osteogenesis in Intramuscular Implantation in Mice<br><i>A. S. Karyagina, P. A. Orlova, A. V. Zhulina, M. S. Krivozubov, T. M. Grunina, N. V. Strukova, K. E. Nikitin, V. N. Mansikh, F. S. Senatov, and A. V. Gromov</i> | 1366 |
| Long-Term Experimental Hyperglycemia Does Not Impair Macrovascular Endothelial Barrier Integrity and Function <i>in vitro</i><br><i>A. Y. Khapchaev, O. A. Antonova, O. A. Kazakova, M. V. Samsonov, A. V. Vorotnikov, and V. P. Shirinsky</i>                                                                                                                                        | 1378 |
| Regulation of Human DNA Primase-Polymerase PrimPol (Review)<br><i>E. O. Boldinova and A. V. Makarova</i>                                                                                                                                                                                                                                                                              | 1392 |
| Protective Effects of Peroxiredoxin 6 in Modeling Proinflammatory Response Using RAW 264.7 Macrophages<br><i>S. B. Parfenyuk, O. V. Glushkova, M. G. Sharapov, M. O. Khrenov, S. M. Lunin, A. A. Kuzeikova, E. K. Mubarakshina, T. V. Novoselova, D. A. Cherenkov, and E. G. Novoselova</i>                                                                                           | 1412 |
| Complexes and Supramolecular Associates of Dodecyl-Containing Oligonucleotides with Serum Albumin<br><i>A. S. Pavlova, V. V. Ilyushchenko, M. S. Kupryushkin, T. D. Zharkov, E. S. Dyudeeva, I. A. Bauer, A. S. Chubarov, D. V. Pyshnyi, and I. A. Pyshnaya</i>                                                                                                                       | 1423 |

## ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ

### Обзор

© 2023 М.А. Козулева\*, Б.Н. Иванов

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук», Институт фундаментальных проблем биологии РАН,  
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: kozuleva@gmail.com

Поступила в редакцию: 09.05.2023

После доработки 16.06.2023

Принята к публикации 18.06.2023

В обзоре проанализированы имеющиеся в литературе данные о скоростях, характеристиках и механизмах восстановления молекул  $O_2$  до супероксидного анион-радикала на участках фотосинтетической электрон-транспортной цепи, на которых это восстановление было установлено. С использованием термодинамических расчетов и результатов недавних работ критически рассмотрены имеющиеся предположения о роли компонентов этих участков в данном процессе. Детально описан процесс восстановления молекул  $O_2$  на акцепторной стороне фотосистемы 1, считающейся основным местом этого процесса в фотосинтетической цепи. Рассмотрены аспекты эволюции фотосинтетического аппарата в контексте контроля утечки электронов к молекуле  $O_2$ . Обсуждены причины, ограничивающие применение результатов, полученных с использованием фрагментов тилакоидных мембран, содержащих отдельные участки фотосинтетической цепи, для оценки скорости восстановления молекул  $O_2$  на этих участках в интактной тилакоидной мембране.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фотосинтез, фотосинтетическая электрон-транспортная цепь, восстановление кислорода, супероксидный радикал.

DOI: 10.31857/S0320972523080018, EDN: INTJLQ

### ВВЕДЕНИЕ

Молекулярный  $O_2$  — побочный продукт окисления воды в фотосинтезирующих организмах, использующих ее в качестве источника электронов для образования восстановителя, необходимого в реакциях углеродного метаболизма. В то же время компоненты фотосинтетического аппарата аэробных организмов могут вступать в реакции с молекулами  $O_2$ . В 1951 году Алан Мелер обнаружил, что при освещении тилакоидов образуется пероксид водорода,  $H_2O_2$ , и сделал вывод, что молекулярный  $O_2$  может служить непосредственным акцептором электронов от восстановленных компонентов фотосинтетической электрон-

транспортной цепи (ФЭТЦ) [1]. Перенос электронов от компонентов ФЭТЦ к молекулам  $O_2$ , сопровождаемый восстановлением этих молекул, получил название реакция Мелера. Основная функция ФЭТЦ — восстанавливать  $NADP^+$ , и было проведено громадное количество исследований, чтобы оценить долю «непроизводительной» реакции Мелера в общем переносе электронов по ФЭТЦ в различных условиях ее функционирования [2].

Однако важность понимания процессов окисления компонентов ФЭТЦ молекулами  $O_2$  состоит не только в возможности оценки влияния реакции Мелера на эффективность фиксации  $CO_2$ , но и в учете ее роли в осуществлении этой фиксации. Синтез АТФ, используемого

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; Фд — ферредоксин; ФНР — ферредоксин: $NADP^+$  оксидоредуктаза; ФС1 — фотосистема 1; ФС2 — фотосистема 2; ФЭТЦ — фотосинтетическая электрон-транспортная цепь; DCPIP — 2,6-дихлорфенолиндофенол; DMF — диметилформамид; DNP-INT — динитрофениловый эфир 2-йод-4-нитротимола;  $E_m$  — среднеточечный редокс-потенциал; PhQ — филлохинон (phylloquinone); PQ — пластохинон (plastoquinone);  $Q_A$  и  $Q_B$  — первичный и вторичный хиноновые акцепторы фотосистемы 2 соответственно;  $Q_O$  и  $Q_R$  — хинол-окисляющий ( $Q_O$ -сайт) и хинол-восстанавливающий ( $Q_R$ -сайт) сайты  $b_6f$ -комплекса соответственно.

\* Адресат для корреспонденции.

в реакциях фиксации  $\text{CO}_2$ , осуществляется за счет протонного градиента на тилакоидной мембране, возникающего не только при линейном транспорте электронов к окисленному пиридиннуклеотиду, но и при транспорте электронов к кислороду как к акцептору (так называемый псевдоциклический транспорт электронов), и при циклическом электронном транспорте, условием которого служит некоторый необходимый уровень окисления пула пластохинона (PQ) (redox poising), который может обеспечиваться как переносом электронов к акцепторам фотосистемы 1 (ФС1), в частности, реакцией Мелера, так и непосредственным окислением пула PQ кислородом (см. далее). Важнейшую роль играет процесс восстановления  $\text{O}_2$  в ФЭТЦ в поддержании гомеостаза фотосинтезирующей клетки и в приспособлении всего фотосинтетического организма к условиям среды вследствие образования в этом процессе активных форм кислорода (АФК), супероксидного анион-радикала ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) и пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), которые служат в этом случае первичными сигнальными молекулами в осуществлении адаптационных перестроек метаболизма. Именно генерация АФК позволяет ФЭТЦ выступать в качестве чувствительного датчика таких изменений в окружающей среде, как интенсивность света, температура, доступность воды, засоленность почвы и т.д.

Неудивительно поэтому, что много исследований было посвящено выяснению, с каких компонентов ФЭТЦ возможен и с каких преимущественно происходит перенос электронов к молекулам  $\text{O}_2$  [3–7]. К настоящему времени накопились новые данные о механизмах восстановления молекул  $\text{O}_2$  в ФЭТЦ и возникли новые идеи об условиях протекания этого процесса и об изменении в процессе эволюции тех компонентов ФЭТЦ, которые могут окисляться кислородом. Настоящий обзор посвящен рассмотрению этих новых данных с анализом в каждом случае более ранних результатов. Основное внимание уделено восстановлению  $\text{O}_2$  в ФС1, которую принято считать главным участком ФЭТЦ, где осуществляется этот процесс.

#### УСЛОВИЯ И ПУТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ $\text{O}_2$ В ФЭТЦ

Через 20 лет после открытия было показано, что реакция Мелера начинается как одноэлектронное окисление компонентов ФЭТЦ молекулами  $\text{O}_2$  на свету с образованием  $\text{O}_2^{\bullet-}$  [8, 9].

Здесь и далее термин фотовосстановление  $\text{O}_2$  используется как синоним образования  $\text{O}_2^{\bullet-}$  в ходе переноса электрона от компонентов ФЭТЦ к молекуле  $\text{O}_2$ . При оценке термодинамической возможности восстановления  $\text{O}_2$  следует учитывать, что в ФЭТЦ есть компоненты, растворенные в водной фазе, компоненты, связанные с мембраной, но контактирующие с водной фазой, а также компоненты, которые погружены в гидрофобные зоны белков и мембраны. Средноточечный редокс-потенциал ( $E_m$ ) для пары  $\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$  различен в разных средах:  $-160$  мВ (относительно нормального водородного электрода, НВЭ) в воде и приблизительно  $-550 \div -600$  мВ — в диметилформамиде, модельном растворителе для мембраны, имеющем диэлектрическую проницаемость 36,7 [10]. То, что  $\text{O}_2^{\bullet-}$  на свету может возникать в пределах мембран тилакоидов было предположено в работе Takahashi и Asada [11] и экспериментально установлено в наших работах в присутствии  $\text{O}_2$  как единственного конечного акцептора методом ЭПР с использованием липофильного циклического гидроксиламина ТМТ-Н (1-гидрокси-4-изобутирамидо-2,2,6,6-тетраметилпиперидиний) [12, 13]. Позже было показано, что светоиндуцированное образование  $\text{O}_2^{\bullet-}$  внутри тилакоидной мембраны происходит и в присутствии ферредоксина (Фд) +  $\text{NADP}^+$ , т.е. в условиях, когда восстановление  $\text{O}_2$  происходит одновременно с фотовосстановлением  $\text{NADP}^+$  [14].

На свету в ФЭТЦ, возможно, функционирует более чем один путь восстановления  $\text{O}_2$ . В таблице приведены представленные в литературе скорости образования  $\text{O}_2^{\bullet-}$  на основных участках ФЭТЦ: фотосистеме 2 (ФС2), ФС1, в цитохромном  $b_6f$ -комплексе, в стромальном пуле Фд и мембранном пуле PQ. Далее рассмотрены свойства и особенности каждого из известных путей восстановления  $\text{O}_2$  в ФЭТЦ хлоропластов.

**Восстановление  $\text{O}_2$  в фотосистеме 2.** Большое число работ посвящено исследованию реакции фотовосстановления кислорода в ФС2 — анализ этих работ приведен в обзорах [2, 4]. Основная масса этих работ была проведена с препаратами ФС2 разной степени целостности: фрагментами тилакоидных мембран, обогащенными ФС2 (ВВУ-частицами), и комплексами ФС2, в которых отсутствует PQ. К настоящему времени появился ряд работ, в которых удалось приписать  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -генерирующую активность компонентам нативной ФС2 в изолированных тилакоидах и даже в листьях. Это было достигнуто прежде всего благодаря

Скорости генерации  $O_2^{\bullet-}$  на разных участках фотосинтетической электрон-транспортной цепи высших растений

| Структура                    | Скорость генерации $O_2^{\bullet-}$                          | Скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ нормализованная на содержание ФС2 <sup>g</sup> |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Фотосистема 2                | $0,1^a-0,75^b \text{ e}^- (\text{ФС2} \times \text{c})^{-1}$ | $0,1-0,75 \text{ e}^- \text{ c}^{-1}$                                              |
| Пул пластохинона             | $2,3 \text{ e}^- (\text{ФС2} \times \text{c})^{-1c}$         | $2,3 \text{ e}^- \text{ c}^{-1}$                                                   |
| Цитохромный $b_6f$ -комплекс | $4,5 \text{ e}^- (b_6f \times \text{c})^{-1d}$               | $1,6 \text{ e}^- \text{ c}^{-1}$                                                   |
| Фотосистема 1                | $3-10 \text{ e}^- (\text{ФС1} \times \text{c})^{-1e}$        | $1,75-5,8 \text{ e}^- \text{ c}^{-1}$                                              |
| Ферредоксин                  | $0,4-1,4 \text{ e}^- (\text{ФС1} \times \text{c})^{-1f}$     | $0,2-0,8 \text{ e}^- \text{ c}^{-1}$                                               |

Примечание. <sup>a</sup> Рассчитано из скорости восстановления цитохрома *c* в работе Fantuzzi et al. [15].<sup>b</sup> Рассчитано из скорости поглощения  $O_2$  в ВВУ-частицах в работе Khorobrykh и Ivanov [16] с учетом отношения Хлорофилл :  $P_{680} = 350$  [17].<sup>c</sup> Рассчитано из скорости диурон-независимого поглощения  $O_2$  в тилакоидах в работе Khorobrykh и Ivanov [16] с учетом отношения Хлорофилл :  $P_{680} = 370$  [18].<sup>d</sup> Из работы Baniulis et al. [19].<sup>e</sup> Из работы Kozuleva et al. [20], диапазон скоростей для разных интенсивностей света (от наименьшей к наибольшей интенсивности).<sup>f</sup> Рассчитано с использованием величин константы окисления Фд кислородом ( $0,08-0,28 \text{ c}^{-1}$ ) [21, 22] и отношения Фд : ФС1 в хлоропласте, равного 5 [23].<sup>g</sup> Рассчитано с использованием стехиометрии  $b_6f$ : ФС2 = 0,35 и ФС1 : ФС2 = 0,58 [24].

визуализации окисленных аминокислотных остатков вблизи кофакторов ФС2 [25–27] — экспериментальном подходе, основанном на предположении, что АФК, производимые кофакторами переноса электронов, могут модифицировать в первую очередь проксимальные остатки в непосредственной близости от места генерации АФК [28]. Однако этот подход не позволяет проводить какие-либо количественные оценки скорости образования  $O_2^{\bullet-}$ , тогда как при работе с препаратами ФС2, выделенными из тилакоидных мембран, возможно измерить скорость светоиндуцируемой генерации  $O_2^{\bullet-}$  — в таблице приведены величины этой скорости в ВВУ-частицах.

Ряд компонентов ФС2 рассматривают как восстановителей  $O_2$ . Образование  $O_2^{\bullet-}$  было зарегистрировано в комплексе D1/D2/цитохром  $b_559$ , в котором отсутствовали хиноны в сайтах  $Q_A$  и  $Q_B$ , что позволило предположить, что феофитин, первичный акцептор электронов в ФС2, может восстанавливать  $O_2$  [29]. Феофитин обладает наиболее низкой величиной  $E_m$  среди кофакторов ФС2 ( $-610 \text{ мВ}$ ), что достаточно для восстановления  $O_2$  в гидрофобной части белка, где расположен этот кофактор и где потенциал пары  $O_2/O_2^{\bullet-}$  близок к этой величине или даже несколько более положительный (см. выше). Более того, недавно было показано, что в мутанте арабидопсиса *vte1* с дефицитом биосинтеза токоферола, в котором ФС2 лишена двух характерных для дикого типа

молекул токоферола, расположенных вблизи феофитина и негемового железа, увеличена генерация  $O_2^{\bullet-}$ , а также обнаруживаются окисленные аминокислотные остатки вблизи феофитина [27]. Авторы предположили, что при высокой освещенности феофитин продуцирует  $O_2^{\bullet-}$ , который в ФС2 дикого типа окисляет близлежащую молекулу токоферола, а не окружающие аминокислотные остатки. Обычно предполагают, что в условиях умеренного освещения восстановление  $O_2$  феофитином мало вероятно вследствие его короткого времени жизни в восстановленной форме (200–500 пс) при окислении следующим переносчиком электронов в ФС2 — молекулой PQ в сайте  $Q_A$  [2].

Восстановление  $O_2$  прочносвязанным  $PQ^{\bullet-}$  в сайте  $Q_A$  было предположено, в частности, на основании того, что низкие концентрации гербицида диурона, ингибитора переноса электронов с  $Q_A$  на следующий компонент ФЭТЦ — молекулу PQ в сайте  $Q_B$ , стимулировали образование  $O_2^{\bullet-}$  в тилакоидах гороха [30]. В ВВУ-комплексах, дополнительно обработанных для удаления молекул PQ, в которых таким образом  $Q_B$ -сайт оставался вакантным, генерация  $O_2^{\bullet-}$  была зарегистрирована с помощью специфических спиновых ловушек и восстановления экзогенного цитохрома *c* [15]. Модифицированные аминокислотные остатки, расположенные ближе к сайту  $Q_A$ , были также обнаружены в листьях шпината и мутанта арабидопсиса *vte1* [25, 27].



Дискуссионным остается, однако, вопрос о термодинамике реакции между  $O_2$  и  $PQ^{\bullet-}$  в сайте  $Q_A$ . Было показано, что  $E_m(Q_A/Q_A^{\bullet-})$  зависит от наличия бикарбонат-иона вблизи негемового железа:  $-70$  мВ и  $-145$  мВ в отсутствие и в присутствии  $HCO_3^-$  соответственно [31]. Величины  $E_m$  пары  $(Q_A/Q_A^{\bullet-})$  в присутствии  $HCO_3^-$  ( $-145$  мВ) и пары  $O_2/O_2^{\bullet-}$  ( $-160$  мВ — в воде) близки, что предполагает, что термодинамически окисление  $PQ^{\bullet-}$  в сайте  $Q_A$  кислородом, хотя и не выгодно, но вероятно. Вопрос в том, можно ли рассматривать  $E_m(O_2/O_2^{\bullet-})$  в воде, поскольку  $Q_A$  расположен в достаточно гидрофобной части ФС2? Такое предположение не исключено, поскольку  $Q_A$  контактирует с водными каналами, по которым, в частности, поступает  $HCO_3^-$  к негемовому железу [15, 32], и в этой области много полярных и ионогенных аминокислотных остатков. Таким образом, восстановление  $O_2$  прочносвязанным  $PQ^{\bullet-}$  в сайте  $Q_A$  выглядит более благоприятным, когда  $HCO_3^-$  присутствует на акцепторной стороне ФС2. Однако в условиях, когда стабильный  $PQ^{\bullet-}$  в сайте  $Q_A$  индуцирует высвобождение  $HCO_3^-$ , скорость образования  $O_2^{\bullet-}$  увеличивается [15]. На основании этого был сделан вывод, что присутствие  $HCO_3^-$  ограничивает доступ  $O_2$  к сайту  $Q_A$ . Fantuzzi et al. [15] предполагают, что до  $O_2^{\bullet-}$  восстанавливается молекула  $O_2$ , связанная с негемовым железом, что повышает величину  $E_m(O_2/O_2^{\bullet-})$ .

Восстановление  $O_2$  в сайте  $Q_B$  термодинамически маловероятно, т.к.  $E_m(PQ/PQ^{\bullet-})$  в  $Q_B$ -сайте равен  $+90$  мВ [33]. И действительно, даже при обработке ВВУ-частиц сильным светом, вызывающим фотоингибирование, не было зарегистрировано появление окисленных аминокислотных остатков в сайте  $Q_B$  [26]. Вероятно, в этом сайте генерации  $O_2^{\bullet-}$  не происходит.

В литературе на основании сопряжения восстановления молекул  $O_2$  с окислением цитохрома *b559*, входящего в комплекс ФС2 и участвующего в циклическом транспорте электронов вокруг ФС2, предполагается восстановление  $O_2$  этим цитохромом [34, 35], находящимся в низкопотенциальной форме ( $E_m = -40 \div +80$  мВ) [36] или в очень низкопотенциальной форме ( $E_m = -150 \div -200$  мВ) [37]. Однако восстановление  $O_2$  даже низкопотенциальными формами цитохрома *b559* термодинамически невыгодно вследствие его расположения в гидрофобной зоне белка, где величина  $E_m$  пары  $O_2/O_2^{\bullet-}$  существенно ниже этих величин. Было предположено, что восстановителем  $O_2$  выступает либо  $PQ^{\bullet-}$ , который образуется при окислении  $PQH_2$  цитохромом *b559* в

пластохинон-связывающем сайте  $Q_C$  ФС2 [38], либо свободный  $PQ^{\bullet-}$ , возникающий в реакции конпропорционирования (см. ниже)  $PQ$  с  $PQH_2$ , образующимся при окислении цитохрома *b559* связанным в сайте  $Q_C$  пластосемхиномом [2].

Таким образом, генерация  $O_2^{\bullet-}$  в ФС2 возможна при окислении феофитина и  $PQ^{\bullet-}$  в сайте  $Q_A$  (и, возможно, в сайте  $Q_C$ ). Однако имеющиеся в литературе количественные оценки этого процесса, полученные для ВВУ-частиц ( $0,1 e^- (ФС2 \times c)^{-1}$  [15],  $0,25 e^- (ФС2 \times c)^{-1}$  [39],  $0,75 e^- (ФС2 \times c)^{-1}$  [16]), указывают на его низкую эффективность. Некоторые оценки могут быть даже завышены, поскольку получены для ВВУ-комплексов, в которых сохраняется от 2 до 3 свободных молекул  $PQ$  на один реакционный центр ФС2, и эти молекулы, будучи восстановленными, могут восстанавливать  $O_2^{\bullet-}$  (см. далее). С другой стороны, в некоторых работах [15, 39] экспериментальные условия препятствовали надежной количественной оценке генерации  $O_2^{\bullet-}$  вследствие использования среды с низкими величинами pH, при которых скорость спонтанной дисмутации  $O_2^{\bullet-}$  высока, и практически невозможно обеспечить присутствие ловушек для  $O_2^{\bullet-}$  в концентрации, обеспечивающей регистрацию всех  $O_2^{\bullet-}$ , генерируемых в исследуемой системе [40]. В большинстве экспериментов с ФС2-частицами  $O_2$  был единственным акцептором электронов от кофакторов ФС2, но даже при этом скорость образования  $O_2^{\bullet-}$  оказывалась весьма низкой. На основании этого не представляется вероятным, что реальный вклад ФС2 в генерацию  $O_2^{\bullet-}$  в хлоропластах может быть высоким.

**Восстановление  $O_2$  в пуле пластохинона тилакоидной мембраны.**  $O_2$ -зависимое окисление пула  $PQ$ , наблюдаемое в темноте после освещения тилакоидов [41], предполагало возможность переноса электронов от компонентов этого пула к молекулам  $O_2$ . Светоиндуцированная генерация  $O_2^{\bullet-}$  была продемонстрирована в изолированных тилакоидах гороха в присутствии динитрофенил-2-йод-4-нитротимола (DNP-INT), высокоэффективного конкурентного ингибитора окисления  $PQH_2$  в хинол-окисляющем сайте ( $Q_O$ -сайте) *b6f*-комплекса [16, 30], т.е. в условиях, предполагающих, что только ФС2 и компоненты пула  $PQ$  могут восстанавливать  $O_2$ . В работе Khorobrykh и Ivanov [16] было показано, что ВВУ-частицы генерировали  $O_2^{\bullet-}$  с гораздо меньшей скоростью, чем тилакоиды в присутствии DNP-INT (см. таблицу). Это указывало на то, что на свету генераторами  $O_2^{\bullet-}$  в тилакоидах были молекулы пула  $PQ$ . На основании сходства зависимостей

увеличения генерации  $O_2^{\bullet-}$  в пуле PQ при увеличении pH от 5,0 до 6,5 [16] и уменьшения в этом диапазоне разности редокс-потенциалов пары  $PQ/PQ^{\bullet-}$  и пары  $O_2/O_2^{\bullet-}$  (в воде) вплоть до отрицательных значений было предположено [3, 16], что  $O_2^{\bullet-}$  образуется в реакции  $O_2$  с молекулами свободного  $PQ^{\bullet-}$  на границах мембраны с водной фазой.

Источником свободного  $PQ^{\bullet-}$  в тилакоидах на свету может быть, во-первых, реакция конпропорционирования  $PQH_2 + PQ \rightarrow 2PQ^{\bullet-} + 2H^+$ . В работе Mubarakshina и Ivanov [3] была рассчитана стационарная концентрация  $PQ^{\bullet-}$ , образующегося в этой реакции в пуле PQ, и она хорошо совпадала с расчетной концентрацией  $PQ^{\bullet-}$ , необходимой для обеспечения скоростей образования  $O_2^{\bullet-}$ , наблюдавшихся в работе Khorobrykh и Ivanov [16]. Следует заметить, что в случае появления  $PQ^{\bullet-}$  в реакции конпропорционирования максимальные скорости генерации  $O_2^{\bullet-}$  в пуле PQ должны наблюдаться в условиях, когда пул наполовину восстановлен, а при высокой освещенности, когда пул PQ практически полностью восстановлен, содержание  $PQ^{\bullet-}$  в результате этой реакции существенно уменьшается. Во-вторых, свободный  $PQ^{\bullet-}$  может образовываться также в результате окисления  $PQH_2$  пероксидом водорода и супероксидным радикалом, образующимися как в самом пуле PQ [16], так и на других участках ФЭТЦ, в первую очередь в ФС1 при сильном освещении [42]. В-третьих, потенциальным источником свободного  $PQ^{\bullet-}$  в пуле может быть неполное окисление  $PQH_2$  в хинол-окисляющем ( $Q_o$ ) сайте  $b_6f$ -комплекса с последующим высвобождением  $PQ^{\bullet-}$  из этого комплекса. Возможность выхода семихинона из сайта окисления хинола в  $bc_1$ -комплексе и восстановления им молекул  $O_2$  была предположена в работе Forquer et al. [43].

Учитывая описанное выше, можно полагать, что количественные оценки вклада пула PQ, получаемые с применением ингибиторов ферментативного окисления  $PQH_2$ , не отражают восстановление  $O_2$  в пуле PQ в хлоропластах. Во-первых, практически полное восстановление пула PQ в присутствии DNP-INT наблюдается при существенно более низких интенсивностях света, чем при функционировании полной ФЭТЦ [44]. Во-вторых, применение DNP-INT или другого ингибитора окисления  $PQH_2$  в  $b_6f$ -комплексе блокирует поток электронов по цепи и минимизирует образование  $O_2^{\bullet-}$  в ФС1, а также в  $b_6f$ -комплексе. В-третьих, ингибиторы в насыщающей концентрации предотвращают окисление  $PQH_2$  в  $Q_o$ -сайте и исключают третий описанный

выше возможный источник свободного  $PQ^{\bullet-}$ . Поэтому представляется вероятным, что максимальные скорости образования  $O_2^{\bullet-}$ , наблюдаемые в обработанных DNP-INT тилакоидах (таблица), могут быть занижены из-за использования ингибиторов ферментативного окисления  $PQH_2$ . Не исключено, что скорости генерации  $O_2^{\bullet-}$  в пуле PQ интактных хлоропластов выше, чем измеренные в работе Khorobrykh и Ivanov [16].

**Восстановление  $O_2$  в цитохромном  $b_6f$ -комплексе.** Образование  $O_2^{\bullet-}$  было показано в изолированных  $b_6f$ -комплексах ( $PQH_2$ -пластоцианин оксидоредуктаза), к которым были добавлены восстановленный децилпластохинон и пластоцианин в качестве донора и акцептора электронов соответственно [19], причем параллельно регистрировали восстановление пластоцианина. Авторы предположили, что наиболее вероятным источником  $O_2^{\bullet-}$  в этой системе может быть  $PQ^{\bullet-}$ , который образуется в  $Q_o$ -сайте после одноэлектронного окисления  $PQH_2$  [19]. В данной работе было найдено, что в изолированном  $b_6f$ -комплексе скорость образования супероксидного анион-радикала в процентах от скорости электронного транспорта была почти на порядок выше, чем в изолированном митохондриальном  $bc_1$ -комплексе. В работе Tikhonov [45] было оценено, что в  $Q_o$ -сайте  $b_6f$ -комплекса  $E_m$  ( $PQ/PQ^{\bullet-}$ ) достаточно низкий ( $-280$  мВ) и его реакция с  $O_2$  термодинамически возможна.

Первый кофактор высокопотенциальной ветви кофакторов  $b_6f$ -комплекса,  $Fe_2-S_2$ -кластер Рiske, принимающий первый электрон при окислении  $PQH_2$  в  $Q_o$ -сайте, обладает высоким  $E_m$  ( $+330$  мВ), вследствие чего его окисление  $O_2$  термодинамически неблагоприятно. Было предположено [19] участие в генерации  $O_2^{\bullet-}$  низкопотенциального гема цитохрома  $b_6$  ( $b_6^L$ ), первого кофактора низкопотенциальной ветви кофакторов  $b_6f$ -комплекса, который принимает второй электрон при окислении  $PQH_2$  в  $Q_o$ -сайте и обладает довольно отрицательным  $E_m$  ( $-150$  мВ) [46]. Окисленные остатки аминокислот были обнаружены в  $Q_o$ -сайте [28], что могло указывать на возможность образования там  $O_2^{\bullet-}$ . Однако точная интерпретация реакций, приводящих к окислительным модификациям, затруднена, поскольку  $b_6f$ -комплекс содержит молекулу хлорофилла  $a$ , способную продуцировать  $^1O_2$  [47], и  $Fe_2-S_2$ -кластер белка Рiske, который, подобно другим  $Fe-S$ -кластерам [48], потенциально может катализировать образование  $HO^{\bullet}$  из молекул  $H_2O_2$ .  $^1O_2$  и  $HO^{\bullet}$  обладают большей реакционной способностью, чем  $O_2^{\bullet-}$ , и могут



модифицировать аминокислотные остатки с большей эффективностью, чем  $O_2^{\bullet-}$ .

**Роль ферредоксина в восстановлении  $O_2$ .** Стромальный белок Фд содержит один кластер  $Fe_2-S_2$  и обладает низким  $E_m$  (–420 мВ), что позволяло бы ему в восстановленной форме быть эффективным восстановителем  $O_2$  до  $O_2^{\bullet-}$  в водной фазе. Однако образование  $O_2^{\bullet-}$  с участием Фд происходит с малыми скоростями: константа скорости первого порядка окисления восстановленного Фд молекулярным  $O_2$  низка – 0,08–0,28  $s^{-1}$  [21, 22, 49]. Это, очевидно, является следствием структуры железосерного активного центра белка; хиноны с близкими величинами  $E_m$  пары  $Q/Q^{\bullet-}$  имеют константы скорости восстановления  $O_2$  примерно на 6 порядков выше [10]. Учитывая величины констант скоростей реакции и соотношение Фд : ФС1 в хлоропластах высших растений [23], скорость Фд-зависимого фотовосстановления  $O_2$  в хлоропласте не превышает 10% от максимальной скорости фотовосстановления  $O_2$  в ФС1 (таблица).

Однако долгое время Фд рассматривали в качестве основного участника фотовосстановления  $O_2$  в хлоропластах [50] на основании многократно наблюдавшихся значительной стимуляции поглощения  $O_2$  и образования  $O_2^{\bullet-}$  при его добавке к изолированным тилакоидам шпината/гороха/арабидопсиса, лишенным в процессе выделения стромальных компонентов [14, 51, 52]. При этом в таких экспериментах отношение Фд к ФС1 было на 3 порядка выше, чем *in vivo*, что при медленном окислении восстановленного Фд приводило к его накоплению в значительных количествах, обеспечивающих наблюдаемую высокую скорость восстановления  $O_2$ . Добавка  $NADP^+$ , основного акцептора электронов от восстановленного Фд, существенно снижала вклад последнего в генерацию  $O_2^{\bullet-}$  тилакоидами [14, 53]. Очевидно, эффективность регенерации  $NADP^+$  в цикле Кальвина–Бенсона–Бассема определяет вклад Фд в продукцию  $O_2^{\bullet-}$  *in vivo* вследствие изменения количества молекул восстановленного Фд, доступных окислению кислородом.

В литературе были попытки оценить участие Фд в восстановлении  $O_2$  в хлоропластах (т.е. при нативном отношении Фд : ФС1) путем сравнения констант Михаэлиса  $K_m(O_2)$ , измеренных для реакции Мелера в изолированных тилакоидах и в интактных хлоропластах/клетках/листьях. Этот подход подробно описан в работе Asada [54] и основывается на предположении, что более высокая величина  $K_m(O_2)$  в более сложных структурах отражает работу нескольких сайтов фотовосстановления  $O_2$ .

Значения  $K_m(O_2)$  для хлоропластов и целых клеток (50–95 мкМ) были на порядок выше, чем  $K_m(O_2)$  для тилакоидов (3–10 мкМ). Очевидным выводом из такого сравнения было то, что Фд – тот самый добавочный сайт восстановления  $O_2$  в более сложных структурах. Однако ситуация более сложна, чем кажется на первый взгляд.

Во-первых, есть вопросы относительно используемых при сравнении величин  $K_m(O_2)$  для разных структур. Прежде всего, рассматривать ФС1 как единственный сайт фотовосстановления  $O_2$  в проводившихся экспериментах с изолированными тилакоидами, вероятно, не совсем корректно. Значение  $K_m(O_2)$  для фотовосстановления  $O_2$  в ФС1 (3 мкМ), полученное в работе Asada и Nakano [55], было очевидно занижено вследствие использования 2,6-дихлорфенолиндифенола (DCPIP) в качестве искусственного донора электронов к ФС1 [56] (подробнее см. ниже). С другой стороны, сомнительна и надежность разграничения реакции Мелера и других реакций, потребляющих  $O_2$  в более сложных структурах: митохондриальное дыхание, оксигеназная реакция Рубиско (фотодыхание), окисление пула PQ пластидной терминальной оксидазой (хлородыхание), поглощение кислорода вследствие образования  $^1O_2$  и перекисного окисления липидов, восстановление  $O_2$  до воды с участием белков, содержащих в контакте с флавиновой группой два атома железа (flavodiiron proteins, Flvs или FDPs), которые отсутствуют у покрытосеменных, но присутствуют в цианобактериях, зеленых водорослях и остальных высших растениях. Таким образом, в зависимости от исследованного организма и условий, в которых проводились измерения, полученные  $K_m(O_2)$  могут отражать далеко не только реакцию Мелера.

Во-вторых, помимо расположенного в стромах хлоропластов Фд, другие стромальные компоненты могут участвовать в непосредственном фотовосстановлении  $O_2$  *in vivo*. В литературе возникали предположения о роли нитритредуктазы, восстанавливаемой Фд глутаматсинтазы [57] и монодегидроаскорбатредуктазы [58]. Вклад этих белков в восстановление  $O_2$  на свету может повлиять на измеряемую величину  $K_m(O_2)$  для интактных систем, но этот вклад в данный процесс пока не определен, поскольку указанные исследования не получили дальнейшего развития. Скорее всего, эти ферменты могут участвовать в восстановлении  $O_2$  только в условиях дефицита их специфических субстратов [57].

Таким образом, сравнение  $K_m(O_2)$  для разных структур с целью выявления вклада Фд

в восстановление  $O_2$  в хлоропластах представляет собой подход, с помощью которого сложно сделать надежные выводы. К тому же количественная оценка путей фотовосстановления  $O_2$  в суспензии тилакоидов гороха в присутствии Фд показала, что увеличение концентрации Фд стимулировало не только восстановление  $O_2$  с участием восстановленного Фд, но и восстановление  $O_2$  мембранными компонентами [49, 53]. Для объяснения последнего эффекта было предположено, что увеличение оттока электронов из ФС1 к Фд при увеличении его концентрации может изменять соотношение путей прямого переноса электронов и рекомбинации зарядов в ФС1 таким образом, что концентрация восстановленных форм промежуточных акцепторов этой фотосистемы — филлохинона в сайте  $A_1$  и железосерного центра  $F_X$  — возрастает, и поток электронов от них к  $O_2$  увеличивается [53]. Альтернативным предположением может быть то, что Фд запускает или стимулирует некий путь фотовосстановления  $O_2$  в тилакоидах, который не активен или мало активен в отсутствие Фд. Например, таким путем может быть восстановление  $O_2$  с участием мембраносвязанной ферредоксин:NADP<sup>+</sup> оксидоредуктазы (ФНР), которая получает электроны от ФС1 только в присутствии Фд. Известно, что экзогенная добавка ФНР к тилакоидам стимулирует восстановление  $O_2$  [14, 58]; однако недавние экспериментальные результаты свидетельствуют против того, что ФНР может заметным образом участвовать в восстановлении  $O_2$  в тилакоидах [14]. В этой работе образование мембранного  $O_2^{\bullet-}$  измеряли в тилакоидах арабидопсиса, выделенных из растений дикого типа и мутанта, дефицитного по изоформе ФНР1 [59], для которого характерно отсутствие ФНР в изолированных тилакоидах [60]. Оказалось, что скорости образования  $O_2^{\bullet-}$  в мембране в присутствии и в отсутствие Фд были одинаковыми у обоих генотипов, что исключает непосредственное участие ФНР в образовании  $O_2^{\bullet-}$  в тилакоидах дикого типа.

Другим сайтом восстановления  $O_2$ , который получает дополнительные электроны в присутствии Фд, может быть цитохромный  $b_6f$ -комплекс. Ряд авторов рассматривают этот комплекс как Фд-PQ оксидоредуктазу, которая функционирует в циклическом транспорте электронов вокруг ФС1 [61, 62]. В рамках этой модели Фд донирует один электрон для восстановления PQ в хинон-восстанавливающим ( $Q_R$ ) сайте, тогда как второй электрон поступает из  $Q_0$ -сайта. Если такой путь функционирует, то не исключено, что наличие при-

тока электронов от Фд к  $b_6f$ -комплексу может влиять на время жизни  $PQ^{\bullet-}$  в  $Q_0$ -сайте и на вероятность его реакции с  $O_2$  (см. выше).

**Восстановление  $O_2$  в фотосистеме 1.** Эта фотосистема давно была признана основным участком ФЭТЦ в процессе генерации  $O_2^{\bullet-}$  в реакции Мелера (см. [63] и ссылки в ней), и действительно, из всех компонентов ФЭТЦ она характеризуется наиболее высокими скоростями фотовосстановления  $O_2$  (таблица). В литературе, однако, приводятся противоречивые оценки ее активности. Наиболее ярко это проявляется при сравнении констант скорости реакции восстановления кислорода в ФС1 ( $k_2$ ), опубликованных в разных работах. Диапазон имеющихся в литературе величин  $k_2$  аномально широкий: от  $7 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  до  $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ .

Хронологически первая оценка  $k_2$  ( $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ) была получена для тилакоидов шпината, в которых ФС1 функционировала изолированно (т.е. диурон был добавлен для ингибирования активности ФС2, а для восстановления  $P_{700}^+$  добавляли искусственные доноры электронов) [55]. Однако эта оценка близка к константе скорости восстановления метилвиологена терминальными кофакторами ФС1 ( $1,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ; [64]), что предполагает сходную эффективность  $O_2$  и метилвиологена как непосредственных акцепторов электронов от ФС1, что мало вероятно, поскольку метилвиологен очень существенно увеличивает скорость переноса электронов «через» ФС1 [42, 56]. Величина  $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ , вероятно, завышена, и причина переоценки может быть связана с использованием в работе Asada и Nakano [55] восстановленного DCPIP в качестве донора электронов для  $P_{700}^+$ . С использованием изолированных комплексов ФС1 из *Synechocystis* и тилакоидов гороха показано, что DCPIP функционирует как редокс-медиатор между ФС1 и  $O_2$  аналогично метилвиологену, т.е. восстановленная форма DCPIP на акцепторной стороне ФС1 эффективно окисляется кислородом [56, 65]. Поэтому оценки  $k_2$  и других характеристик реакции ФС1 с  $O_2$  (например,  $K_m(O_2)$ ) с использованием DCPIP содержат ошибку, поскольку отражают сумму реакций фотовосстановления  $O_2$  кофакторами ФС1 и восстановленным DCPIP.

Самые низкие значения для  $k_2$  ( $7,2 \times 10^2$  и  $6,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ) представлены в работе Khorobrykh и Tyustjärvi [66] и были рассчитаны на основе экспериментальных данных, полученных в экспериментах с тилакоидами гороха [42]. Однако скорости восстановления  $O_2$  в работе Khorobrykh et al. [42] были измерены при атмосферном содержании  $O_2$ , что является

насыщающей концентрацией для реакции восстановления  $O_2$  в ФС1, тогда как для корректной оценки константы скорости реакции необходимо использование субстрата в лимитирующих скоростях концентрациях, т.е. в данном случае, когда скорость восстановления  $O_2$  зависит от его концентрации. Именно так были проведены измерения в работах Asada и Nakano [55], Takahashi и Asada [67] и Kozuleva et al. [20].

Самые недавние величины  $k_2$  ( $0,6 \times 10^5$ – $3,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ; диапазон по интенсивности света; см. ниже) были получены с использованием природного донора электронов для ФС1, пластоцианина [20]. Более того, эти величины получены и в присутствии Фд, ФНР и  $\text{NADP}^+$ , когда терминальные акцепторы ФС1 восстанавливали  $O_2$  одновременно с фотовосстановлением Фд с последующим переносом электронов к  $\text{NADP}^+$ , т.е. в условиях, близких к физиологическим. В отсутствие Фд величины  $k_2$  не изменялись существенно. Таким образом, величины  $k_2$  и скорость восстановления  $O_2$ , измеренная при атмосферном содержании  $O_2$ , представленные в работе Kozuleva et al. [20], являются наиболее близкими характеристиками восстановления  $O_2$  в ФС1 *in vivo*.

Какие кофакторы ФС1 могут восстанавливать  $O_2$ ? Долгое время считали, что электроны переносятся на  $O_2$  от терминальных кофакторов ФС1,  $\text{Fe}_4\text{-S}_4$ -кластеров  $F_A/F_B$ , расположенных в субъединице PsaC на стромальной стороне комплекса ФС1 [9, 64]. Позже стало ясно, что промежуточные кофакторы переноса электронов ФС1 также вносят свой вклад в продукцию  $O_2^{\bullet-}$ . Было, в частности, показано при изучении индуцированного светом  $\text{H}_2\text{O}_2$ -зависимого йодирования белков тилакоидной мембраны, что в течение первых секунд освещения восстановление  $O_2$  осуществляется кофакторами белков PsaA и PsaB, в то время как более длительное освещение приводит к появлению  $\text{H}_2\text{O}_2$  в других частях тилакоидов, включая белковую область вблизи  $F_A/F_B$  [11]. Авторы предположили, что  $O_2$  восстанавливается предшествующим кластерам  $F_A/F_B$  в цепи переноса электронов кластером  $F_X$ , расположенным между субъединицами PsaA и PsaB.

Было выдвинуто предположение об участии в восстановлении  $O_2$  молекул филлохинона (PhQ) [68] – вторичного кофактора переноса электронов, который расположен в  $A_1$ -сайтах двух псевдосимметричных ветвей кофакторов в ФС1, А и В, и предшествует кластеру  $F_X$ . В этой работе тилакоидные мембраны обрабатывали гексаном, что приводи-

ло к экстракции всех молекул пула PQ и одной молекулы PhQ из ФС1, расположенной в А-ветви ( $\text{PhQ}_A$ ). В таких мембранах отсутствовало поглощение  $O_2$  в ответ на вспышки света. Добавка PhQ в виде витамина К приводила к появлению поглощения  $O_2$ , однако только в ответ на первую вспышку света. Авторы предположили, что обработка гексаном модифицировала  $A_1$ -сайт таким образом, что его сродство к PhQ уменьшилось [68].

Восстановление  $O_2$  с участием PhQ в нативных комплексах ФС1 при стационарном освещении впервые изучили на примере комплексов, выделенных из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 [69], предполагая, что состав кофакторов переноса электронов ФС1 и аминокислотное окружение в  $A_1$ -сайте относительно консервативно у цианобактерий, водорослей и высших растений. В работе использовали дикий штамм и штамм с заблокированным биосинтезом PhQ (мутация *menB*). Ранее было показано, что в  $A_1$ -сайты мутанта встраивались молекулы PQ, вследствие чего величина  $E_m (Q/Q^{\bullet-})$  увеличивалась на ~100 мВ относительно величины в диком штамме, что приводило к 1000-кратному увеличению времени жизни семихинона в обеих ветвях [70]. Комплексы ФС1 из мутанта показывали заметно более низкие скорости фотовосстановления  $O_2$  по сравнению с комплексами из дикого штамма [69], что было объяснено большей способностью  $\text{PhQ}^{\bullet-}$  в  $A_1$ -сайтах дикого типа восстанавливать  $O_2$  по сравнению с  $\text{PQ}^{\bullet-}$  в сайтах мутанта и, соответственно, свидетельствовало об их ведущей роли в восстановлении  $O_2$  в ФС1.

Выявление вклада отдельных кофакторов переноса электронов ФС1 стало возможным благодаря исследованию влияния интенсивности света на величину  $k_2$  для комплекса ФС1, выделенного из одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [20]. Было показано увеличение кажущейся величины  $k_2$  с увеличением интенсивности света, что было интерпретировано как свидетельство функционирования нескольких участков фотовосстановления  $O_2$  в ФС1, каждый из которых характеризуется своей константой скорости этого процесса и достигает максимальной эффективности при характерной для него интенсивности света. Экспериментальный анализ с использованием метилвиологена, высокоэффективного акцептора электронов от терминальных кофакторов ФС1, показал, что участие терминальных кофакторов  $F_A/F_B$  в восстановлении  $O_2$  насыщается при низкой интенсивности света, т.е. при этой интенсивности



заполняются электронами кластеры  $F_A/F_B$ . Увеличение кажущейся  $k_2$  при увеличении интенсивности света связано с увеличением вклада в восстановление  $O_2$  предшествующих кофакторов переноса электронов в ФС1 при их заполнении электронами. Вопрос о роли  $F_X$  и PhQ был решен с помощью последовательного удаления  $Fe_4-S_4$ -кластеров путем специальных обработок: удаление  $F_A/F_B$  приводило к небольшому снижению скорости восстановления  $O_2$  в широком диапазоне интенсивностей света, тогда как дополнительное удаление  $F_X$ , в результате чего PhQ в  $A_1$ -сайтах оказывался терминальным кофактором, приводило к существенной стимуляции восстановления  $O_2$ . Последнее соответствовало предположению о ключевой роли PhQ в восстановлении  $O_2$ . Комплексы ФС1, выделенные из мутанта PsaA-F689N *C. reinhardtii*, в которых Phe в позиции 689 белка PsaA заменен на Asn, вследствие чего увеличивалось время жизни  $PhQ^{\bullet+}$  с 0,25 мкс до 17 мкс [71], характеризовались гораздо более высокими скоростями фотовосстановления  $O_2$  в широком диапазоне интенсивностей света [20]. Эти данные также указывают на увеличение вклада  $PhQ^{\bullet+}$  в генерацию  $O_2^{\bullet-}$  в ФС1 при увеличении освещенности.

Таким образом, в изолированных комплексах ФС1 активны два участка восстановления  $O_2$ : терминальные кластеры  $F_A/F_B$  и PhQ в форме семихинонов в  $A_1$ -сайтах. Вклад каждого участка зависит от условий. При низкой интенсивности света присутствие Фд, ФНР и  $NADP^+$  снижало скорость фотовосстановления  $O_2$ , поскольку отток электронов от ФС1 уменьшал накопление электронов на кластерах  $F_A/F_B$  [20]. В то же время присутствие Фд, ФНР и  $NADP^+$  не подавляло фотовосстановление  $O_2$ , наблюдаемое при высокой интенсивности света, что указывало на то, что именно PhQ ответственны за восстановление  $O_2$  в условиях параллельного транспорта электронов к  $NADP^+$  в этих условиях.

Удивительно, но подход, основанный на обнаружении окисленных модифицированных аминокислотных остатков, который был успешно применен для определения  $O_2^{\bullet-}$ -генерирующей активности кофакторов ФС2 и  $b_6f$ -комплекса (см. выше), оказался малоприменимым для визуализации образования  $O_2^{\bullet-}$  в ФС1. Окисленные остатки не были обнаружены в непосредственной близости от кластеров  $F_A/F_B$  в комплексах ФС1 шпината, выращенного в полевых условиях [72]. Также не обнаружено модифицированных остатков в непосредственной близости от  $F_X$  и  $PhQ_A$  [72]. Напротив, были обнаружены два модифицированных

остатка в непосредственной близости от PhQ в В-ветви ( $PhQ_B$ ). Однако интерпретация этих результатов затруднена из-за расположения хлоринового кольца молекулы хлорофилла  $a$  между  $PhQ_B$  и этими остатками [72]. Можно предположить, что  $O_2^{\bullet-}$ , продуцируемый кластерами  $F_A/F_B$ , легко диффундирует из белка PsaC в строму (кластер  $F_B$  находится на расстоянии 3–4 Å от поверхности PsaC) и не модифицирует аминокислотные остатки. Возможно, что  $O_2^{\bullet-}$  из  $A_1$ -сайтов также эффективно диффундирует на стромальную сторону мембраны, не вступая в реакции с близлежащими аминокислотными остатками, — наличие водных полостей, ведущих из  $A_1$ -сайтов, было показано для ФС1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 [73].

Необходимо отметить, что скорость генерации  $O_2^{\bullet-}$  в изолированных комплексах ФС1 (таблица) может не вполне отражать реальную  $O_2^{\bullet-}$ -генерирующую активность ФС1 в тилакоидах и хлоропластах. Восстановление  $O_2$  в изолированных комплексах ФС1 из *Synechocystis* [69] и *C. reinhardtii* [20] не достигало насыщения с увеличением освещенности в широком диапазоне интенсивностей света (до 2000 мкмоль фотонов/( $m^2 \cdot s$ ), тогда как восстановление  $O_2$  изолированно функционирующей ФС1 в тилакоидах высших растений (в присутствии диурона и искусственных доноров электронов) имело тенденцию к насыщению при 500–600 мкмоль фотонов/( $m^2 \cdot s$ ) [42, 65]. С одной стороны, это противоречие может быть связано с внесением таких редокс-медиаторов, как N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилен диамин (ТМФД) и аскорбат натрия для поддержания активности ФС1 в тилакоидах. Окисленные формы этих соединений могут акцептировать электроны от терминальных кофакторов ФС1 [74–76], что должно уменьшать накопление электронов на кофакторах ФС1. С другой стороны, в изолированных комплексах ФС1 могут отсутствовать какие-то регуляторные компоненты, определяющие  $O_2^{\bullet-}$ -генерирующую активность ФС1 в тилакоидах. В частности, существование белка, регулирующего восстановление  $O_2$  в ФС1, было предположено на основе сравнения влияния условий короткого и длинного дня на реакцию Мелера в растениях табака [77]. Оказалось, что условия короткого дня способствуют более высокой скорости ФС1-зависимого фотовосстановления  $O_2$  в тилакоидах и листьях. Авторы предположили, что некий белок связывается с ФС1 в условиях короткого дня и облегчает диффузию  $O_2$  к месту его фотовосстановления, стимулируя генерацию  $O_2^{\bullet-}$ . Также было

показано, что субъединица PsaE, которая вместе с субъединицами PsaC и PsaD образует докинг-сайт для Фд, может определять утечку электронов к  $O_2$  [78].

В работе Michelet и Krieger-Liszkay [77] было предположено, что гипотетическим белком, регулирующим фотовосстановление  $O_2$  в ФС1, может быть также ФНР. Было показано, что ФНР и ФС1, выделенные из *C. reinhardtii*, взаимодействуют друг с другом в стехиометрии 1/1, в частности с вовлечением субъединицы PsaE [79], и авторы предположили, что ФНР может функционировать как субъединица ФС1. Связывание ФНР с ФС1 через субъединицу PsaE было также показано для ячменя [80]. У высших растений основными белками, связывающими ФНР, являются TROL и Tic62 [81, 82]. Однако в случае нарушения взаимодействия с Tic62 и TROL ФНР может взаимодействовать с альтернативными более слабыми сайтами связывания на тилакоидной мембране, в том числе и с ФС1 [60]. Возможно, что присоединение ФНР к ФС1 может влиять на диффузию  $O_2$  к кофакторам ФС1 и/или инициировать перераспределение путей восстановления  $O_2$  внутри ФС1.

## ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ

Эффективный перенос электронов от компонентов ФЭТЦ к  $O_2$  приводит к избыточному образованию таких АФК, как  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $-HO^{\bullet}$ , а также уменьшает квантовый выход световых реакций фотосинтеза. ФЭТЦ оксигенных фототрофов в современном виде сформировалась в условиях постоянной продукции  $O_2$  на свету. Логично предполагать, что минимизация реакций компонентов ФЭТЦ с  $O_2$  была одним из направлений эволюции фотосинтетического аппарата. Эволюция различных фотосинтетических комплексов в контексте возникновения кислородной атмосферы была предметом нескольких недавних обзоров [6, 83–86], в которых много внимания уделяется уменьшению вероятности образования синглетного кислорода ( $^1O_2$ ), что, несомненно, было одним из направлений в эволюции фотосинтетического аппарата. В этом обзоре мы рассмотрим изменения, которые могли происходить в фотосинтетическом аппарате для минимизации непродуктивной утечки электронов к  $O_2$  и излишнего образования  $O_2^{\bullet-}$ .

На наш взгляд, эволюционные изменения должны были затронуть в первую очередь пулы мобильных переносчиков, поскольку их восстановленное состояние необходимо для про-

дуктивного транспорта электронов. Величины  $E_m$  пластоцианина и цитохрома  $c_6$ , доноров электронов к ФС1, достаточно высоки, чтобы не рассматривать их реакцию с  $O_2$ , однако Фд и компоненты пула PQ даже в современных ФЭТЦ обладают достаточно низкими потенциалами для генерации  $O_2^{\bullet-}$ , что наблюдается экспериментально (см. выше).

Конечный продукт световых стадий фотосинтеза, восстановленный Фд, служит донором электронов не только для восстановления  $NADP^+$ , но и для других метаболических путей в хлоропласте [87]. Для реализации этих путей восстановленный Фд должен диффундировать в строме хлоропласта. Очевидно, это требует низкой эффективности реакции Фд с  $O_2$ . У современных фототрофов с оксигенным типом фотосинтеза простетической группой Фд служит кластер  $Fe_2-S_2$ , который достаточно глубоко погружен в белок. В современных фототрофах с аноксигенным фотосинтезом, имеющих реакционные центры I-го типа, роль акцептора электронов выполняет Фд с двумя кластерами  $Fe_4-S_4$ , один из которых расположен практически на поверхности белка [83], вследствие чего он доступен для молекул  $O_2$ . Предполагается [83, 84], что погружение кластера вглубь белка ограничивает доступ к нему молекул  $O_2$  и уменьшает вероятность переноса электрона на  $O_2$ . Таким образом, замена дикластерного  $Fe_4-S_4$  Фд на монокластерный  $Fe_2-S_2$  Фд с относительно глубоко погруженным в белок кластером при эволюции фототрофов могла быть вызвана адаптацией к функционированию в присутствии  $O_2$ .

В современной ФЭТЦ дикластерный Фд сохранился в виде субъединицы PsaC, которая несет 2  $Fe_4-S_4$ -кластера, являющихся кофакторами ФС1 — промежуточный  $F_A$  и терминальный  $F_B$ , который восстанавливает мобильный монокластерный Фд. Быстрый отток электронов от  $F_B$  к  $O_2$  нежелателен, поскольку может снижать эффективность восстановления Фд, которая зависит от диффузионного обмена восстановленного Фд на окисленный на акцепторной стороне ФС1. Более высокий  $E_m$  ( $F_A/F_A^-$ ) по сравнению с таковым для  $F_B$  обеспечивает более долгое время пребывания электрона на  $F_A$ , чем на  $F_B$  [88, 89]. Таким образом, инверсия редокс-потенциалов  $F_A$  и  $F_B$  может быть эволюционной адаптацией для минимизации восстановления  $O_2$  кофактором  $F_B$  в отсутствие Фд [83, 84]. Кофактор  $F_A$  погружен в белок и находится в области с достаточной низкой диэлектрической проницаемостью [90]. Повышение его  $E_m$  также уменьшило термодинамическую вероятность его реакции с  $O_2$ .



В энергопреобразующих мембранах самых первых организмов в качестве липорастворимого мобильного переносчика протонов и электронов, по всей видимости, функционировал менахинон, который и по сей день присутствует у ряда анаэробных фототрофов [91]. Потенциалы редокс-пар ( $Q/Q^{\bullet-}$ ) и ( $Q/QH_2$ ) менахинона примерно на 100 и 180 мВ ниже, чем соответствующих пар PQ, т.е. восстановленные формы менахинона значительно легче окисляются  $O_2$ , нежели формы PQ. Поэтому в присутствии  $O_2$  менахиноны ниже по эффективности в качестве переносчиков электронов от реакционных центров II-го типа к цитохромным комплексам *bc*-типа, чем такие высокопотенциальные хиноны, как PQ или убихинон. Таким образом, эволюционная замена в мембранах организмов с кислородным типом фотосинтеза менахинона на PQ, хинон с более положительной величиной  $E_m$ , представляется важным этапом оптимизации фотосинтетического аппарата к условиям кислородной атмосферы.

Однако  $PQ^{\bullet-}$  обладает  $E_m$ , позволяющим восстанавливать молекулы  $O_2$  с образованием  $O_2^{\bullet-}$  в водной среде (см. выше), хотя и с небольшими скоростями. Семихиноны вообще кинетически эффективно реагируют с молекулами  $O_2$  [10]. В ФЭТЦ есть несколько участков, где PQ последовательно восстанавливается до  $PQH_2$  и где  $PQH_2$  окисляется до PQ с образованием промежуточной семихинонной формы. Помимо  $PQ^{\bullet-}$ , семихинонная форма изоаллоксазиновой части молекулы ФАД промежуточно образуется в ФНР при последовательном окислении двух молекул Фд и при восстановлении молекулы  $NADP^+$ . Эффективное окисление кислородом семихинонных форм этих кофакторов в момент, когда они должны получить или отдать второй электрон, могло бы нарушать нормальный перенос электрона. Поэтому следующая глобальная тенденция при адаптации фотосинтетического аппарата к функционированию в присутствии  $O_2$ , на наш взгляд, заключалась в предотвращении реакций с  $O_2$  промежуточных семихинонных форм компонентов ФЭТЦ в процессе их двукратного восстановления или окисления.

Семихинонная форма ФАД реагирует с  $O_2$  с высокой эффективностью [92]. Возможный механизм для предотвращения окисления семихинонной формы ФАД кислородом рассмотрен в обзоре Pierella Karlusich и Carrillo [85]. Отмечено, что ФНР фототрофов с кислородным типом фотосинтеза обладает на 2 порядка большей каталитической активностью, чем ФНР анаэробных организмов [93], хотя сред-

ство ФНР к Фд может быть близким [94]. Высокая каталитическая активность достигается за счет конформационных изменений, вызванных связыванием  $NADP^+$ , которые значительно облегчают как окисление Фд [95], так и диссоциацию окисленных молекул Фд из комплекса с ФНР [96]. Такое повышение каталитической активности ФНР, по-видимому, понижает вероятность как окисления семихинонной формы ФАД кислородом, так и образования комплекса Фд/ФНР<sup>-</sup> в отсутствие  $NADP^+$ .

$PQ^{\bullet-}$  образуется при однократном восстановлении PQ в  $Q_B$ -сайте ФС2 и  $Q_R$ -сайте  $b_6f$ -комплекса. По всей видимости, в сайте  $Q_B$  ФС2 проблема уменьшения утечки электронов на молекулы  $O_2$  решается на термодинамическом уровне за счет высокого  $E_m$  ( $Q_B/Q_B^{\bullet-}$ ) — +90 мВ [33], вследствие чего реакция  $Q_B^{\bullet-}$  с  $O_2$  термодинамически невыгодна даже в водной фазе. В  $Q_R$ -сайте  $b_6f$ -комплекса не показано образование  $PQ^{\bullet-}$ , хотя появление семихинона было зарегистрировано в аналогичном сайте *bc*<sub>L</sub>-комплексов пурпурных бактерий [97, 98]. Одним из ключевых отличий *bc*<sub>L</sub>- и  $b_6f$ -комплексов является наличие в цитохроме  $b_6$  последнего еще одного гема — ковалентно связанного гема  $c_n$ . Предполагается, что в рамках функционирования Q-цикла, в  $Q_R$ -сайте  $b_6f$ -комплекса первый из двух электронов, необходимых для восстановления PQ, переносится от высокопотенциального гема цитохрома  $b_6$  ( $b_6^H$ ) на гем  $c_n$  [99], а с гема  $c_n$  электрон переносится к молекуле PQ только одновременно с переносом второго электрона от гема  $b_6^L$  [7]. Такой механизм минимизирует время жизни  $PQ^{\bullet-}$  в  $Q_R$ -сайте и, соответственно, уменьшает вероятность его реакции с  $O_2$ .

В  $Q_O$ -сайте  $b_6f$ -комплекса происходит последовательное окисление  $PQH_2$  до PQ, как считается, по концертному механизму, т.е. следующими друг за другом актами переноса электрона к  $Fe_2-S_2$ -центру Риске и к низкопотенциальному гему  $b_6^L$ . Эффективное функционирование Q-цикла обеспечивает эффективный отток электронов от  $PQ^{\bullet-}$  в  $Q_O$ -сайте по низкопотенциальной ветви кофакторов  $b_6f$ -комплекса. Однако если в пуле PQ мало окисленных молекул PQ или в  $b_6f$ -комплексе гем  $b_6^L$  уже восстановлен, то может происходить обратный перенос электрона с гема  $b_6^L$  ( $E_m$  ( $b_6^L/b_6^{L-}$ ) = -150 мВ) на  $PQ^{\bullet-}$  ( $E_m$  ( $PQ^{\bullet-}/PQH_2$ ) = +480 мВ) [7], что уменьшает вероятность реакции с  $O_2$  и гема  $b_6^L$ , и  $PQ^{\bullet-}$  в  $Q_O$ -сайте. Нарушение концертного окисления может происходить и в условиях фотосинтетического контроля, когда замедляется

выход протонов из  $Q_0$ -сайта в люмен, и  $PQH^+$  не может депротонироваться аминокислотным остатком Glu78 субъединицы IV, который остается в протонированном состоянии, как это было предположено недавно [100]. Поскольку  $E_m(PQ/PQH^+)$  выше, чем  $(PQ/PQ^{\bullet-})$ , утечка электронов от протонированного плагосемихинона к  $O_2$  менее вероятна. Мы предполагаем, что замедление отвода протонов из  $Q_0$ -сайта и увеличение времени жизни  $PQH^+$  путем поддержания Glu78 в протонированном состоянии представляет собой важный механизм предотвращения реакции  $PQ^{\bullet-}$  с  $O_2$  в  $Q_0$ -сайте.

Следствием замены свободного менахиона мембранного пула на более высокопотенциальный хинон стало повышение (примерно на 110–150 мВ)  $E_m$  всех прочносвязанных кофакторов в белках-партнерах мобильного мембранного пула переносчиков — т.е. в реакционном центре II-го типа и цитохромном  $bc_1$ -комплексе [101, 102]. Это, в свою очередь, привело к уменьшению вероятности окисления этих кофакторов молекулами  $O_2$ . По всей видимости, повышения  $E_m$  оказалось достаточно для решения проблемы утечки электронов к  $O_2$  в цитохромном  $b_6f$ -комплексе. Среди всех его прочносвязанных кофакторов гем  $b_6^L$  обладает самым низким значением  $E_m$  (–150 мВ) [103], что недостаточно для восстановления  $O_2$  в гидрофобных зонах мембраны. Нахождение электрона на геме  $c_n$  должно поддерживать эффективный отток электронов от гема  $b_6^L$  (см. выше), минимизируя его реакцию с  $O_2$ .

Однако для ФС2 повышения  $E_m$  могло оказаться недостаточно для минимизации окисления ее кофакторов кислородом. Прочносвязанный PQ в сайте  $Q_A$  в обычных условиях функционирования восстанавливается только однократно. Эффективность продуктивного переноса электрона с  $PQ^{\bullet-}$  в  $Q_A$ -сайте на PQ в  $Q_B$ -сайте определяется наличием  $HCO_3^-$  вблизи негемового железа, присутствие которого понижает  $E_m(Q_A/Q_A^-)$  с –70 мВ до –145 мВ [31]. Однако показано, что  $HCO_3^-$  на акцепторной стороне ФС2 блокирует возможный канал, по которому молекулы  $O_2$  диффундируют к сайту  $Q_A$ , и тем самым ограничивается доступ молекулам  $O_2$  к сайту [15], что уменьшает образование  $O_2^{\bullet-}$ .

Феофитин обладает достаточно низким  $E_m$  (–600 мВ), чтобы восстановить молекулу  $O_2$  даже в гидрофобных частях белка. Однако уменьшение непродуктивной утечки электронов к  $O_2$  реализовано на кинетическом уровне: малое время жизни восстановленного фео-

фитина вследствие переноса электронов к  $Q_A$  (200–500 пс) и рекомбинации восстановленного феофитина с  $P680^+$  (4–30 нс), по всей видимости, значительно уменьшает вероятность реакции этого кофактора с  $O_2$ .

В реакционных центрах I-го типа современных анаэробных организмов нет прочносвязанных хинонов [104–106] и, в частности, у гелиобактерий менахиноны функционируют как мобильный липорастворимый акцептор электронов, альтернативный Фд [107]. Наличие двух пулов акцепторов может быть выгодным с точки зрения эффективности фотосинтетических реакций и защиты фотосинтетического аппарата от избыточной освещенности. В ФС1, реакционном центре I-го типа, присущем исключительно фототрофам с окисленным фотосинтезом, менахинон (а точнее у большинства организмов его производное, PhQ) остается прочносвязанным кофактором, который служит как одноэлектронный переносчик, т.е. не восстанавливается до гидрохинона [108]. В отличие от переноса электрона между  $Q_A$  и  $Q_B$  в ФС2, стехиометрия которых составляет 1/1, в ФС1 хиноны двух сайтов  $A_1$  переносят электрон к одному  $Fe_4-S_4$ -кластеру кофактора  $F_X$ . В условиях повышенной освещенности и ограниченного оттока электронов от стромальных акцепторов ФС1 может возникать ситуация, когда железосерные кластеры ФС1 будут преимущественно восстановлены, а два сайта  $A_1$  будут конкурировать за один кофактор  $F_X$ . В этом случае может возникнуть риск рекомбинации зарядов хинонов с  $P_{700}^+$ , в том числе по механизму, приводящему к образованию  $^3P_{700}$ , вследствие чего будет увеличиваться риск генерации  $^1O_2$  [84]. Окисление  $PhQ^{\bullet-}$  молекулами  $O_2$  в этом случае будет потенциально менее опасным процессом, уменьшающим перевосстановление цепи переносчиков и снижающим риски генерации  $^1O_2$ . Аналогичные процессы могли бы быть возможны и для  $Q_A$ -сайта в ФС2, однако  $E_m(PhQ/PhQ^{\bullet-})$  гораздо более отрицательный, чем  $E_m(PQ/PQ^{\bullet-})$ , и минимизировать утечку электронов с  $PhQ^{\bullet-}$  к  $O_2$  гораздо сложнее, чем с  $PQ^{\bullet-}$ . При этом сохранение низких величин  $E_m$  кофакторов ФС1 необходимо, чтобы восстанавливать такой низкопотенциальный переносчик электронов, как Фд.

Кинетический контроль (т.е. быстрый перенос электрона к следующему в цепи кофактору), вероятно, также не может быть полностью реализован в ФС1, где присутствуют два PhQ, отличающиеся по величине  $E_m$  на 170 мВ [90] и по времени жизни семихиноновой формы на 1 порядок [109]. Два PhQ в

стационарных условиях освещения могут конкурировать за один кофактор  $F_x$ , что повышает вероятность утечки электрона к  $O_2$  с более долгоживущего  $PhQ^{\bullet-}$  в А-ветви. Ограничение доступности  $O_2$  к  $PhQ$  в  $A_1$ -сайтах представляется мало реализуемой в эволюционном плане стратегией. В отличие от  $ФС2$ , в  $ФС1$  отсутствуют каналы, по которым поступают субстраты/отводятся продукты реакций, а также бикарбонат-ион. В структуре цианобактериальной  $ФС1$  промоделированы водные полости, соединяющие  $A_1$ -сайты с акцепторной стороной [73], по которым предполагается диффузия не только молекул  $O_2$ , но и гораздо большей молекулы – метилвиологена.

Таким образом, мы предполагаем, что протекание реакции  $O_2$  с  $PhQ$  в  $A_1$ -сайтах не могло быть минимизировано в достаточной степени, и до сих пор среди всех компонентов ФЭТЦ наиболее высокие скорости генерации  $O_2^{\bullet-}$  характерны для  $ФС1$  именно за счет присутствия в ней  $PhQ$ . В условиях перевосстановления цепи, когда интенсивность света превышает возможности метаболической утилизации световой энергии,  $O_2$  оказывается доступным дополнительным акцептором электронов, способным поддерживать электронный транспорт, уменьшая перевосстановление компонентов ФЭТЦ, провоцирующее фотоингибирование. Поэтому, вероятно, эволюция фотосинтетического аппарата шла в направлении не просто минимизации переноса электронов к  $O_2$ , а в направлении регулирования этого процесса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выше были рассмотрены возможные механизмы восстановления  $O_2$  до  $O_2^{\bullet-}$  различными компонентами ФЭТЦ, а также эволюционные преобразования, которые ФЭТЦ могла претерпеть для уменьшения непродуктивной утечки электронов к  $O_2$ . Таблица суммирует имеющиеся в литературе оценки скоростей генерации  $O_2^{\bullet-}$  на разных участках ФЭТЦ. В таблице также представлены скорости, нормированные на содержание  $ФС2$ , что позволяет сравнить потенциальный вклад разных компонентов в образование  $O_2^{\bullet-}$  в хлоропласте.

Такое сравнение требует, однако, учета условий измерения указанных скоростей. Во-первых, скорости, представленные в таблице, получены с использованием разных экспериментальных подходов в разных условиях и для разных организмов. Во-вторых, многие скорости были получены или для изо-

лированных структур (для  $ФС2$ ,  $ФС1$ ,  $b_6f$ -комплекса), или в присутствии ингибиторов (для пула  $PQ$ ), вследствие чего могли быть изменены взаимосвязи между компонентами ФЭТЦ, а какие-то компоненты, присутствующие в целых мембранах, могли отсутствовать. В-третьих, в ряде случаев ( $ФС2$ , пул  $PQ$ )  $O_2$  выступал единственным доступным акцептором электронов. Однозначно судить о том, как это повлияло на вероятность генерации  $O_2^{\bullet-}$  в этих случаях, сложно. Например, присутствие  $NADP^+$  уменьшает генерацию  $O_2^{\bullet-}$  восстановленным Фд [53], тогда как присутствие Фд и  $NADP^+$  не влияет существенно на генерацию  $O_2^{\bullet-}$  в  $ФС1$  [20]. Следует также учитывать, что для нормировки в таблице использовано относительное содержание отдельных пигмент-белковых комплексов для конкретного организма (*Arabidopsis thaliana*) в конкретных условиях [24]. Содержание  $ФС2$ ,  $b_6f$ -комплекса,  $ФС1$  и относительный размер фотоактивного пула  $PQ$  и их соотношение варьируют в растениях в зависимости от условий окружающей среды [110, 111], и относительный вклад этих компонентов в образование  $O_2^{\bullet-}$ , очевидно, также может варьировать.

Несмотря на эти ограничения, сопоставление скоростей, представленных в таблице, является полезным приближением, помогающим комплексно описать восстановление  $O_2$  в ФЭТЦ. Хорошо видно, что вклад  $ФС2$  наименьший, но и Фд, рассматривавшийся ранее как основной восстановитель  $O_2$  (см. выше), генерирует  $O_2^{\bullet-}$  примерно с такими же скоростями. Следует отметить, что расчет скоростей для Фд сделан, исходя из предположения, что в хлоропласте восстановленный Фд накапливается, и поэтому скорости близки к максимальным. Пул  $PQ$  и цитохромный  $b_6f$ -комплекс обеспечивают близкий вклад в общее фотовосстановление  $O_2$  в хлоропластах. Вклад  $ФС1$  зависит от интенсивности света, и при высокой интенсивности  $ФС1$  образует примерно половину всех  $O_2^{\bullet-}$ , генерируемых в данной модельной ФЭТЦ.

$ФС1$  принято считать основным участком восстановления  $O_2$  в ФЭТЦ. На это указывает ряд косвенных свидетельств, которые, однако, могут быть интерпретированы и в пользу других участков ФЭТЦ, и ряд экспериментальных результатов, основанных на применении мутантов или ингибиторов, что также допускает их неоднозначную интерпретацию. Наш анализ показывает, что ни один компонент ФЭТЦ не может генерировать  $O_2^{\bullet-}$  так же эффективно, как  $ФС1$  при высокой интенсивности света. Но из этих данных также очевидно,



что компоненты ФЭТЦ без ФС1 суммарно могут генерировать  $O_2^{\bullet -}$  со скоростью, сопоставимой с таковой в ФС1. Поэтому, хотя представляется целесообразным считать ФС1 местом, где на свету  $O_2^{\bullet -}$  образуется с наибольшими скоростями, вероятно, не следует рассматривать ФС1 как основной сайт его генерации при всех обстоятельствах.

**Вклад авторов.** М.А. Козулева — написание текста; Б.Н. Иванов — редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-01074).

**Благодарности.** Авторы благодарят д.б.н. М.М. Борисову за полезные дискуссии при подготовке обзора.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mehler, A. H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents, *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 65-77, doi: 10.1016/0003-9861(51)90082-3.
- Иванов Б., Хоробрых С., Козулева М., Борисова-Мубаракшина М. (2014) Роль кислорода и его активных форм в фотосинтезе, *Современные Проблемы Фотосинтеза/Под Ред. Аллахвердиева С. И., Рубина А. Б., Шувалова В. А., Ижевский Институт Компьютерных Исследований*, Ижевск-Москва, **1**, 407-460.
- Mubarakshina, M. M., and Ivanov, B. N. (2010) The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes, *Physiol. Plant.*, **140**, 103-110, doi: 10.1111/j.1399-3054.2010.01391.x.
- Pospíšil, P. (2012) Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 218-231, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.05.017.
- Kozuleva, M. A., and Ivanov, B. N. (2016) The mechanisms of oxygen reduction in the terminal reducing segment of the chloroplast photosynthetic electron transport chain, *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1397-1404, doi: 10.1093/pcp/pcw035.
- Kozuleva, M. A., Ivanov, B. N., Vetoshkina, D. V., and Borisova-Mubarakshina, M. M. (2020) Minimizing an electron flow to molecular oxygen in photosynthetic electron transfer chain: an evolutionary view, *Front. Plant Sci.*, **11**, 211, doi: 10.3389/fpls.2020.00211.
- Sarewicz, M., Pintscher, S., Pietras, R., Borek, A., Bujnowicz, Ł., Hanke, G., Cramer, W. A., Finazzi, G., and Osyczka, A. (2021) Catalytic reactions and energy conservation in the cytochrome  $bc_1$  and  $b_6f$  complexes of energy-transducing membranes, *Chem. Rev.*, **121**, 2020-2108, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00712.
- Allen, J. F., and Hall, D. O. (1973) Superoxide reduction as a mechanism of ascorbate-stimulated oxygen uptake by isolated chloroplasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 856-862, doi: 10.1016/0006-291X(73)91016-4.
- Asada, K., Kiso, K., and Yoshikawa, K. (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2175-2181, doi: 10.1016/S0021-9258(19)42815-9.
- Wardman, P. (1990) Bioreductive activation of quinones: redox properties and thiol reactivity, *Free Radic. Res. Commun.*, **8**, 219-229, doi: 10.3109/10715769009053355.
- Takahashi, M., and Asada, K. (1988) Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids, *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**, 714-722, doi: 10.1016/0003-9861(88)90080-X.
- Kozuleva, M., Klenina, I., Proskuryakov, I., Kirilyuk, I., and Ivanov, B. (2011) Production of superoxide in chloroplast thylakoid membranes: ESR study with cyclic hydroxylamines of different lipophilicity, *FEBS Lett.*, **585**, 1067-1071, doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.004.
- Kozuleva, M., Klenina, I., Mysyn, I., Kirilyuk, I., Opanasenko, V., Proskuryakov, I., and Ivanov, B. (2015) Quantification of superoxide radical production in thylakoid membrane using cyclic hydroxylamines, *Free Radic. Biol. Med.*, **89**, 1014-1023, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.016.
- Kozuleva, M., Goss, T., Twachtmann, M., Rudi, K., Trapka, J., Selinski, J., Ivanov, B., Garapati, P., Steinhoff, H. J., Hase, T., Scheibe, R., Klare, J. P., and Hanke, G. T. (2016) Ferredoxin:NADP(H) oxidoreductase abundance and location influences redox poise and stress tolerance, *Plant Physiol.*, **172**, 1480-1493, doi: 10.1104/pp.16.01084.
- Fantuzzi, A., Allgöwer, F., Baker, H., McGuire, G., Teh, W. K., Gamiz-Hernandez, A. P., Kaila, V. R. I., and Rutherford, A. W. (2022) Bicarbonate-controlled reduction of oxygen by the QA semiquinone in Photosystem II in membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2116063119, doi: 10.1073/pnas.2116063119.



16. Khorobrykh, S. A., and Ivanov, B. N. (2002) Oxygen reduction in a plastoquinone pool of isolated pea thylakoids, *Photosynth. Res.*, **71**, 209-219, doi: 10.1023/A:1015583502345.
17. Ford, R. C., and Evans, M. C. W. (1983) Isolation of a photosystem 2 preparation from higher plants with highly enriched oxygen evolution activity, *FEBS Lett.*, **160**, 159-164, doi: 10.1016/0014-5793(83)80957-0.
18. Fan, D.-Y., Hope, A. B., Smith, P. J., Jia, H., Pace, R. J., Anderson, J. M., and Chow, W. S. (2007) The stoichiometry of the two photosystems in higher plants revisited, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1767**, 1064-1072, doi: 10.1016/j.bbabbio.2007.06.001.
19. Baniulis, D., Hasan, S. S., Stofleth, J. T., and Cramer, W. A. (2013) Mechanism of enhanced superoxide production in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex of oxygenic photosynthesis, *Biochemistry*, **52**, 8975-8983, doi: 10.1021/bi4013534.
20. Kozuleva, M., Petrova, A., Milrad, Y., Semenov, A., Ivanov, B., Redding, K. E., and Iftach, Y. (2021) Plastoquinone is the principal Mehler reaction site within photosystem I in high light, *Plant Physiol.*, **186**, 1848-1858, doi: 10.1093/plphys/kiab221.
21. Hosein, B., and Palmer, G. (1983) The kinetics and mechanism of oxidation of reduced spinach ferredoxin by molecular oxygen and its reduced products, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **723**, 383-390, doi: 10.1016/0005-2728(83)90045-2.
22. Golbeck, J., and Radmer, R. (1984) Is the rate of oxygen uptake by reduced ferredoxin sufficient to account for photosystem I-mediated O<sub>2</sub> reduction, *Adv. Photosynth. Res.*, **1**, 561.
23. Böhme, H. (1978) Quantitative determination of ferredoxin, ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and plastocyanin in spinach chloroplasts, *Eur. J. Biochem.*, **83**, 137-141, doi: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12077.x.
24. McKenzie, S. D., Ibrahim, I. M., Aryal, U. K., and Puthiyaveetil, S. (2020) Stoichiometry of protein complexes in plant photosynthetic membranes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148141, doi: 10.1016/j.bbabbio.2019.148141.
25. Frankel, L. K., Sallans, L., Limbach, P. A., and Bricker, T. M. (2013) Oxidized amino acid residues in the vicinity of QA and PheoD1 of the photosystem II reaction center: putative generation sites of reducing-side reactive oxygen species, *PLoS One*, **8**, e58042, doi: 10.1371/journal.pone.0058042.
26. Kale, R., Hebert, A. E., Frankel, L. K., Sallans, L., Bricker, T. M., and Pospíšil, P. (2017) Amino acid oxidation of the D1 and D2 proteins by oxygen radicals during photoinhibition of Photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2988-2993, doi: 10.1073/pnas.1618922114.
27. Kumar, A., Prasad, A., Sedlářová, M., Kale, R., Frankel, L. K., Sallans, L., Bricker, T. M., and Pospíšil, P. (2021) Tocopherol controls D1 amino acid oxidation by oxygen radicals in Photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2019246118, doi: 10.1073/pnas.2019246118.
28. Taylor, R. M., Sallans, L., Frankel, L. K., and Bricker, T. M. (2018) Natively oxidized amino acid residues in the spinach cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex, *Photosynth. Res.*, **137**, 141-151, doi: 10.1007/s11120-018-0485-0.
29. Ananyev, G., Renger, G., Wacker, U., and Klimov, V. (1994) The photoproduction of superoxide radicals and the superoxide dismutase activity of Photosystem II. The possible involvement of cytochrome *b559*, *Photosynth. Res.*, **41**, 327-338, doi: 10.1007/BF00019410.
30. Cleland, R. E., and Grace, S. C. (1999) Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II, *FEBS Lett.*, **457**, 348-352, doi: 10.1016/S0014-5793(99)01067-4.
31. Brinkert, K., Causmaecker, S. D., Krieger-Liszka, A., Fantuzzi, A., and Rutherford, A. W. (2016) Bicarbonate-induced redox tuning in Photosystem II for regulation and protection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 12144-12149, doi: 10.1073/pnas.1608862113.
32. Linke, K., and Ho, F. M. (2014) Water in photosystem II: structural, functional and mechanistic considerations, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1837**, 14-32, doi: 10.1016/j.bbabbio.2013.08.003.
33. Causmaecker, S. D., Douglass, J. S., Fantuzzi, A., Nitschke, W., and Rutherford, A. W. (2019) Energetics of the exchangeable quinone, Q<sub>B</sub>, in Photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 19458-19463, doi: 10.1073/pnas.1910675116.
34. Kruk, J., and Strzałka, K. (1999) Dark reoxidation of the plastoquinone-pool is mediated by the low-potential form of cytochrome *b-559* in spinach thylakoids, *Photosynth. Res.*, **62**, 273-279, doi: 10.1023/A:1006374319191.
35. Pospíšil, P., Šnyrychová, I., Kruk, J., Strzałka, K., and Nauš, J. (2006) Evidence that cytochrome *b559* is involved in superoxide production in photosystem II: effect of synthetic short-chain plastoquinones in a cytochrome *b559* tobacco mutant, *Biochem. J.*, **397**, 321-327, doi: 10.1042/BJ20060068.
36. Müh, F., and Zouni, A. (2016) Cytochrome *b 559* in Photosystem II, in *Adv. Photosynth. Respir.* Springer, Dordrecht, **41**, 143-175, doi: 10.1007/978-94-017-7481-9\_8.
37. Shuvalov, V. A., Schreiber, U., and Heber, U. (1994) Spectral and thermodynamic properties of the two hemes of the D1D2cytochrome *b-559* complex of spinach, *FEBS Lett.*, **337**, 226-230, doi: 10.1016/0014-5793(94)80196-7.
38. Yadav, D. K., Prasad, A., Kruk, J., and Pospíšil, P. (2014) Evidence for the involvement of loosely bound plastosemiquinones in superoxide anion radical production in photosystem II, *PLoS One*, **9**, e115466, doi: 10.1371/journal.pone.0115466.
39. Khorobrykh, A. (2019) Hydrogen peroxide and superoxide anion radical photoproduction in PSII

- preparations at various modifications of the water-oxidizing complex, *Plants*, **8**, 329, doi: 10.3390/plants8090329.
40. Mubarakshina, M., Khorobrykh, S., and Ivanov, B. (2006) Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1757**, 1496-1503, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.09.004.
  41. McCauley, S. W., and Melis, A. (1986) Quantitation of plastoquinone photoreduction in spinach chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **8**, 3-16, doi: 10.1007/BF00028472.
  42. Khorobrykh, S., Mubarakshina, M., and Ivanov, B. (2004) Photosystem I is not solely responsible for oxygen reduction in isolated thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1657**, 164-167, doi: 10.1016/j.bbabi.2004.04.009.
  43. Forquer, I., Covian, R., Bowman, M. K., Trumpower, B. L., and Kramer, D. M. (2006) Similar transition states mediate the Q-cycle and superoxide production by the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *J. Biol. Chem.*, **281**, 38459-38465, doi: 10.1074/jbc.M605119200.
  44. Vetoshkina, D. V., Ivanov, B. N., Khorobrykh, S. A., Proskuryakov, I. I., and Borisova-Mubarakshina, M. M. (2017) Involvement of the chloroplast plastoquinone pool in the Mehler reaction, *Physiol. Plant.*, **161**, 45-55, doi: 10.1111/pp.12560.
  45. Tikhonov, A. N. (2014) The cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways, *Plant Physiol. Biochem.*, **81**, 163-183, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.12.011.
  46. Kramer, D. M., Crofts, A. R. (1994) Re-examination of the properties and function of the b cytochromes of the thylakoid cytochrome *bf* complex, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1184**, 193-201, doi: 10.1016/0005-2728(94)90223-2.
  47. Sang, M., Qin, X. C., Wang, W. D., Xie, J., Chen, X. B., Wang, K. B., Zhang, J. P., Li, L. B., Kuang, T. Y. (2011) High-light-induced superoxide anion radical formation in cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex from spinach as detected by EPR spectroscopy, *Photosynthetica*, **49**, 48-54, doi: 10.1007/s11099-011-0008-0.
  48. Šnyrychová, I., Pospíšil, P., and Nauš, J. (2006) Reaction pathways involved in the production of hydroxyl radicals in thylakoid membrane: EPR spin-trapping study, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 472-476, doi: 10.1039/B514394B.
  49. Козулева М. А., Найдов И. А., Мубаракшина М. М., Иванов Б. Н. (2007) Участие ферредоксина в восстановлении кислорода в фотосинтетической электрон-транспортной цепи, *Биофизика*, **52**, 650-655.
  50. Badger, M. R. (1985) Photosynthetic oxygen exchange, *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **36**, 27-53, doi: 10.1146/annurev.pp.36.060185.000331.
  51. Allen, J. F. (1975) Oxygen reduction and optimum production of ATP in photosynthesis, *Nature*, **256**, 599-600, doi: 10.1038/256599a0.
  52. Furbank, R. T., and Badger, M. R. (1983) Oxygen exchange associated with electron transport and photophosphorylation in spinach thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **723**, 400-409, doi: 10.1016/0005-2728(83)90047-6.
  53. Kozuleva, M. A., and Ivanov, B. N. (2010) Evaluation of the participation of ferredoxin in oxygen reduction in the photosynthetic electron transport chain of isolated pea thylakoids, *Photosynth. Res.*, **105**, 51-61, doi: 10.1007/s11120-010-9565-5.
  54. Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **50**, 601-639, doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.601.
  55. Asada, K., and Nakano, Y. (1978) Affinity for oxygen in photoreduction of molecular oxygen and scavenging of hydrogen peroxide in spinach chloroplasts, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 917-920, doi: 10.1111/j.1751-1097.1978.tb07040.x.
  56. Petrova, A., Mamedov, M., Ivanov, B., Semenov, A., and Kozuleva, M. (2018) Effect of artificial redox mediators on the photoinduced oxygen reduction by photosystem I complexes, *Photosynth. Res.*, **137**, 421-429, doi: 10.1007/s11120-018-0514-z.
  57. Robinson, J. M. (1988) Does O<sub>2</sub> photoreduction occur within chloroplasts *in vivo*? *Physiol. Plant.*, **72**, 666-680, doi: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb09181.x.
  58. Miyake, C., Schreiber, U., Hormann, H., Sano, S., and Asada, K. (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes, *Plant Cell Physiol.*, **39**, 821-829, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029440.
  59. Hanke, G. T., Endo, T., Satoh, F., and Hase, T. (2008) Altered photosynthetic electron channelling into cyclic electron flow and nitrite assimilation in a mutant of ferredoxin:NADP(H) reductase, *Plant Cell Environ.*, **31**, 1017-1028, doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01814.x.
  60. Kramer, M., Rodriguez-Heredia, M., Saccon, F., Mosebach, L., Twachtmann, M., Krieger-Liszkay, A., Duffy, C., Knell, R. J., Finazzi, G., and Hanke, G. T. (2021) Regulation of photosynthetic electron flow on dark to light transition by ferredoxin:NADP(H) oxidoreductase interactions, *ELife*, **10**, e56088, doi: 10.7554/eLife.56088.
  61. Buchert, F., Mosebach, L., Gäbelein, P., and Hippler, M. (2020) PGR5 is required for efficient Q cycle in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex during cyclic electron flow, *Biochem. J.*, **477**, 1631-1650, doi: 10.1042/BCJ20190914.
  62. Malone, L. A., Proctor, M. S., Hitchcock, A., Hunter, C. N., and Johnson, M. P. (2021) Cytochrome *b<sub>6</sub>f* – orchestrator of photosynthetic electron transfer, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1862**, 148380, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148380.
  63. Kozuleva, M. (2022) Recent advances in the understanding of superoxide anion radical formation in the

- photosynthetic electron transport chain, *Acta Physiol. Plant.*, **44**, 92, doi: 10.1007/s11738-022-03428-0.
64. Hiyama, T., and Ke, B. (1971) A new photosynthetic pigment, "P430": its possible role as the primary electron acceptor of photosystem I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1010-1013, doi: 10.1073/pnas.68.5.1010.
  65. Козулева М. А., Ветошкина Д. В., Петрова А. А., Борисова М. М., Иванов Б. Н. (2014) Исследование восстановления кислорода в фотосистеме I высших растений с применением доноров электронов для этой фотосистемы в целых тилакоидах, *Бiol. Мембр.*, **31**, 427-434, doi: 10.7868/S0233475514060024.
  66. Khorobrykh, S., and Tyystjärvi, E. (2018) Plastoquinol generates and scavenges reactive oxygen species in organic solvent: potential relevance for thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 1119-1131, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.07.003.
  67. Takahashi, M., and Asada, K. (1982) Dependence of oxygen affinity for Mehler reaction on photochemical activity of chloroplast thylakoids, *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1457-1461, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076495.
  68. Kruk, J., Jemioła-Rzemińska, M., Burda, K., Schmid, G. H., and Strzałka, K. (2003) Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenyllipids in thylakoid membranes, *Biochemistry*, **42**, 8501-8505, doi: 10.1021/bi034036q.
  69. Kozuleva, M. A., Petrova, A. A., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., and Ivanov, B. N. (2014) O<sub>2</sub> reduction by photosystem I involves phyloquinone under steady-state illumination, *FEBS Lett.*, **588**, 4364-4368, doi: 10.1016/j.febslet.2014.10.003.
  70. Semenov, A. Y., Vassiliev, I. R., van der Est, A., Mamedov, M. D., Zybailov, B., Shen, G., Stehlik, D., Diner, B. A., Chitnis, P. R., and Golbeck, J. H. (2000) Recruitment of a foreign quinone into the A<sub>1</sub> site of Photosystem I: altered kinetics of electron transfer in phyloquinone biosynthetic pathway mutants studied by time-resolved optical, EPR, and electrometric techniques, *J. Biol. Chem.*, **275**, 23429-23438, doi: 10.1074/jbc.M000508200.
  71. Santabarbara, S., Bullock, B., Rappaport, F., and Redding, K. E. (2015) Controlling electron transfer between the two cofactor chains of photosystem I by the redox state of one of their components, *Biophys. J.*, **108**, 1537-1547, doi: 10.1016/j.bpj.2015.01.009.
  72. Kale, R., Sallans, L., Frankel, L. K., and Bricker, T. M. (2020) Natively oxidized amino acid residues in the spinach PS I-LHC I supercomplex, *Photosynth. Res.*, **143**, 263-273, doi: 10.1007/s11120-019-00698-7.
  73. Milanovsky, G. E., Petrova, A. A., Cherepanov, D. A., and Semenov, A. Yu. (2017) Kinetic modeling of electron transfer reactions in photosystem I complexes of various structures with substituted quinone acceptors, *Photosynth. Res.*, **133**, 185-199, doi: 10.1007/s11120-017-0366-y.
  74. Ivanov, B. (2000) The competition between methyl viologen and monodehydroascorbate radical as electron acceptors in spinach thylakoids and intact chloroplasts, *Free Radic. Res.*, **33**, 217-227, doi: 10.1080/10715760000301391.
  75. Bukhov, N. G., Govindachary, S., Egorova, E. A., Joly, D., and Carpentier, R. (2003) N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine initiates the appearance of a well-resolved I peak in the kinetics of chlorophyll fluorescence rise in isolated thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1607**, 91-96, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.09.002.
  76. Trubitsin, B. V., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., and Tikhonov, A. N. (2014) Interaction of ascorbate with photosystem I, *Photosynth. Res.*, **122**, 215-231, doi: 10.1007/s11120-014-0023-7.
  77. Michelet, L., and Krieger-Liszkay, A. (2012) Reactive oxygen intermediates produced by photosynthetic electron transport are enhanced in short-day grown plants, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1817**, 1306-1313, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.11.014.
  78. Krieger-Liszkay, A., Shimakawa, G., and Sétif, P. (2020) Role of the two Psae isoforms on O<sub>2</sub> reduction at photosystem I in *Arabidopsis thaliana*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148089, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.148089.
  79. Marco, P., Elman, T., and Yacoby, I. (2019) Binding of ferredoxin NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR) to plant photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 689-698, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.07.007.
  80. Andersen, B., Scheller, H. V., and Möller, B. L. (1992) The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase, *FEBS Lett.*, **311**, 169-173, doi: 10.1016/0014-5793(92)81391-X.
  81. Benz, J. P., Stengel, A., Lintala, M., Lee, Y.-H., Weber, A., Philippar, K., Gügel, I. L., Kaieda, S., Ikegami, T., Mulo, P., Soll, J., and Bölter, B. (2009) *Arabidopsis* Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise, *Plant Cell*, **21**, 3965-3983, doi: 10.1105/tpc.109.069815.
  82. Jurić, S., Hazler-Pilepić, K., Tomašić, A., Lepeduš, H., Jeličić, B., Puthiyaveetil, S., Bionda, T., Vojta, L., Allen, J. F., Schleiff, E., and Fulgosi, H. (2009) Tethering of ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL, *Plant J.*, **60**, 783-794, doi: 10.1111/j.1365-3113.2009.03999.x.
  83. Jagannathan, B., Shen, G., and Golbeck, J. H. (2012) The evolution of type I reaction centers: the response to oxygenic photosynthesis, in *Functional Genomics and Evolution of Photosynthetic Systems*, Springer, Dordrecht, pp. 285-316, doi: 10.1007/978-94-007-1533-2\_12.
  84. Rutherford, A. W., Osyczka, A., and Rappaport, F. (2012) Back-reactions, short-circuits, leaks and other energy wasteful reactions in biological electron



- transfer: Redox tuning to survive life in O<sub>2</sub>, *FEBS Lett.*, **586**, 603–616, doi: 10.1016/j.febslet.2011.12.039.
85. Pierella Karlusich, J. J., and Carrillo, N. (2017) Evolution of the acceptor side of photosystem I: ferredoxin, flavodoxin, and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase, *Photosynth. Res.*, **134**, 235–250, doi: 10.1007/s11120-017-0338-2.
  86. Orf, G. S., Gisriel, C., and Redding, K. E. (2018) Evolution of photosynthetic reaction centers: insights from the structure of the heliobacterial reaction center, *Photosynth. Res.*, **138**, 11–37, doi: 10.1007/s11120-018-0503-2.
  87. Hanke, G., and Mulo, P. (2013) Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism, *Plant Cell Environ.*, **36**, 1071–1084, doi: 10.1111/pce.12046.
  88. Fischer, N., Sétif, P., and Rochaix, J.-D. (1997) Targeted mutations in the *psaC* gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: preferential reduction of FB at low temperature is not accompanied by altered electron flow from photosystem I to ferredoxin, *Biochemistry*, **36**, 93–102, doi: 10.1021/bi962244v.
  89. Shinkarev, V. P., Vassiliev, I. R., and Golbeck, J. H. (2000) A kinetic assessment of the sequence of electron transfer from F(X) to F(A) and further to F(B) in photosystem I: the value of the equilibrium constant between F(X) and F(A), *Biophys. J.*, **78**, 363–372, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76599-4.
  90. Ptushenko, V. V., Cherepanov, D. A., Krishtalik, L. I., and Semenov, A. Y. (2008) Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I, *Photosynth. Res.*, **97**, 55–74, doi: 10.1007/s11120-008-9309-y.
  91. Schoepp-Cothenet, B., van Lis, R., Atteia, A., Baymann, F., Capowicz, L., Ducluzeau, A.-L., Duval, S., Brink, F., Russell, M. J., and Nitschke, W. (2013) On the universal core of bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1827**, 79–93, doi: 10.1016/j.bbap.2012.09.005.
  92. Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins, *J. Biol. Chem.*, **269**, 22459–22462, doi: 10.1016/S0021-9258(17)31664-2.
  93. Ceccarelli, E. A., Arakaki, A. K., Cortez, N., and Carrillo, N. (2004) Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1698**, 155–165, doi: 10.1016/j.bbap.2003.12.005.
  94. Carrillo, N., and Ceccarelli, E. A. (2003) Open questions in ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase catalytic mechanism, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1900–1915, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03566.x.
  95. Batie, C. J., and Kamin, H. (1984) Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase. Equilibria in binary and ternary complexes with NADP<sup>+</sup> and ferredoxin, *J. Biol. Chem.*, **259**, 8832–8839, doi: 10.1016/S0021-9258(17)47229-2.
  96. Mulo, P., and Medina, M. (2017) Interaction and electron transfer between ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase and its partners: structural, functional, and physiological implications, *Photosynth. Res.*, **134**, 265–280, doi: 10.1007/s11120-017-0372-0.
  97. Drachev, L. A., Kaurov, B. S., Mamedov, M. D., Mulikjanian, A. Y., Semenov, A. Yu, Shinkarev, V. P., Skulachev, V. P., and Verkgovsky, M. I. (1989) Flash-induced electrogenic events in the photosynthetic reaction center and *bc<sub>1</sub>* complexes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 189–197, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80421-9.
  98. De Vries, S., Berden, J. A., and Slater, E. C. (1980) Properties of a semiquinone anion located in the QH<sub>2</sub>:cytochrome *c* oxidoreductase segment of the mitochondrial respiratory chain, *FEBS Lett.*, **122**, 143–148, doi: 10.1016/0014-5793(80)80422-4.
  99. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.-L., and Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex, *Nature*, **426**, 413–418, doi: 10.1038/nature02155.
  100. Vilyanen, D., Naydov, I., Ivanov, B., Borisova-Mubarakshina, M., and Kozuleva, M. (2022) Inhibition of plastoquinol oxidation at the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex by dinitrophenyl ether of iodonitrothymol (DNP-INT) depends on irradiance and H<sup>+</sup> uptake by thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1863**, 148506, doi: 10.1016/j.bbap.2021.148506.
  101. Schoepp-Cothenet, B., Lieutaud, C., Baymann, F., Verméglio, A., Friedrich, T., Kramer, D. M., and Nitschke, W. (2009) Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8549–8554, doi: 10.1073/pnas.0813173106.
  102. Bergdoll, L., ten Brink, F., Nitschke, W., Picot, D., and Baymann, F. (2016) From low- to high-potential bioenergetic chains: thermodynamic constraints of Q-cycle function, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 1569–1579, doi: 10.1016/j.bbap.2016.06.006.
  103. Alric, J., Pierre, Y., Picot, D., Lavergne, J., and Rappaport, F. (2005) Spectral and redox characterization of the heme *ci* of the cytochrome *bf* complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15860–15865, doi: 10.1073/pnas.0508102102.
  104. Gisriel, C., Sarrou, I., Ferlez, B., Golbeck, J. H., Redding, K. E., and Fromme, R. (2017) Structure of a symmetric photosynthetic reaction center-photosystem, *Science*, **357**, 1021–1025, doi: 10.1126/science.aan5611.
  105. He, Z., Ferlez, B., Kurashov, V., Tank, M., Golbeck, J. H., and Bryant, D. A. (2019) Reaction centers of the thermophilic microaerophile, *Chloracidobacterium thermophilum* (Acidobacteria) I: biochemical and biophysical characterization, *Photosynth. Res.*, **142**, 87–103, doi: 10.1007/s11120-019-00650-9.
  106. Su, X., Ma, J., Pan, X., Zhao, X., Chang, W., Liu, Z., Zhang, X., and Li, M. (2019) Antenna arrangement and energy transfer pathways of a green algal photosystem-I-LHCI supercomplex, *Nat. Plants*, **5**, 273–281, doi: 10.1038/s41477-019-0380-5.



107. Kashey, T. S., Luu, D. D., Cowgill, J. C., Baker, P. L., and Redding, K. E. (2018) Light-driven quinone reduction in heliobacterial membranes, *Photosynth. Res.*, **138**, 1-9, doi: 10.1007/s11120-018-0496-x.
108. McConnell, M. D., Cowgill, J. B., Baker, P. L., Rapaport, F., and Redding, K. E. (2011) Double reduction of plastoquinone to plastoquinol in photosystem I, *Biochemistry*, **50**, 11034-11046, doi: 10.1021/bi201131r.
109. Guergova-Kuras, M., Boudreaux, B., Joliot, A., Joliot, P., and Redding, K. (2001) Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4437-4442, doi: 10.1073/pnas.081078898.
110. Ksas, B., Alric, J., Caffarri, S., and Havaux, M. (2022) Plastoquinone homeostasis in plant acclimation to light intensity, *Photosynth. Res.*, **152**, 43-54, doi: 10.1007/s11120-021-00889-1.
111. Suslichenko, I. S., and Tikhonov, A. N. (2019) Photo-reducible plastoquinone pools in chloroplasts of *Tradescantia* plants acclimated to high and low light, *FEBS Lett.*, **593**, 788-798, doi: 10.1002/1873-3468.13366.

## SUPEROXIDE ANION RADICAL GENERATION IN PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSPORT CHAIN

### Review

M. A. Kozuleva\* and B. N. Ivanov

*Institute of Basic Biological Problems,  
Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences,  
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: kozuleva@gmail.com*

The review analyzes the data available in the literature on the rates, characteristics and mechanisms of oxygen reduction to a superoxide anion radical at the sites of the photosynthetic electron transport chain where this reduction can occur. The existing assumptions about the role of the components of these sites in this process are critically examined, with use of thermodynamic approaches and the results of recent studies. The process of O<sub>2</sub> reduction at the acceptor side of PSI, which is considered the main place of this process in the photosynthetic chain, is described in detail. The evolution of the photosynthetic apparatus in the context of controlling the leakage of electrons to O<sub>2</sub> is considered. The reasons limiting the application of the results obtained with isolated segments of the photosynthetic chain to estimate the rates of O<sub>2</sub> reduction at the corresponding sites in the intact thylakoid membrane are discussed.

**Keywords:** photosynthesis, photosynthetic electron transport chain, oxygen reduction, superoxide radical

## АГОНИСТ КОНСТИТУТИВНОГО АНДРОСТАНОВОГО РЕЦЕПТОРА ИНИЦИИРУЕТ МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ, НЕОБХОДИМУЮ ДЛЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ

© 2023 М.Э. Мазин<sup>1,2</sup>, А.М. Перевалова<sup>1</sup>, А.А. Ярушкин<sup>2</sup>, Ю.А. Пустыльняк<sup>1</sup>,  
А.Д. Рогачев<sup>1</sup>, Е.А. Прокопьева<sup>1,2</sup>, Л.Ф. Гуляева<sup>1,2</sup>, В.О. Пустыльняк<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: [pustylnyak@post.nsu.ru](mailto:pustylnyak@post.nsu.ru)

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,  
630117 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 10.04.2023

После доработки 22.05.2023

Принята к публикации 24.05.2023

Активация конститутивного андростанового рецептора (CAR, NR1H3) химическими соединениями вызывает гиперплазию печени у грызунов. Чаще всего для изучения химически индуцированной гиперплазии печени и пролиферации гепатоцитов *in vivo* используется 1,4-бис[2-(3,5-дихлорпиридилокси)] бензол (ТСРОВОР), агонист мышинового CAR. ТСРОВОР является мощным химическим митогеном, который вызывает гиперплазию печени мышей. В последние годы накоплено много данных о транскрипционных изменениях, характеризующих ТСРОВОР-индуцированную пролиферацию гепатоцитов. Однако данных о метаболических потребностях гепатоцитов, делящихся при воздействии ксенобиотика, немного. В настоящем исследовании мы использовали технологию высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии в сочетании со статистическим анализом для описания изменения профиля метаболитов малых биомолекул, чтобы выявить ключевые метаболические изменения в печени самцов мышей после введения ТСРОВОР. Анализ метаболитов в печени мышей позволил обнаружить биохимические процессы, активация которых осуществляется при воздействии химического митогена ТСРОВОР. Так, сравнение метаболомных профилей показало, что воздействие ТСРОВОР приводит к изменению биохимических процессов, которые имеют отношение к метаболизму нуклеотидов, аминокислот и энергетических субстратов. Наши результаты позволяют сделать вывод о том, что агонист CAR инициирует внутриклеточную программу, которая способствует глобальной скоординированной метаболической активности, необходимой для пролиферации гепатоцитов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** конститутивный андростановый рецептор, ТСРОВОР, печень, гепатоцит, метаболомика.

**DOI:** 10.31857/S032097252308002X, **EDN:** IHUBDC

### ВВЕДЕНИЕ

Конститутивный андростановый рецептор (CAR, NR1H3) является членом суперсемейства ядерных рецепторов. Первоначально CAR был охарактеризован как ксеносенсор, который в ответ на воздействие ксенобиотиков индуцирует их метаболизм и элиминацию [1]. Маркерными генами-мишенями для CAR являются гены, кодирующие цитохром P450 подсемейства 2B (*CYP2B*). Впоследствии было показано, что CAR обладает гораздо более

широким набором функций в гепатоцитах [2]. Так, например, активация CAR значительно усиливает пролиферацию гепатоцитов с последующей гиперплазией печени мышей [3]. Более того, показано, что активация CAR химическими соединениями вызывает не только гиперплазию печени у грызунов, но и может значительно улучшить регенерацию печени грызунов после экстремальных резекций (более 80% паренхимы), тем самым предотвращая возникновение печеночной недостаточности из-за дефицита ткани органа [4].

Принятые сокращения: CAR – конститутивный андростановый рецептор; *CYP2B* – ген, кодирующий цитохром P450 подсемейства 2B; ТСРОВОР – 1,4-бис[2-(3,5-дихлорпиридилокси)] бензол.

\* Адресат для корреспонденции.

Поэтому расширение научных данных, описывающих молекулярные и биохимические процессы, сопряженные с активацией пролиферации гепатоцитов при участии CAR, может позволить сделать выводы о возможности клинического использования агонистов этого рецептора для профилактики печеночной недостаточности при резекции или трансплантации органа.

Большинство исследований *in vivo*, посвященных CAR-опосредованной пролиферации гепатоцитов, были выполнены с использованием 1,4-бис[2-(3,5-дихлорпиридилокси)] бензола (ТСРОВОР), агониста мышинного CAR. ТСРОВОР является мощным химическим митогеном у мышей, который вызывает быструю гиперплазию печени [3]. В последние годы накоплено много данных о транскрипционных изменениях, характеризующих ТСРОВОР-индуцированную пролиферацию гепатоцитов [5, 6]. Однако данных о метаболических изменениях, происходящих в гепатоцитах, делящихся при воздействии ксенобиотиков, немного. Печень является одним из наиболее метаболически активных органов в организме и играет важную роль в регулировании различных метаболических процессов. Метаболическое ремоделирование клеток необходимо для клеточного деления, и гепатоциты оснащены гибким метаболическим механизмом, способным быстро адаптироваться к изменениям во время пролиферации [7]. Ранее уже было показано, что воздействие ТСРОВОР модулирует метаболизм глюкозы и липидов в печени грызунов [6]. Однако глобальные эффекты воздействия ТСРОВОР на профиль низкомолекулярных метаболитов в печени охарактеризованы не были.

Определение путей метаболической адаптации, которые сопряжены с пролиферацией гепатоцитов после воздействия агониста CAR, является основной целью настоящего исследования. Технология высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии (МС) использовалась для определения профиля малых биомолекул (сахаров, аминокислот и нуклеотидов) для выявления ключевых метаболических изменений в печени мышей в ответ на введение химического митогена ТСРОВОР.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Животные, использованные в исследовании.

Самцы мышей (C57BL, масса 25–30 г) были предоставлены Научно-исследовательским институтом нейронаук и медицины (Новоси-

бирск, Россия). Животные прошли пятидневный период акклиматизации со свободным доступом к пище и воде. Животным однократно внутривенно вводили ТСРОВОР (3 мг/кг массы тела), растворенный в пищевом рафинированном подсолнечном масле. Контрольные животные получали равный объем (100 мкл) подсолнечного масла. Мышей декапитировали через 72 ч после введения ТСРОВОР ( $n = 12$ ) или подсолнечного масла ( $n = 12$ ). При заборе органов осуществляли взвешивание печени, и с учетом массы животного вычисляли индекс ее относительной массы («масса печени/масса тела»). Значение индекса относительной массы печени одного из контрольных животных принималось за 1.

**Гистологическое исследование тканей печени.** Образцы печени фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, затем обезжизивали по стандартной методике [8] и заливали в парафин. Парафиновые срезы (4–5 мкм) получали с помощью ротационного микротомы НМ 340Е («CarlZeiss», Германия). Срезы, полученные из ткани печени мышей, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E). Исследование гистологических препаратов проводили на микроскопе Axio-ImagerA1 («CarlZeiss»), используя программное обеспечение AxioVision (rel. 4.12) («CarlZeiss»).

**Определение маркера пролиферации.** Маркер пролиферации Ki67 в образцах печени определяли с использованием иммуногистохимического метода и кроличьего поликлонального антитела против Ki67 («Abcam», Великобритания). Парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм подвергали депарафинизации и регидратации по стандартной методике [9]. Срезы прогревали на водяной бане в 10 мМ цитратном буфере (pH 6,0) в течение 20 мин для демаскировки антигенов. Затем, после однократной промывки в дистиллированной воде и 10 мМ фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), блокировали эндогенную пероксидазу в течение 5 мин в 3%-ной охлажденной перекиси водорода. Время экспозиции с первичными антителами против Ki67 составляло 60 мин при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали со стрептавидин-пероксидазным комплексом, в качестве субстрата применяли диаминобензидин. Дополнительно ядра окрашивали гематоксилином.

**Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР в режиме реального времени.** Выделение суммарной РНК, обратную транскрипцию РНК и ПЦР в режиме реального времени для определения уровней мРНК проводили согласно ранее опубликованному протоколу [10]. Выделение

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использующихся при ПЦР в режиме реального времени для исследования относительного уровня мРНК

| Ген             | Прямой праймер (5'→3') | Обратный праймер (5'→3') |
|-----------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Cyp2b10</i>  | CCCAGTGTTCACGAGACTT    | GGTGCCGACAAAGAAGAGAG     |
| <i>Cyclind1</i> | TGAAGGAGACCATTCCCTTG   | CCACTTGAGCTTGTTACCA      |
| <i>cMyc</i>     | ACGAGCACAAGCTCACCTCT   | TCCAGCTCCTCCTCGAGTTA     |
| <i>E2f1</i>     | TCTGTACCACACAGCTGCAA   | GCACAGGAAAACATCAATGG     |
| <i>Foxm1</i>    | TCCAAGGCAAAGACAGGAGA   | GCTCCTCAACCTTAACCCGA     |
| <i>Mrpl46</i>   | GGGAGCAGGCATTCCTACAG   | GGTCCGGTCATTTTTTTTGTCA   |

суммарной РНК из образцов печени мышей проводили с использованием реагента TRIzol («Invitrogen», США), согласно рекомендациям производителя. Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора RT-M-MuLV-RN kit («Биолабмикс», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов проводили ПЦР в режиме реального времени с использованием BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2×) («Биолабмикс») на амплификаторе CFX96™ («Bio-Rad Laboratories», США). Для ПЦР использовали специфические олигонуклеотиды (табл. 1). Подбор специфичных праймеров осуществляли с использованием онлайн-сервиса Primer-BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP\\_TARGET=on](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP_TARGET=on)). Оптимальная концентрация всех пар праймеров в реакционной смеси составила 300 нМ. ПЦР проводили в следующих условиях: предварительный прогрев при 95 °С – 3 мин; после этого следовали 40 основных циклов: денатурация при 95 °С – 15 с, отжиг при 59 °С – 20 с, элонгация при 72 °С – 20 с, сбор данных по флуоресценции при 80 °С – 10 с. Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления. Уровни экспрессии мРНК рассчитывали на основе эффективности ПЦР и St. Нормирование проводили по гену *Mrpl46*. Уровень экспрессии гена в печени одного из контрольных животных принимался за 1.

**Подготовка проб для метаболомного исследования.** Все образцы печени обрабатывали одновременно в соответствии с протоколом, описанным ранее Yuan et al. [11]. Образцы печени (20–30 мг) гомогенизировали в 500 мкл 80%-ного (v/v) охлажденного метанола для ВЭЖХ и инкубировали в течение ночи при –80 °С для осаждения белка. Затем образцы центрифугировали при 4 °С и 17 000 g в течение

10 мин. Супернатант переносили в новую полипропиленовую пробирку и сушили в центрифуге-концентраторе SpeedVac («Thermo Fisher Scientific», США). Полученный остаток разводили в 100 мкл реконституционного раствора вода/метанол (80/20) и подвергали метаболомному анализу с использованием ВЭЖХ-МС/МС.

**Анализ ВЭЖХ-МС/МС.** Хроматографическое разделение и анализ метаболитов проводили по ранее опубликованному протоколу [12]. Пробы анализировали на хроматографе Shimadzu LC-20AD Prominence («Shimadzu Corporation», Япония), оснащенном автодозатором SIL-20AC («Shimadzu Corporation»). Хроматографическое разделение проводили на колонке Prontosil 120-5-Amino (2,1 × 75 мм) («Эконова», Россия). Сбор данных проводили на масс-спектрометре API 6500 QTRAP («AB SCIEX», США) с использованием программного обеспечения Analyst 1.6.2 («AB SCIEX»). Масс-спектрометрическую детекцию проводили в режиме MRM в положительной и отрицательной ионизации. Полученные хроматограммы обрабатывались в программе MultiQuant™ 2.1 Software («AB SCIEX») с экспортированием данных в таблицы Microsoft Excel. Последующий мультивариантный анализ и анализ биохимических путей проводились с использованием онлайн-сервиса MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>). Анализ биохимических путей был проведен на основе данных о метаболитах, нанесенных на карту в соответствии с идентификаторами Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG).

**Статистическая обработка результатов.** Статистический анализ проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента. Расчеты производились с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5.0 («GraphPad Software Inc.», США). Значение *p* < 0,05 считалось статистически значимым.



## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первую очередь была подтверждена ТСРОВОР-опосредованная активация CAR в печени мышей путем изучения экспрессии гена *Cyp2b10*, ключевого биомаркера для измерения активации CAR. Как и ожидалось, экспрессия гена *Cyp2b10* в печени мышей увеличилась после воздействия ТСРОВОР (рис. 1, а).

Далее были проведены эксперименты по оценке гиперплазии печени при воздействии химического митогена. Увеличение экспрессии гена *Cyp2b10* после воздействия ТСРОВОР сопровождалось достоверным увеличением индекса относительной массы печени, который определяли как масса печени по отношению к массе тела животного (рис. 1, б). Гистологический анализ печени мышей и иммуноокрашивание срезов печени с использованием антител против Ki67 показали, что воздействие ТСРОВОР усиливало митотические процессы в гепатоцитах (рис. 1, в). Так, на срезах, полученных от ТСРОВОР-индуцированных мышей, наблюдались фигуры митоза, особенно среди гепатоцитов, расположенных в центре пече-

ночной дольки вокруг собирательных вен. Образцы из контрольной группы животных были без явных Ki67-положительных ядер, тогда как в образцах, полученных от ТСРОВОР-индуцированных мышей, выявлялось до 40% Ki67-положительных ядер гепатоцитов от общего числа гепатоцитов в 5 случайно выбранных полях. Кроме того, воздействие ТСРОВОР достоверно увеличивало экспрессию генов, кодирующих регуляторы клеточного цикла, *Cyclind1*, *cMyc*, *E2f1* и *Foxm1*, в печени мышей по сравнению с контрольными животными (рис. 1, г).

С помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа образцов печени были изучены различия в метаболомном профиле контрольных и ТСРОВОР-индуцированных мышей. Мультивариантный анализ полученных результатов методом анализа главных компонент (РСА) продемонстрировал наличие различий в метаболомном профиле печени, вызванных воздействием ТСРОВОР. Проведенный анализ не показал перекрытия контрольной группы и группы, получавшей ТСРОВОР, что указывает на четкую кластеризацию двух групп образцов печени (рис. 2, а).

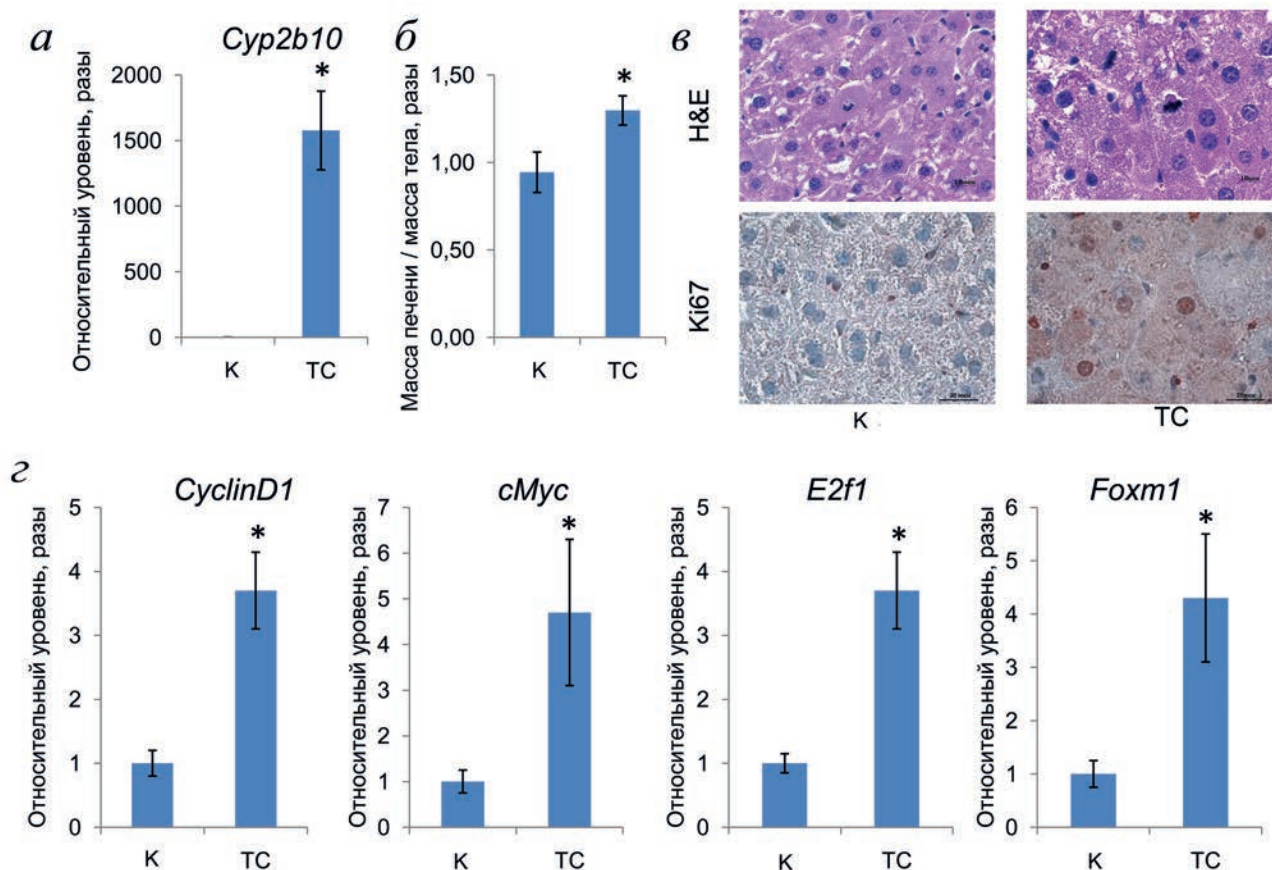
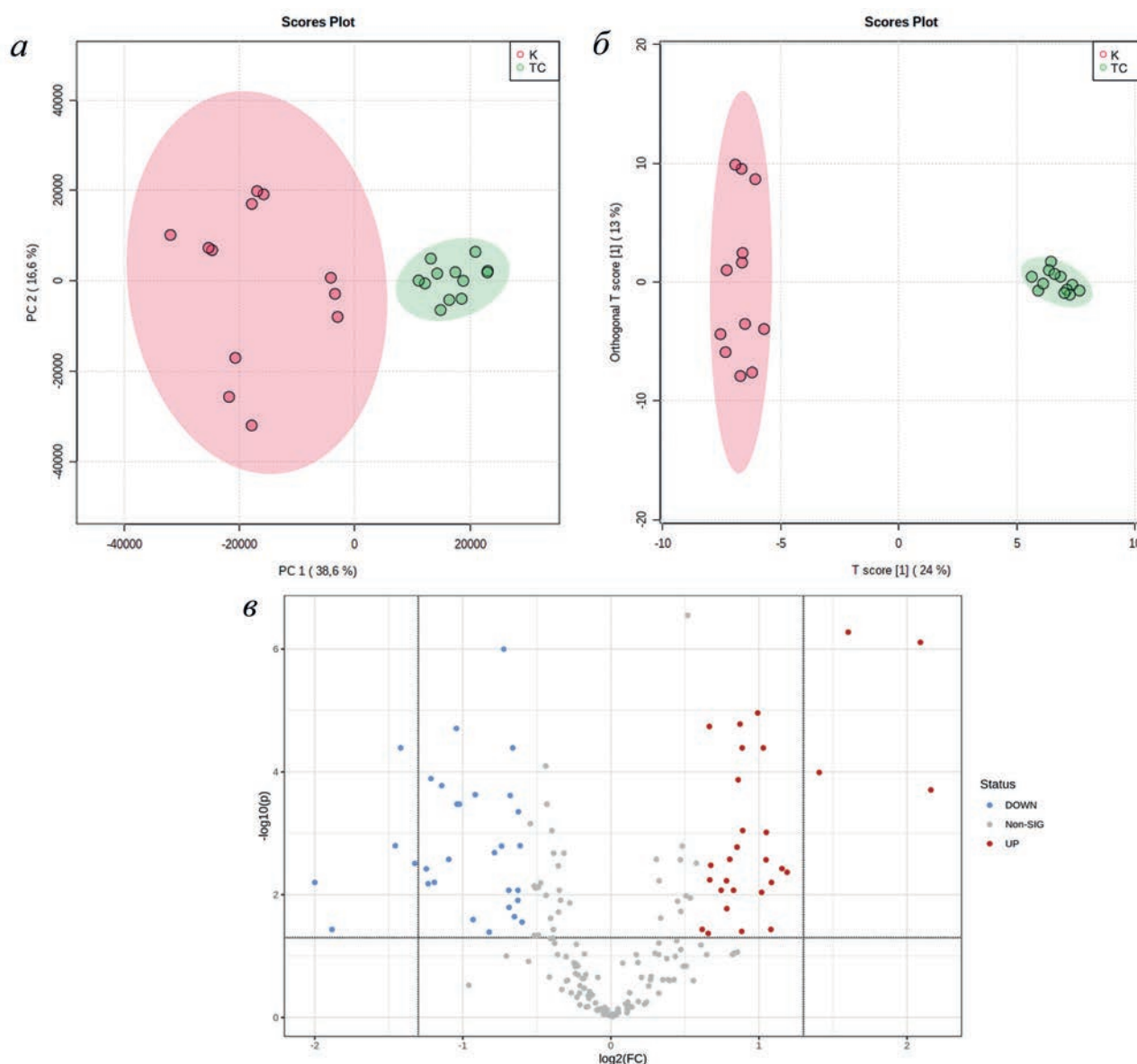


Рис. 1. Влияние ТСРОВОР на мишень CAR — ген *Cyp2b10* (а), размер печени (б), гистопатологию и иммуноокрашивание Ki67 (в) и гены, кодирующие регуляторы клеточного цикла (г). \* Достоверное отличие от контрольных животных ( $p < 0,05$ ). Мышей обрабатывали 1,4-бис [2-(3,5-дихлорпиридилокси)] бензолом (ТС) или только подсолнечным маслом (К)



**Рис. 2.** Изменение метаболомного профиля в печени мышей после воздействия ТСРОВОР (ТС) по сравнению с контрольными животными (К). *а* – Мультивариантный анализ методом анализа главных компонент; *б* – ортогональный дискриминантный анализ методом наименьших квадратов образцов печени на основе всех метаболитов. Каждый символ представляет один образец одной мыши. Образцы одной группы показаны одним цветом. Цветное поле представляет 95%-ный доверительный интервал группы с кружками одного цвета. *в* – Вулканическая диаграмма показывает метаболиты, уровень которых достоверно изменяется при воздействии ТСРОВОР. Метаболиты, уровень которых достоверно снижается, обозначены синим. Метаболиты, уровень которых достоверно повышен, обозначены красным

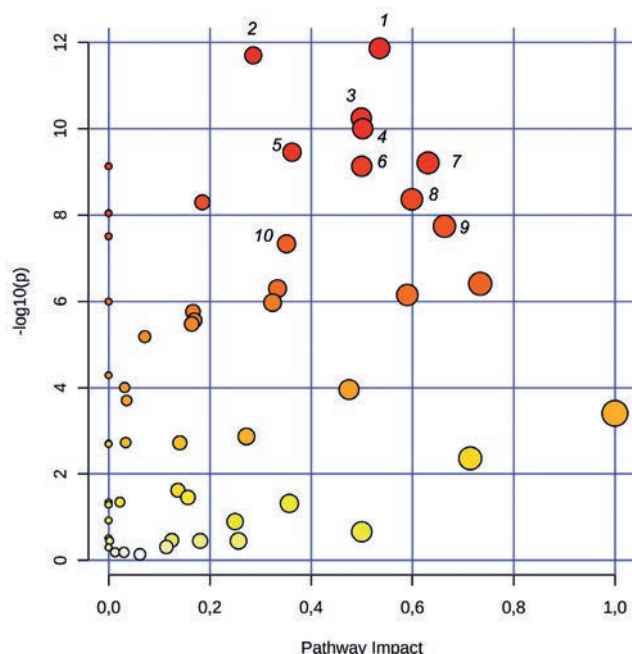
Дополнительно был проведен ортогональный дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (OPLS-DA). Данный анализ позволил лучше выделить метаболические различия между двумя группами образцов печени мышей (рис. 2, *б*). Данные результаты свидетельствуют о том, что контрольные мыши и мыши, получавшие ТСРОВОР, имеют разные метаболомные профили печени. Сравнение уровней метаболитов между группами животных показало, что воздействие ТСРОВОР приводит к достоверному изменению уровней 58 метаболитов в печени мышей, из которых у

30 метаболитов уровень снижался, а у 28 – повышался (рис. 2, *в*; табл. 2).

В заключении был проведен анализ биохимических путей, на которые повлиял агонист мышечного CAR. Результаты анализа продемонстрировали перепрограммирование метаболической сети после воздействия ТСРОВОР. Как показано на рис. 3, ТСРОВОР-индуцированная пролиферация гепатоцитов сопровождается изменениями в метаболизме нуклеотидов (как пиримидиновых, так и пуриновых), метаболизме аминокислот (тирозина, глицина, серина и треонина, глутамина и глутамата,

Таблица 2. Метаболиты, уровень которых достоверно изменяется в печени мышей после воздействия ТСРОВОР

| ТСРОВОР-опосредованное снижение уровня |                | ТСРОВОР-опосредованное увеличение уровня       |                |
|----------------------------------------|----------------|------------------------------------------------|----------------|
| метаболит                              | количество раз | метаболит                                      | количество раз |
| ксантиловая кислота                    | 0,25000        | 2-аминооктановая кислота                       | 1,5766         |
| гиппуровая кислота                     | 0,27108        | никотинамид мононуклеотид                      | 1,5854         |
| глицерофосфохолин                      | 0,36442        | 1-метилгистидин                                | 1,5886         |
| акадезин                               | 0,37370        | N-ацетилорнитин                                | 1,5961         |
| бетаин                                 | 0,39950        | гуанозинмонофосфат                             | 1,6758         |
| лактоза                                | 0,42146        | пантотеновая кислота                           | 1,7183         |
| аргининосукцинат                       | 0,42503        | изобутирилглицин                               | 1,7203         |
| цитруллин                              | 0,43072        | дезоксиинозин                                  | 1,7443         |
| 3-метилгистидин                        | 0,43746        | уридин-5'-дифосфат                             | 1,7756         |
| аскорбиновая кислота                   | 0,45287        | 3-фосфоглицериновая кислота                    | 1,8045         |
| ксантозин                              | 0,46816        | пировиноградная кислота                        | 1,8142         |
| гипоксантин                            | 0,48508        | 2-изопропилмалат                               | 1,8303         |
| инозин                                 | 0,48643        | уреидосукцинат                                 | 1,8442         |
| 1-метилникотинамид                     | 0,49199        | цитидин                                        | 1,8486         |
| оротидиловая кислота                   | 0,52455        | триптофанол                                    | 1,8527         |
| аденозин                               | 0,52988        | глутамат                                       | 1,9878         |
| 3-гидроксиантраниловая кислота         | 0,56541        | D-глицеральдегид-3-фосфат                      | 2,0244         |
| ксантин                                | 0,57976        | фосфоенолпируват                               | 2,0415         |
| гипотаурин                             | 0,59937        | 5-аминоимидазол-4-карбоксамид<br>рибонуклеотид | 2,0675         |
| L-серин                                | 0,60573        | деоксиуридинмонофосфат (dUMP)                  | 2,0697         |
| N-ацетил-L-аланин                      | 0,62012        | спермидин                                      | 2,1151         |
| дофамин                                | 0,62094        | L-кинуренин                                    | 2,1205         |
| метанефрин                             | 0,62424        | уреидопропионат                                | 2,2277         |
| имидазолуксусная кислота               | 0,63156        | аллантииновая кислота                          | 2,2815         |
| 5'-метилтиоаденозин                    | 0,63666        | глутатиондисульфид                             | 2,6520         |
| фосфорилхолин                          | 0,64681        | глюконовая кислота                             | 3,0366         |
| 2-арахидоноилглицерин                  | 0,64719        | дезокситимидинмонофосфат<br>(dTMP)             | 4,2578         |
| гуанин                                 | 0,64855        | D-седогептулозо-7-фосфат                       | 4,4718         |
| O-ацетилсерин                          | 0,65384        |                                                |                |
| цистин                                 | 0,65976        |                                                |                |



**Рис. 3.** Метаболические пути, активность которых изменяется после воздействия ТСРОВОР в печени мышей. Размер (диаметр круга) и цвет (оттенок) каждого круга основан на значимости воздействия ТСРОВОР на метаболический путь. Анализ путей проводился с использованием онлайн-сервиса MetaboAnalyst. 1 – Пиримидиновый обмен; 2 – метаболизм тирозина; 3 – пуриновый обмен; 4 – метаболизм глицина, серина и треонина; 5 – метаболизм пирувата; 6 – метаболизм D-глутамин и D-глутамата; 7 – метаболизм аргинина и пролина; 8 – биосинтез аргинина; 9 – метаболизм цистеина и метионина; 10 – пентозофосфатный путь

аргинина и пролина, цистеина и метионина) и биосинтезу аргинина. Кроме того, показано, что пути метаболизма энергетических субстратов (метаболизм пентозофосфата) участвуют в метаболической адаптации печени мышей при воздействии ТСРОВОР.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хорошо известно, что ТСРОВОР-опосредованная активация CAR вызывает гиперплазию печени мышей [3]. CAR-опосредованная гиперплазия печени связана с изменением экспрессии большого набора генов, кодирующих регуляторы пролиферации гепатоцитов [13]. В настоящем исследовании доза и схема введения ТСРОВОР полностью соответствовали ранее опубликованным данным, в которых впервые было показано, что ТСРОВОР-опосредованная активация CAR приводит к гиперплазии печени мышей [3]. Наши результаты подтвердили, что активация CAR при воздействии ТСРОВОР сопровождается увеличением экспрессии генов-регуляторов кле-

точного цикла (*Cyclind1*, *cMyc*, *E2f1* и *Foxm1*), что коррелировало с увеличением массы печени животных. Известно, что некоторые регуляторы клеточного цикла, такие как Cyclin D1 и E2F1, принимают участие в регуляции экспрессии генов, кодирующих метаболические ферменты, и тем самым контролируют метаболизм [14]. Эти ферменты участвуют в разнообразных биохимических путях синтеза метаболических предшественников для роста клеток.

Пролиферация гепатоцитов требует увеличения внутриклеточной биомассы [7]. Соответственно, производство белков, липидов и нуклеиновых кислот необходимо для успешного деления гепатоцитов. Более того, производство биомассы гепатоцитов должно быть скоординировано с событиями клеточного цикла, чтобы получить две здоровые дочерние клетки. Таким образом, характеристика принципов, лежащих в основе этих путей, может дать важную информацию для понимания роста и пролиферации гепатоцитов. В настоящем исследовании был проведен комплексный метаболомный анализ с использованием ВЭЖХ-МС/МС, который позволил выявить 58 метаболитов, уровень которых изменяется при ТСРОВОР-индуцированной гиперплазии печени у мышей. Анализ путей этих дифференциально затронутых метаболитов в печени мышей продемонстрировал значительное, опосредованное ТСРОВОР, обогащение ряда биохимических процессов. Так, в работе было продемонстрировано, что большинство изменений под действием химического митогена метаболитов вовлечены в пути биосинтеза и метаболизма нуклеотидов и аминокислот. В совокупности эти данные указывают на метаболические предпочтения, лежащие в основе высокой способности к пролиферации гепатоцитов после введения ТСРОВОР.

Глюкоза является основным субстратом для пролиферирующих клеток, обеспечивая клетки как АТФ в качестве источника энергии, так и мономерными блоками для макромолекулярного синтеза [15]. В связи с этим гликолиз считают биохимической платформой, поддерживающей пролиферацию клеток [16]. В настоящем исследовании обнаружено, что ТСРОВОР-индуцированная пролиферация гепатоцитов сопровождается увеличением содержания метаболитов, которые образуются за счет гликолитического разрушения глюкозы, таких как глицеральдегид-3-фосфат, фосфоенолпируват и пировиноградная кислота. Это может свидетельствовать об активации гликолиза при ТСРОВОР-индуцированной пролиферации гепатоцитов мышей.



Накопление гликолитических промежуточных соединений может приводить к их перераспределению в другие биохимические пути, ответвляющиеся от гликолиза. Одним из таких путей является пентозофосфатный путь (PPP), который играет важную роль в биосинтезе нуклеотидов. PPP использует промежуточные продукты гликолиза в реакциях, производящих рибозо-5-фосфат для синтеза нуклеиновых кислот и NADPH для анаболизма [17]. Наши данные показали, что воздействие ТСРОВОР на печень мышей значительно увеличивало уровень седогептулозо-7-фосфата, который связывает гликолиз, пентозофосфатный путь и биосинтез нуклеотидов [18]. Более того, наши результаты показали, что при воздействии ТСРОВОР происходит изменение уровней метаболитов, связанных с метаболизмом пиримидинов (UDP, dUMP, dTMP и цитидин) и пуринов (ксантозин, ксантин, гипоксантин, инозин, GMP и IMP). Эти метаболиты связаны с биосинтезом нуклеотидов. По-видимому, ТСРОВОР-индуцированные пути метаболизма, связанные с синтезом пиримидина и пурина, поддерживают пролиферацию гепатоцитов за счет предоставления нуклеотидов, которые являются необходимыми предшественниками для биосинтеза РНК и ДНК. Ранее было показано, что высокая регенеративная способность органов сочетается с высоким уровнем метаболизма пиримидинов, а пиримидиновые нуклеозиды могут способствовать регенерации различных тканей *in vivo* [19].

Наше исследование показало, что после воздействия ТСРОВОР также наблюдаются изменения в биосинтезе и метаболизме ряда аминокислот в печени мышей. Так, в печени мышей, получавших ТСРОВОР, наблюдалось увеличение метаболитов, участвующих в биосинтезе аргинина. Аргинин является предшественником не только для синтеза белков, но и полиаминов. В этом исследовании воздействие ТСРОВОР повышало уровень двух полиаминов, путресцина и спермидина, в печени мышей. И путресцин, и спермидин являются хорошо известными прорегенеративными метаболитами [20], способными усиливать регенерацию печени после частичной гепатэктомии [21–23].

Аминокислоты также могут выступать в качестве субстратов для разнообразных биохимических путей. Результаты, полученные в этом исследовании, показали снижение гликогенных аминокислот, таких как серин, аланин, метионин и тирозин, при воздействии химического митогена ТСРОВОР. Гликогенные ами-

нокислоты служат субстратами для энергетического метаболизма. По-видимому, наблюдаемое снижение уровня серина, аланина, метионина и тирозина связано с тем, что гликогенные аминокислоты выступают субстратами для биосинтеза углеводов и нуклеотидов.

Метионин также является основным источником метильных групп, превращаясь в универсальный донор метильных групп S-аденозилметионин (SAM). SAM обеспечивает метильную группу для метилирования ДНК и гистонов. После переноса метильной группы SAM превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH). Наши результаты показали опосредованное ТСРОВОР снижение в печени мышей уровня метионина, а также увеличение уровня SAH. Этот факт может указывать на то, что ТСРОВОР может вызывать метилирование ДНК и гистонов, что может способствовать регуляции транскрипции. Предыдущие исследования показали, что активация CAR связана с эпигенетическими изменениями, такими как метилирование ДНК и гистонов, что нарушает регуляцию экспрессии генов в печени [24, 25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее с использованием технологии RNA-seq установлено, что активация CAR под действием ТСРОВОР вызывает изменение экспрессии более чем 2000 генов в печени мышей [26]. В настоящей работе показано, что при воздействии ТСРОВОР наблюдается скоординированный контроль метаболизма и пролиферации гепатоцитов. По всей видимости, активация CAR инициирует внутриклеточную программу, которая способствует глобальной скоординированной метаболической активности, необходимой для пролиферации гепатоцитов. Эти данные могут свидетельствовать о том, что CAR-опосредованные сигнальные каскады образуют сеть сигнальных цепей, ведущих к сложной регуляции пролиферации гепатоцитов не только на транскриптомном, но и на метаболомном уровне. Требуются дальнейшие углубленные исследования для выявления более нисходящих селективных метаболических путей, которые участвуют в метаболическом гомеостазе во время пролиферации гепатоцитов после ТСРОВОР-опосредованной активации CAR. Тем не менее наши метаболомные данные могут дать новое представление о биологических механизмах, которые происходят во время ТСРОВОР-индуцированной пролиферации гепатоцитов у мышей.

**Вклад авторов.** В.О. Пустыльный, Л.Ф. Гуляева — концепция и руководство работой; М.Э. Мазин, А.М. Перевалова, А.А. Ярушкин, Ю.А. Пустыльный, А.Д. Рогачев, Е.А. Прокопьева — проведение экспериментов и статистическая обработка результатов; М.Э. Мазин, А.А. Ярушкин, В.О. Пустыльный, Л.Ф. Гуляева — обсуждение результатов исследования; М.Э. Мазин — написание текста; В.О. Пустыльный — редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00021).

**Благодарности.** Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием

Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

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

**Соблюдение этических норм.** Содержание животных и все эксперименты с животными проводились в соответствии с позицией по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке Российского научного фонда, а также в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. и одобрены Комиссией по биоэтике Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 23-17).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan, J., and Xie, W. (2016) A brief history of the discovery of PXR and CAR as xenobiotic receptors, *Acta Pharm. Sin. B*, **6**, 450-452, doi: 10.1016/j.apsb.2016.06.011.
2. Cai, X., Young, G. M., and Xie, W. (2021) The xenobiotic receptors PXR and CAR in liver physiology, an update, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1867**, 166101, doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166101.
3. Blanco-Bose, W. E., Murphy, M. J., Ehninger, A., Offner, S., Dubey, C., Huang, W., Moore, D. D., and Trump, A. (2008) C-Myc and its target FoxM1 are critical downstream effectors of constitutive androstane receptor (CAR) mediated direct liver hyperplasia, *Hepatology*, **48**, 1302-1311, doi: 10.1002/hep.22475.
4. Tschuor, C., Kachaylo, E., Limani, P., Raptis, D. A., Linecker, M., Tian, Y., Herrmann, U., Grabliauskaite, K., Weber, A., Columbano, A., Graf, R., Humar, B., and Clavien, P. A. (2016) Constitutive androstane receptor (Car)-driven regeneration protects liver from failure following tissue loss, *J. Hepatol.*, **65**, 66-74, doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.040.
5. Lodato, N. J., Melia, T., Rampersaud, A., and Waxman, D. J. (2017) Sex-differential responses of tumor promotion-associated genes and dysregulation of novel long noncoding RNAs in constitutive androstane receptor-activated mouse liver, *Toxicol. Sci.*, **159**, 25-41, doi: 10.1093/toxsci/kfx114.
6. Skoda, J., Dohnalova, K., Chalupsky, K., Stahl, A., Templin, M., Maixnerova, J., Micuda, S., Grøntved, L., Braeuning, A., and Pavek, P. (2022) Off-target lipid metabolism disruption by the mouse constitutive androstane receptor ligand TCPOBOP in humanized mice, *Biochem. Pharmacol.*, **197**, 114905, doi: 10.1016/j.bcp.2021.114905.
7. Solhi, R., Lotfinia, M., Gramignoli, R., Najimi, M., and Vosough, M. (2021) Metabolic hallmarks of liver regeneration, *Trends Endocrinol. Metab.*, **32**, 731-745, doi: 10.1016/j.tem.2021.06.002.
8. Cardiff, R. D., Miller, C. H., and Munn, R. J. (2014) Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections, *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2014**, 655-658, doi: 10.1101/pdb.prot073411.
9. Graefe, C., Eichhorn, L., Wurst, P., Kleiner, J., Heine, A., Panetas, I., Abdulla, Z., Hoeft, A., Frede, S., Kurts, C., Endl, E., and Weisheit, C. K. (2019) Optimized Ki-67 staining in murine cells: a tool to determine cell proliferation, *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 4631-4643, doi: 10.1007/s11033-019-04851-2.
10. Mazin, M. E., Yarushkin, A. A., Pustyl'nyak, Y. A., Prokopyeva, E. A., and Pustyl'nyak, V. O. (2022) Promotion of NR1H3-mediated liver growth is accompanied by STAT3 activation, *Mol. Biol. Rep.*, **49**, 4089-4093, doi: 10.1007/s11033-022-07340-1.
11. Yuan, M., Breitkopf, S. B., Yang, X., and Asara, J. M. (2012) A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue, *Nat. Protoc.*, **7**, 872-881, doi: 10.1038/nprot.2012.024.
12. Rogachev, A. D., Alemasov, N. A., Ivanisenko, V. A., Ivanisenko, N. V., Gaisler, E. V., Oleshko, O. S., Cheresiz, S. V., Mishinov, S. V., Stupak, V. V., and Pokrovsky, A. G. (2021) Correlation of metabolic profiles of plasma and cerebrospinal fluid of high-grade glioma patients, *Metabolites*, **11**, 133, doi: 10.3390/metabo11030133.
13. Kazantseva, Y. A., Pustyl'nyak, Y. A., and Pustyl'nyak, V. O. (2016) Role of nuclear constitutive androstane receptor in regulation of hepatocyte proliferation and hepatocarcinogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 338-347, doi: 10.1134/S0006297916040040.

14. Huber, K., Mestres-Arenas, A., Fajas, L., and Leal-Esteban, L. C. (2021) The multifaceted role of cell cycle regulators in the coordination of growth and metabolism, *FEBS J.*, **288**, 3813-3833, doi: 10.1111/febs.15586.
15. Locasale, J. W., and Cantley, L. C. (2011) Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth, *Cell Metab.*, **14**, 443-451, doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.014.
16. Lunt, S. Y., and Vander Heiden, M. G. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 441-464, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
17. Ge, T., Yang, J., Zhou, S., Wang, Y., Li, Y., and Tong, X. (2020) The role of the pentose phosphate pathway in diabetes and cancer, *Front Endocrinol. (Lausanne)*, **11**, 365, doi: 10.3389/fendo.2020.00365.
18. Jin, L., and Zhou, Y. (2019) Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors, *Oncol. Lett.*, **17**, 4213-4221, doi: 10.3892/ol.2019.10112.
19. Liu, Z., Li, W., Geng, L., Sun, L., Wang, Q., Yu, Y., Yan, P., Liang, C., Ren, J., Song, M., Zhao, Q., Lei, J., Cai, Y., Li, J., Yan, K., Wu, Z., Chu, Q., Li, J., Wang, S., Li, C., Han, J. J., Hernandez-Benitez, R., Shyh-Chang, N., Belmonte, J. C. I., Zhang, W., Qu, J., and Liu, G. H. (2022) Cross-species metabolomic analysis identifies uridine as a potent regeneration promoting factor, *Cell Discov.*, **8**, 6, doi: 10.1038/s41421-021-00361-3.
20. Doi, J., Fujimoto, Y., Teratani, T., Kasahara, N., Maeda, M., Tsuruyama, T., Iida, T., Yagi, S., and Uemoto, S. (2019) Bolus administration of polyamines boosts effects on hepatic ischemia-reperfusion injury and regeneration in rats, *Eur. Surg. Res.*, **60**, 63-73, doi: 10.1159/000497434.
21. Mandal, S., Mandal, A., Johansson, H. E., Orjalo, A. V., and Park, M. H. (2013) Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2169-2174, doi: 10.1073/pnas.1219002110.
22. Alhonen, L., Räsänen, T. L., Sinervirta, R., Parkkinen, J. J., Korhonen, V. P., Pietilä, M., and Jänne, J. (2002) Polyamines are required for the initiation of rat liver regeneration, *Biochem. J.*, **362**, 149-153, doi: 10.1042/0264-6021:3620149.
23. Chattopadhyay, M. K., Park, M. H., and Tabor, H. (2008) Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6554-6559, doi: 10.1073/pnas.0710970105.
24. Lempiäinen, H., Müller, A., Brasa, S., Teo, S. S., Roloff, T. C., Morawiec, L., Zamurovic, N., Vicart, A., Funhoff, E., Couttet, P., Schübeler, D., Grenet, O., Marlowe, J., Moggs, J., and Terranova, R. (2011) Phenobarbital mediates an epigenetic switch at the constitutive androstane receptor (CAR) target gene *Cyp2b10* in the liver of B6C3F1 mice, *PLoS One*, **6**, e18216, doi: 10.1371/journal.pone.0018216.
25. Rumpersaud, A., Lodato, N. J., Shin, A., and Waxman, D. J. (2019) Widespread epigenetic changes to the enhancer landscape of mouse liver induced by a specific xenobiotic agonist ligand of the nuclear receptor CAR, *Toxicol. Sci.*, **171**, 315-338, doi: 10.1093/toxsci/kfz148.
26. Cui, J. Y., and Klaassen, C. D. (2016) RNA-Seq reveals common and unique PXR- and CAR-target gene signatures in the mouse liver transcriptome, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 1198-1217, doi: 10.1016/j.bbagr.2016.04.010.

## CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR AGONIST INITIATES METABOLIC ACTIVITY REQUIRED FOR HEPATOCYTE PROLIFERATION

M. E. Mazin<sup>1,2</sup>, A. M. Perevalova<sup>1</sup>, A. A. Yarushkin<sup>2</sup>, Y. A. Pustyl'nyak<sup>1</sup>,  
A. D. Rogachev<sup>1</sup>, E. A. Prokopyeva<sup>1,2</sup>, L. F. Gulyaeva<sup>1,2</sup>, and V. O. Pustyl'nyak<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: pustyl'nyak@post.nsu.ru

<sup>2</sup> Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine,  
630117 Novosibirsk, Russia

Constitutive androstane receptor (CAR, NR1I3) activation by chemical compounds evokes liver hyperplasia in rodent. 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene (TCPOBOP), a mouse CAR agonist, is most commonly used to study chemically induced liver hyperplasia and hepatocyte proliferation *in vivo*. TCPOBOP is potent murine liver chemical mitogen, which induces rapid direct liver hyperplasia independent of liver injury. In recent years, a lot of data has been accumulated on the transcription program that characterizes TCPOBOP-induced hepatocyte proliferation. However, there are scarce data about metabolic requirements of hepatocytes dividing upon treatment with xenobiotics. In present study, we employed liquid chromatography – mass spectrometry technology combined with statistical analysis to develop a metabolite profile of

small biomolecules, to identify key metabolic changes in male mouse liver tissue after TCPOBOP administration. Analysis of biochemical pathways of the differentially affected metabolites in mouse livers demonstrated significant TCPOBOP-mediated enrichment of several processes including those relevant to nucleotide metabolism, amino acid metabolism, and energy substrate metabolism. Our findings provide evidence to support the conclusion that CAR agonist, TCPOBOP, initiates an intracellular program that promotes the global coordinated metabolic activities required for hepatocyte proliferation. Our metabolic data may provide novel insight into the biological mechanisms that occur during TCPOBOP-induced hepatocyte proliferation in mice.

*Keywords:* constitutive androstane receptor, TCPOBOP, liver, hepatocyte, metabolomics



## ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ДОФАМИНОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА (CDNF) В ГИППОКАМПЕ НА ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОМУ ПОВЕДЕНИЮ

© 2023 Я.П. Каминская, Т.В. Ильчибаева, Н.В. Хоцкин, В.С. Науменко, А.С. Цыбко\*

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,  
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: antoncybko@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2023

После доработки 08.06.2023

Принята к публикации 09.06.2023

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF) является перспективным средством для лечения болезни Паркинсона. Однако его роль в регуляции немоторного поведения, в том числе в разного рода психопатологиях, остаётся неясной. В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на поведение мышей линии ASC (Antidepressant Sensitive Cataleptics) с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению. Сверхэкспрессию CDNF в нейронах гиппокампа мышей индуцировали с помощью аденоассоциированного вирусного вектора (AAV). Через 4 недели после стереотаксической инъекции вектора AAV-CDNF в дорсальный гиппокамп оценивалось поведение в условиях домашней клетки, исследовательское, тревожно-подобное и депрессивно-подобное поведение, а также пространственное и ассоциативное обучение. Мы обнаружили значительные улучшения в динамике пространственного обучения в водном лабиринте Морриса у животных со сверхэкспрессией CDNF. В то же время не было обнаружено эффекта CDNF на другие исследованные формы поведения. Поведение опытных животных в условиях домашней клетки не отличалось от такового в контрольной группе, за исключением снижения общего количества съеденной пищи и некоторого увеличения количества эпизодов сна в светлую фазу суток. В данном исследовании также была предпринята попытка определить молекулярную основу упомянутых выше изменений посредством экспрессионного анализа. Нами не было обнаружено значительных изменений в уровне мРНК генов, кодирующих рецепторы основных нейротрансмиттерных систем, вовлечённых в нейропластичность, выживание нейронов, а также ключевых киназ. Однако у животных со сверхэкспрессией CDNF было выявлено повышение уровня мРНК сплайсированной формы Xbp1, что может говорить об активации Ire1 $\alpha$ /Xbp1-пути, традиционно ассоциируемого со стрессом эндоплазматического ретикула (ЭПР). С помощью иммуногистохимического анализа было показано, что CDNF колокализован с маркером ЭПР кальретикулином. Таким образом, обнаруженные нами эффекты CDNF на поведение могут быть опосредованы специфическим молекулярным каскадом, что подчёркивает его отличие от классических нейротрофических факторов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** нейротрофические факторы, дофаминовый нейротрофический фактор мозга CDNF, депрессивно-подобное поведение, обучение, стресс ЭПР, реакция несвёрнутых белков UPR.

**DOI:** 10.31857/S0320972523080031, **EDN:** IHUIUU

### ВВЕДЕНИЕ

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor, CDNF) был открыт относительно недав-

но, в 2007 году, но с тех пор привлёк большое внимание исследователей. Известно, что CDNF значительно отличается от других нейротрофических факторов (НТФ). Так, его гомология с астроцитарным мезэнцефальным

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; НТФ – нейротрофические факторы; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; AAV – аденоассоциированный вирусный вектор; ASC – линия мышей с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению; CDNF – дофаминовый нейротрофический фактор мозга; IRE1 $\alpha$  – эндорибонуклеаза инозитол-требующий фермент 1  $\alpha$ ; MANF – мезэнцефалический астроцитарный нейротрофический фактор; UPR – реакция развёрнутых белков; XBP1 – X-box-связывающий белок.

\* Адресат для корреспонденции.

НТФ (MANF) составляет 59%, а с другими НТФ гомология не прослеживается; CDNF не связывается с общими для остальных НТФ рецепторами, не имеет проформы [1]. Кроме того, для него не были идентифицированы рецепторы на клеточной мембране, что позволило выделить его и MANF в отдельное семейство. Оба этих белка имеют двойственную природу и могут как секретироваться клеткой, так и оказывать протективное действие изнутри, «заякореваясь» в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [2].

Повышенный интерес к CDNF связан в первую очередь с его нейропротекторными свойствами. Принято выделять два механизма, которые их обеспечивают. Первый обусловлен нахождением белка в просвете ЭПР и заключается в модуляции реакции несвёрнутых белков (unfolded protein response, UPR), которая позволяет избежать стресса ЭПР и нейровоспаления. Второй же механизм предполагает высвобождение CDNF и его связывание с неидентифицированным рецептором, активирующим внутриклеточные сигнальные каскады. Рекомбинантный белок CDNF проявил выраженное нейропротекторное действие на дофаминергические нейроны среднего мозга в двух фармакологических моделях болезни Паркинсона (БП): на получавших 6-гидроксидофамин (6-ОНДА) крысах [1, 3] и получавших 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МРТР) мышах [4]. Позже нейропротекторный эффект CDNF был показан также на получавших 6-ОНДА мармозетках, однако он оказался менее выраженным, чем у грызунов [5].

Описанные выше отличительные особенности CDNF продиктованы его молекулярной структурой. В структуре CDNF выделяют неструктурированный С-конец и глобулярный N-конец, которые соединены гибким линкером [6]. N-Конец содержит сигнальную последовательность, необходимую для трансляции в ЭПР, а также сапозиноподобный домен, способный контактировать с мембранами и липидами [2, 7]. На С-конце, в свою очередь, у CDNF находится последовательность, ответственная за удержание CDNF в просвете ЭПР (ER retention sequence; ERS) [8, 9]. С-Концевой мотив СХХС традиционно ассоциируют с цитопротекторным и антиапоптотическим действием, в то время как наличие N-терминального домена предполагает нейротрофные функции [10, 11].

Однако нейротрофические функции CDNF остаются слабо изученными. В первую очередь это касается его роли в регуляции нор-

мального и патологического поведения. Было проведено небольшое количество исследований, призванных установить влияние CDNF на поведение животных, но зачастую исследователи ограничивались лишь оценкой моторного поведения на различных моделях БП. Интересно, что нокаут гена *Cdnf* на мышах не привёл к существенным различиям в базовой двигательной активности, привыкании к новой среде, депрессивно-подобном или тревожно-подобном поведении [12]. В то время как у рыбок *Danio rerio* нокаут гена *Cdnf* вызывает нарушение социального поведения, снижение тревожности и повышение судорожной активности. Более того, у таких мутантных по гену *Cdnf* рыбок были зафиксированы нарушения не только со стороны дофаминовой системы, но и дефицит ГАМКергических и гистаминергических нейронов, что подтверждает роль CDNF как универсального регулятора нейрогенеза, необходимого для формирования медиатор-специфических типов нейронов [13]. Ранее было показано, что введение в гиппокамп CDNF или трансгена CDNF улучшает долговременную память, не влияя на исследовательское поведение, неophobia и пространственное обучение в экспериментальной модели болезни Альцгеймера – у мышей линии APP/PS1 [14]. Кроме того, было показано, что CDNF способен активировать PI3K/Akt-сигнальный путь как *in vitro*, так и *in vivo*, причём даже в неповреждённом мозге [15]. Поскольку указанный сигнальный путь является необходимым компонентом процесса долговременной потенциации, можно предположить, что CDNF принимает самое активное участие в процессах нейропластичности, связанных с обучением и памятью. Учитывая, что гиппокамп, особенно его дорсальная часть, – критически важная структура для обучения [16], памяти [17], пространственной навигации [18] и регуляции настроения [19] – большой интерес представляет изучение функций CDNF в регуляции гиппокамп-зависимого поведения. Однако на сегодняшний день этот аспект остаётся малоизученным. Также ничего не известно об участии CDNF в механизмах депрессии и действия антидепрессантов.

Линия мышей ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) была выведена путём длительной селекции на высокую предрасположенность к катаlepsии популяции беккроссов (CBA × (CBA × AKR)) от скрещивания чувствительной (CBA) и устойчивой (AKR) к катаlepsии линий [20, 21]. Мыши линии ASC демонстрировали каталептическое замирание [22], которое значительно снижалось при хроническом

введении классических антидепрессантов имипрамина и флуоксетина [23, 24]. Было установлено, что, в отличие от родительских линий, для ASC характерно увеличение неподвижности в тестах «принудительное плавание» и тесте «подвешивание за хвост», а также снижение двигательной активности, что интерпретируется как депрессивно-подобное поведение [25]. Подтверждением валидности модели ASC является также снижение депрессивно-подобного поведения в ответ на внутрижелудочковое введение рекомбинантного BDNF [26], которому в настоящее время отводится одно из ключевых мест в механизме депрессивных расстройств [27–29]. Кроме того, мыши линии ASC демонстрируют повышенную тревожность по сравнению с родительской линией [30]. Таким образом, линия мышей ASC была предложена в качестве новой животной модели для изучения механизмов депрессии [26], действия антидепрессантов и хорошо подходит для исследования эффектов CDNF в контексте патологий поведения.

Целью настоящей работы являлось исследование эффектов сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на поведение и экспрессию ряда ключевых генов, вовлечённых в процессы нейрональной пластичности у мышей линии ASC с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению. Гены-кандидаты (согласно базе данных KEGG; [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_organism?org=mtmu](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=mtmu)) включали следующие группы: рецепторы основных нейромедиаторных систем (серотониновые, дофаминовые, глутаматные); белки, вовлечённые в нейропластичность (*Arc*, *c-Fos*, *Syn*, *Bdnf*); белки, регулирующие выживание нейронов (*Bax*, *Bcl-xl*); белки системы протеостаза (*Atf6*, *Grp78*, *Perk*, *Ire1a*); транскрипционные факторы (*Creb*, *Nfxb*, *Xbp1*); а также киназы (*Akt1*, *Mapk3*, *Pik3r1*, *Kalrn*).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Дизайн эксперимента.** Эксперимент производился в три этапа (рис. 1). Первый этап: введение аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), кодирующего целевой белок или флуоресцентную метку, и тестирование животных в условиях домашней клетки спустя 4 недели с момента инъекции. Такой временной промежуток после введения AAV является оптимальным для достаточной наработки исследуемого белка и подобран на основании литературных данных [31] и исследований, проводившихся в нашей лаборатории [32, 33].

В группе, получавшей AAV-EGFP, – 11 животных; в группе, получавшей AAV-CDNF, – 11 животных.

Второй этап: введение вирусного вектора, кодирующего целевой белок или флуоресцентную метку, и тестирование животных для определения депрессивно-подобного, тревожно-подобного, исследовательского поведения, а также пространственного обучения. Размер выборки в каждой группе  $n \geq 8$ .

Дополнительно было оценено депрессивно-подобное поведение в тесте принудительного плавания, и так как этот тест обладает выраженным стрессорирующим воздействием, данный тест был проведён отдельно – третьим этапом. В группе, получавшей AAV-EGFP, – 6 животных; в группе, получавшей AAV-CDNF, – 7 животных.

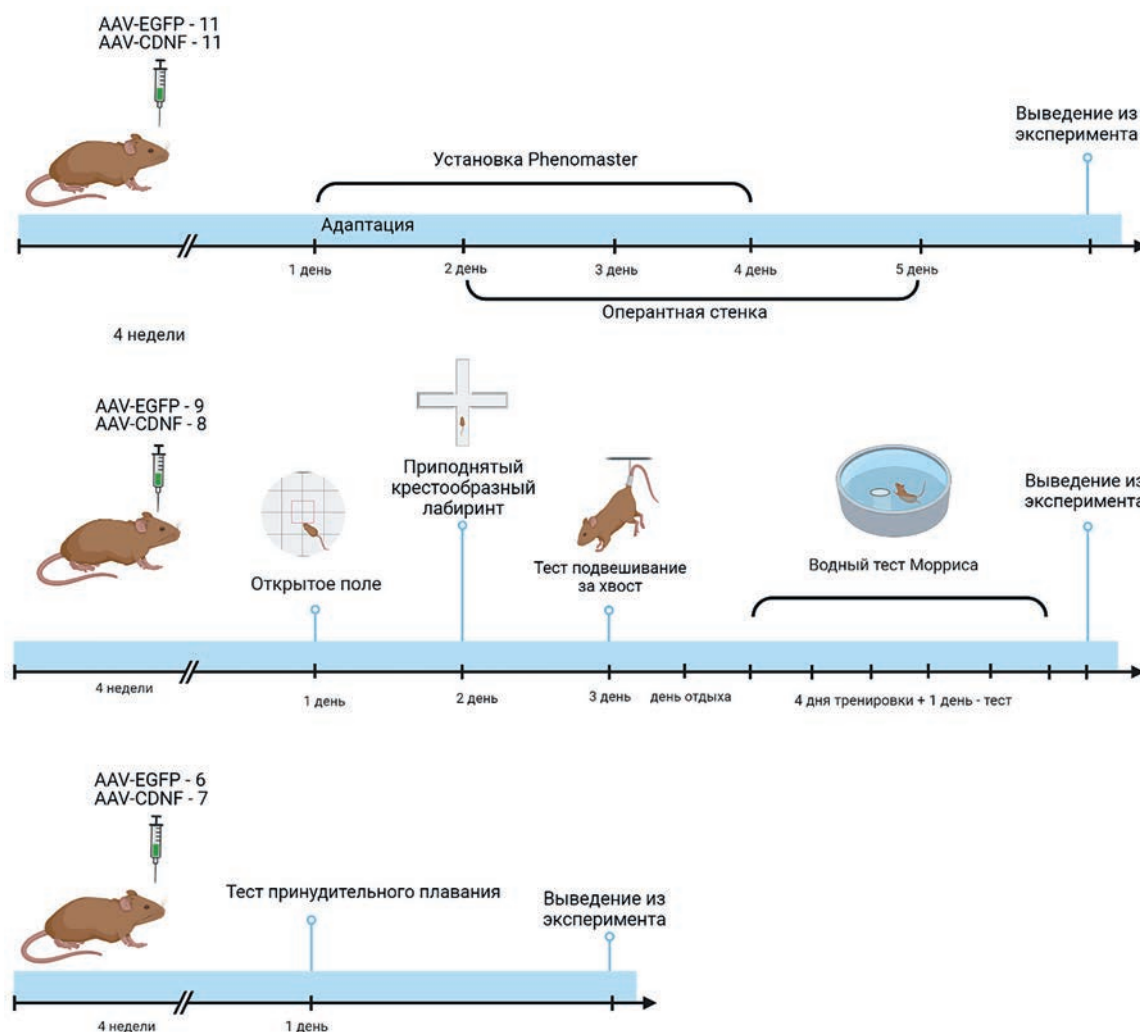
**Животные.** Эксперименты проводились на взрослых самцах мышей линии ASC, которая была выведена путём длительной селекции на предрасположенность к каталепсии в лаборатории нейрогеномики поведения Института цитологии и генетики СО РАН. Инъекцию обеим группам животных осуществляли в возрасте 2 мес.

Животных содержали в ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН по 4–5 особей в стандартных лабораторных условиях со свободным доступом к воде и пище. За 2 дня до проведения поведенческих тестов животных рассаживали в отдельные клетки для снятия групповых эффектов.

**Плазмиды.** В лаборатории был создан и верифицирован аденоассоциированный вирусный вектор, несущий плазмиду pAAV-Syn-CDNF-EGFP, которая кодирует ген *Cdnf* мыши, а также зелёный флуоресцентный белок (*EGFP*), необходимый для контроля эффективности экспрессии плазмиды в нейронах млекопитающих. Контрольная группа получала аналогичный вектор, кодирующий только *EGFP*. Карты плазмид AAV-Syn-Cdnf-EGFP и AAV-Syn-EGFP, использованных в настоящем исследовании, показаны на рис. 2, а. Все этапы клонирования были проверены секвенированием по Сэнгеру.

**Клеточная культура и трансфекция.** Клетки НЕК 293FT # РТА-5077 («АТСС», США) использовали для получения векторов рекомбинантного аденоассоциированного вируса.

Линию клеток поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS («Sigma-Aldrich», США) и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина («Sigma-Aldrich»), при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки пассировали при конfluентности не менее 70%, и культуральную среду обновляли каждые 2–3 дня.



**Рис. 1.** Дизайн эксперимента. Мышам опытной группы стереотаксически вводили в гиппокамп pAAV-Syn-Cdnf-EGFP (экспрессирующую *Cdnf*), в гиппокамп мышей контрольной группы вводили pAAV-Syn-EGFP (экспрессирующую только *EGFP*). Через 4 недели мышам изолировали в индивидуальные клетки и затем проводили поведенческие тесты

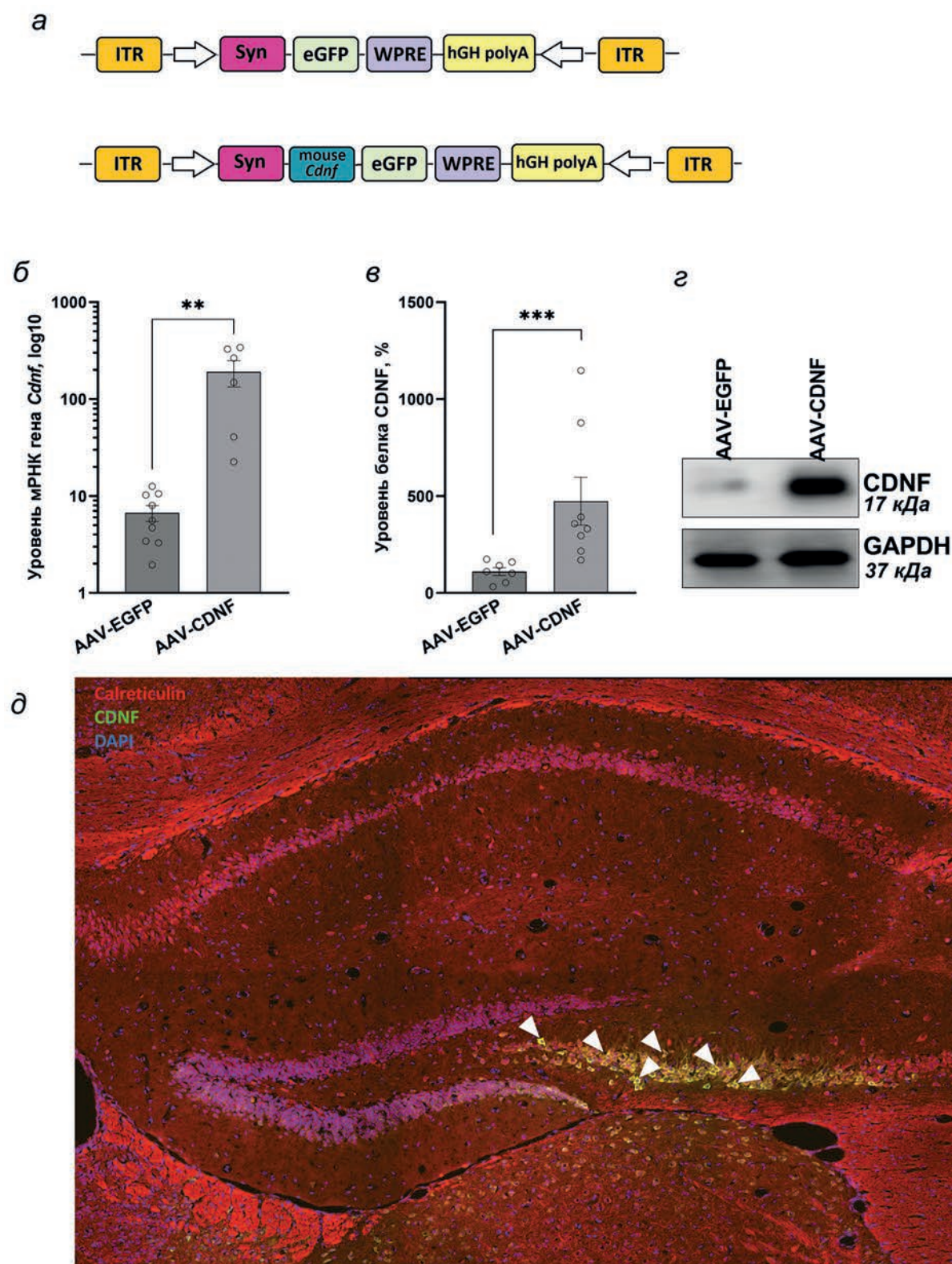
**Аденоассоциированные вирусы.** Упаковку AAV-Syn-Cdnf-EGFP и AAV-Syn-EGFP в капсулы AAV проводили путём котрансфекции с плазмидами AAV-DJ и pHelper («Cell Biolabs Inc.», США) в НЕК-клетки. Количество полученных вирусных частиц определяли методом количественной ПЦР (кПЦР).

**Стереотаксическое введение в гиппокамп.** Перед проведением процедуры животных наркотизировали смесью 2,2,2-трибромэтанола и 2-метил-2-бутанола; после разрезания кожи на череп помещали в стереотаксическую установку («TSE Systems», Германия). Далее череп билатерально просверливали, согласно координатам AP: -2,0 мм; ML: 1,5 мм; DV: 2,0 мм (<http://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/?ml=1.5&ap=-2&dv=2>). Вирусные частицы (1 мкл), разведённые в 1× PBS до концентрации  $10^9$  вирусных частиц в мкл, медленно вводили микрошприцем в гиппокамп со скоростью 0,1 мкл/мин в течение 10 мин. После инъекции иглу остав-

ляли в месте инъекции ещё на 2 мин, чтобы минимизировать утечку вирусной суспензии при извлечении иглы. До начала эксперимента 6 животным линии ASC была сделана пробная стереотаксическая инъекция AAV-EGFP в гиппокамп, чтобы с помощью дальнейшего морфологического контроля убедиться в правильности выбранных координат.

**Экстракция образцов мозга.** Мыши были декапитированы через 24 ч после тестирования поведения. Мозг был извлечён в тот же день (12:00–14:00) на лёд, образцы целого гиппокампа были выделены в соответствии с онлайн-атласом мышиного мозга ([https://scalablebrainatlas.incf.org/mouse/ABA\\_v3](https://scalablebrainatlas.incf.org/mouse/ABA_v3)), заморожены в жидком азоте и хранились при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  до процедур выделения РНК или вестерн-блот-анализа. Для анализа экспрессии генов интереса использовались образцы мозга животных второго этапа, прошедших поведенческое тестирование. Так как инъекции





**Рис. 2.** Сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе мышей ASC. **а** – Карты плазмид pAAV-Syn-EGFP и pAAV-Syn-Cdnf-EGFP. **б** – Уровень мРНК гена *Cdnf*. **в** – Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка CDNF, и результат иммуноблота на мембране (**г**). Число копий кДНК гена отнесено на 100 копий кДНК *rPol2*. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  – по сравнению с контролем. **д** – Совместная локализация кальтрекулина и трансдуцированного CDNF в CA3-области и зубчатой извилине гиппокампа (масштабная линейка – 100 мкм). Срезы гиппокампа подвергали иммуногистохимическому окрашиванию для обнаружения CDNF (зелёный) и кальтрекулина (красный) с последующей конфокальной микроскопией. Ядра показаны синим цветом. Колокализация показана жёлтым цветом, наиболее репрезентативные клетки отмечены стрелками

вирусного вектора осуществлялись билатерально, определение уровней мРНК и белка проводили по отдельности, используя левую или правую половины гиппокампа. Образцы гиппокампа животных первого и третьего этапов эксперимента использовали только для определения уровня мРНК с целью подтверждения сверхэкспрессии CDNF.

Суммарную РНК выделяли с помощью ExtractRNA («Евроген», Россия), обрабатывали ДНКазой без РНКазной активности (RNase free DNase, 1000 о.е./мл; «Promega», США) в соответствии с протоколами производителей. Концентрацию РНК оценивали с помощью спектрофотометра Eppendorf Nanodrop 2000C («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). РНК разводили водой до концентрации 0,125 мкг/мкл и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Реакция обратной транскрипции.** Полученную общую РНК в количестве 1 мг смешивали с рандомными гексануклеотидными праймерами (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2,25 мкмольями стерильного KCl. На амплификаторе («БИС», Россия) производили денатурацию при  $94^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин и отжиг — при  $41^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин, после чего на льду непосредственно добавляли по 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу M-MLV (200 ед.), а также Tris-HCl (pH 8,3; 0,225 мкмоль), смесь dNTP (0,015 мкмоль каждого), DTT (0,225 мкмоль) и  $\text{MnCl}_2$  (0,03 мкмоль). Полученную смесь инкубировали при  $41^{\circ}\text{C}$  в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени.** ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 System («Roche», Швейцария). кДНК (1 мкл) смешивали с 19 мкл смеси Master mix («Синтол», Россия), приготовленной согласно инструкции производителя. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл. 1), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании «БИОССЕТ» (Новосибирск). Серия разведений геномной ДНК с концентрацией 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл была амплифицирована одновременно в отдельных пробирках и была использована как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Для контроля специфичности амплификации использовался анализ кривой плавления для каждого прогона каждой пары праймеров. Калибровочная кривая была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 («Roche Applied Science»).

Экспрессию генов представляли как отношение количества копий кДНК анализируемого гена к 100 копиям гена *rPol2*, выполняющего функцию внутреннего стандарта [34–36]. Для сплайсированной (*sXbp*) и несплайсированной (*uXbp*) форм *Xbp* расчёт производился по методу  $\Delta\Delta\text{Ct}$  с помощью программного обеспечения амплификатора.

**Вестерн-блот-анализ.** Для определения уровня общего белка образцы ткани гомогенизировали («Kimble Chase», США) в 300 мкл лизирующего буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl (pH 8,4), 300 мМ NaCl, 4 мМ EDTA, 0,2% (w/v) Triton X-100; 1 мМ  $\text{NaVO}_4$ , 2 мМ PMSF, 1 мМ смеси ингибиторов протеаз (химостатин, лейпептин, антипаин, пепстатин; «Sigma-Aldrich») и ингибиторы фосфотаз (PhosSTOP; «Roche») из расчёта одна таблетка на 10 мл буфера. Гомогенат инкубировали на льду 60 мин и центрифугировали (12 000 g, 15 мин). Супернатант белка переносили в чистые пробирки и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Количество общего белка было измерено по методу BCA с использованием коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific Inc.»). Пробы разводились до концентрации 1500 мкг/мл с помощью 2-кратного буфера Лэммли (2,5 мл буфера Лэммли получали смешиванием 147 мкл 1 М Tris-HCl (pH 6,8), 470 мкл 10%-ного SDS, 235 мкл глицерола, 117 мкл 5%-ного  $\beta$ -меркаптоэтанола и 1,5 мл воды) и хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Проводили термическую обработку проб для денатурации белка (5 мин,  $95^{\circ}\text{C}$ ). Экстракты белка (15 мкг на дорожку) разделяли с помощью 10%-ного разделяющего SDS-PAGE. Для электрофореза использовалась камера Hoefer SE 600 («Hoefer Inc.», США) и источник питания EPS 301 («Amersham Pharmacia Biotech», Великобритания). Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) с помощью системы для полусухого электроблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System («Bio-Rad») в течение 2 ч при силе тока 0,9 А. В качестве маркера использовалась смесь Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards («Bio-Rad»).

Для иммунодетекции белка мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком, разведённом в буфере TBS-T (Tris Bufferdd Saline, «Bio-Rad Laboratories Inc.», США) с добавлением 0,05% (v/v) Tween 20, в течение часа при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи (табл. 2).

После первичных антител мембрану отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T и инку-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

| Ген           | Нуклеотидная последовательность (5'→3')                  | Температура отжига, °C | Длина ПЦР продукта, п.н. |
|---------------|----------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Htr1a</i>  | F: CTGTGACCTGTTTATCGCCCTG<br>R: GTAGTCTATAGGGTCGGTGATTGC | 62                     | 109                      |
| <i>Htr2a</i>  | F: AGAAGCCACCTTGTGTGTGA<br>R: TTGCTCATTGCTGATGGACT       | 61                     | 169                      |
| <i>Htr2b</i>  | F: AGAAAAGGTGGCAATGCTGG<br>R: TTAGAAATGGTTTGGGCTGATCT    | 59                     | 120                      |
| <i>Htr7</i>   | F: GGCTACACGATCTACTCCACCG<br>R: CGCACACTCTTCCACCTCCTTC   | 65                     | 198                      |
| <i>Akt-1</i>  | F: TGCCAGCTGATGAAGACAGA<br>R: CCATTCTTCCCGCTCCTCAG       | 60                     | 120                      |
| <i>Arc</i>    | F: ATCTGTTGACCGAAGTGTCCAAG<br>R: GAAGACCTCCCTCCACACGT    | 64                     | 218                      |
| <i>Atf6</i>   | F: CTCAAACCAATGCCAGTGTCC<br>R: ATGCTGATAATCGACTGCTGC     | 59                     | 94                       |
| <i>Avpr1a</i> | F: GACATCACCTACCGCTTCCG<br>R: CCAAGAGGCGGCGATCAT         | 60                     | 192                      |
| <i>Bax</i>    | F: CATCTTTGTGGCTGGAGTCCTC<br>R: AAGTGGACCTGAGGTTTATTGGC  | 64                     | 216                      |
| <i>Bcl-xl</i> | F: TGGATCTCTACGGGAACAATGC<br>R: GTGGCTGAAGAGAGATTGTGG    | 64                     | 197                      |
| <i>Bdnf</i>   | F: TAGCAAAAAGAGAATTGGCTG<br>R: TTTCAGGTCATGGATATGTCC     | 59                     | 255                      |
| <i>Cdnf</i>   | F: CGGTGGACCTGTGGAAGATG<br>R: ACATATTTGGGGGCCAGCTC       | 60                     | 130                      |
| <i>c-Fos</i>  | F: AAAGAGAAGGAAAACTGGAG<br>R: CGGAAACAAGAAGTCATCAA       | 58                     | 264                      |
| <i>Creb</i>   | F: GCTGGCTAACAATGGTACGGAT<br>R: TGGTTGCTGGGCACTAGAAT     | 64                     | 140                      |
| <i>Drd1</i>   | F: GGAAACCCTGTCGAATGCTCTC<br>R: CAGCCAAACCACAAAATACATCG  | 64                     | 195                      |
| <i>Drd2</i>   | F: TCCGCCACTTCTTGACATACATTG<br>R: CCCATCCACAGCCTCCTCTAAG | 64                     | 132                      |
| <i>Gria1</i>  | F: CAATGAAGCCATACGGACATCG<br>R: GGATTGCATGGACTTGGGGA     | 60                     | 121                      |
| <i>Gria2</i>  | F: GTGTTTGTGAGGACTACGGC<br>R: TTCATGGTGTGCGAAGGCT        | 60                     | 125                      |
| <i>Grik1</i>  | F: GACTCGCTGGAACACCCTT<br>R: TCTTCGTACACCACCGTCAC        | 60                     | 141                      |
| <i>Grik2</i>  | F: AGGAGACAGTCTGTGCTTGTC<br>R: CCACCAATCTGCGTGAGGT       | 60                     | 137                      |
| <i>Grin1</i>  | F: TTTTCTCCTGCTCCTTCGCC<br>R: TGTCGCTTATTGGCCTGGTT       | 60                     | 124                      |
| <i>Grin2a</i> | F: TGAACCGCACTGACCCTAAG<br>R: CACAGCCTCTTGGTCCGTAT       | 60                     | 107                      |



Таблица 1 (продолжение)

| Ген                    | Нуклеотидная последовательность (5'→3')                 | Температура отжига, °C | Длина ПЦР продукта, п.н. |
|------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Grin2b</i>          | F: CTATCACCATCACCACCGGC<br>R: TCATCATGGCCACTGTAGCG      | 60                     | 210                      |
| <i>Grm1</i>            | F: CGCACACTCGGACAAAATCT<br>R: AGTGAGAACTCTCCACGAC       | 59                     | 177                      |
| <i>Grm2</i>            | F: GGAACAACAGCAGGAACCCT<br>R: CACGGCATTGACCACAAACAT     | 60                     | 146                      |
| <i>Grm3</i>            | F: AGCAAGGCTACGCAACATCT<br>R: CACCCAGGTGAAGGAAGCAT      | 60                     | 196                      |
| <i>Grm4</i>            | F: GAGCGGAAGAAGACGGTGAA<br>R: TGACAATGGGTATGGGCTGG      | 60                     | 157                      |
| <i>Grm5</i>            | F: CCCACACTCTTGCCCAACAT<br>R: ACAGCGTACCAAGCCTTCTT      | 60                     | 141                      |
| <i>Grp78</i>           | F: CGCTCTACCATGAAGCCTGT<br>R: AGCCTCATCGGGGTTTATGC      | 60                     | 174                      |
| <i>Ire1a</i>           | F: TCTGGGGATGTCCTGTGGAT<br>R: CTTGGCCTCTGTCTCCTTGG      | 60                     | 195                      |
| <i>Kalrn</i>           | F: CATGGTGTCTGTGGAGGGC<br>R: CCGCACTGTTGAAGAACTCC       | 60                     | 137                      |
| <i>Mapk3</i>           | F: TGCCCTCGAAAACCAAGGTG<br>R: CGAAGGTGAATGGCTCCTCG      | 61                     | 195                      |
| <i>Nfya1</i>           | F: CGTCTGTCTGCTCTCTCTCGAC<br>R: CTCGCCTCGGTACTTCTCTCTC  | 62                     | 152                      |
| <i>Perk</i>            | F: ACAACAGTGAAGTCAAGCGAC<br>R: GCAGCCAGAGTCTCAAACA      | 60                     | 194                      |
| <i>Pik3r1</i>          | F: TCCGAAAGACTCTAGCCTTGG<br>R: CATGCTGCTTGATGGTGTGG     | 60                     | 132                      |
| <i>Plcg1</i>           | F: TTCTACTCCAAGAAGTCGCAGC<br>R: GACCCCTCGATTTTGTCCGC    | 61                     | 104                      |
| <i>rPol2</i>           | F: GTTGTCGGGCAGCAGAATGTAG<br>R: TCAATGAGACCTTCTCGTCCTCC | 61                     | 188                      |
| <i>sXbp1</i><br>(кДНК) | F: GCTGAGTCCGCAGCAGGT<br>R: CAGGGTCCAACCTGTCCAGAAT      | 60                     | 130                      |
| <i>Syp</i>             | F: GTTGGTGACTACTCCTCCTCG<br>R: GCCCTTTGTGTTCTCTCGGTA    | 60                     | 127                      |
| <i>uXbp1</i>           | F: CAGACTACGTGCACCTCTGC<br>R: CAGGGTCCAACCTGTCCAGAAT    | 60                     | 139                      |

бирова́ли со вторичными поликлональными антителами (табл. 2), конъюгированными с пероксидазой хрена, при комнатной температуре в течение часа. Затем мембрану снова отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T.

Связанные антитела визуализировались с помощью Clarity Western ECL («Bio-Rad»), в

соответствии с инструкцией производителя, и сканера C-Digit Blot Scanner («Li-Cor», США). Для каждой мембраны проводилось измерение конститутивного белка GAPDH в качестве внутреннего стандарта для дальнейшей нормировки. Экспрессия белка выражалась в относительных единицах. Плотность бендов



Таблица 2. Характеристики используемых в работе антител

| Белок  | Первичные антитела |                                         | Вторичные антитела:<br>разведение, шифр производителя    |
|--------|--------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|        | Разведение         | Шифр производителя                      |                                                          |
| CDNF   | 1 : 500            | Pag458Mu01 («CloudClone», США)          | Против кролика 1 : 10 000<br>G-21234 («Invitrogen», США) |
| CREB   | 1 : 1000           | Ab 3138 («Abcam», Великобритания)       |                                                          |
| pCREB  | 1 : 1000           | Ab 32096 («Abcam»)                      |                                                          |
| MAPK   | 1 : 1000           | Ab 17942 («Abcam»)                      |                                                          |
| p-MAPK | 1 : 1000           | 9101 («Cell Signaling Technology», США) |                                                          |
| cFos   | 1 : 500            | Sc-52 («Santa Cruz», США)               | Против кролика 1 : 8000<br>G-21234 («Invitrogen»)        |
| p-cFos | 1 : 1000           | D82c12 («Cell Signaling Technology»)    |                                                          |
| GAPDH  | 1 : 10000          | Ab 8245 («Abcam»)                       | Против мыши 1 : 30 000 ab6728 («Abcam»)                  |

определялась с помощью денситометрии для количественной оценки содержания белка при помощи программы Image Studio Lite 5.2.

**Иммунофлуоресцентный анализ.** Спустя 4 недели после инъекции животных транкардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4%-ным раствором параформальдегида. Мозг извлекали и постфиксировали 4%-ным параформальдегидом на 6 ч, затем погружали в 30%-ный раствор сахарозы в PBS на 2 дня. Последовательные срезы толщиной 8 мкм делали в криостате («Thermo Scientific», США). Пермеабиллизацию проводили погружением в 0,3%-ный раствор Triton X-100 (T8787, «Sigma-Aldrich») на 30 мин. Неспецифическое связывание блокировали 5%-ной нормальной ослиной сывороткой («Sigma-Aldrich») и 0,1%-ным Triton X-100 в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубацию с антителами anti-Calreticulin [FMC 75] (1 : 1000, ab22683, «Abcam») и anti-CDNF (1 : 1000; «Icosagen AS», Эстония), разведённым в PBS, проводили в течение ночи при 4 °C. После промывания в PBS наносили вторичные антитела с флуоресцентными метками на 1 ч при комнатной температуре (1 : 400, #711-545-152 Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG и 1 : 200 #A-21203 Donkey anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594). Ядра клеток окрашивали раствором бис-бензида (краситель Hoechst 33258 (5 мкг/мл в PBS); «Sigma-Aldrich»). Срезы помещали в монтирующую среду (Fluoromount G; «Associates Biotechnology Southern», США) с последующим микроскопическим анализом с использованием конфокального микроскопа Olympus IX83P2ZF («Olympus Corp.», Япония).

**Поведенческие тесты. Тесты в условиях домашней клетки.** В течение 96 ч с помощью установки PhenoMaster («TSE Systems») автоматически регистрировались такие физиологические показатели, как: пройденный путь (м), потребление пищи (г) и воды (мл), время и число эпизодов сна (мин). Неподвижность животного оценивалась периодами по 10 с, и программа считала животное спящим, если фиксировала 4 периода неподвижности подряд (равнозначно одному эпизоду сна). Таким образом, программное обеспечение установки PhenoMaster определяло состояние сна как неподвижность в течение 40 с и более.

В течение 3 дней у животных исследовали когнитивные способности с помощью теста «оперантная стенка». Начало теста всегда совпадало с началом периода активного бодрствования животных, сигналом служил свет лампочки, встроенной в модуль. Модуль был запрограммирован таким образом, что на первый день животное получало простейшую задачу — получить вознаграждение в виде сладкой гранулы, совершая тычок носом в отверстие, помеченное горячей лампочкой. На второй день задача усложнялась — теперь, чтобы получить вознаграждение, необходимо было выполнить тычки носом в 2 помеченных светом отверстия. На третий день задача отличалась от предыдущего, однако отверстия уже не были помечены светом — животное должно было само вспомнить необходимую последовательность действий.

Продолжительность тестирования каждый день составляла не более 120 мин. Окончание теста наступало, когда животное получало все гранулы (всего 10 штук), либо автоматически,

по истечении указанного интервала. Запись параметров начиналась после первого тычка в отверстие.

Для нижеописанных тестов для снятия групповых эффектов за 2 дня до экспериментов животных рассаживали в индивидуальные клетки.

**Тест «открытое поле» (*open field*).** Установка для этого теста представляет собой арену с диаметром 40 см и высотой стенок 25 см. Полупрозрачный пол освещался снизу двумя галогеновыми лампами мощностью 12 Вт, расположенными на 40 см ниже. Испытуемое животное помещали около стенки арены и тестировали в течение 5 мин. С помощью оригинального программного обеспечения «EthoStudio» проводилась автоматическая регистрация общей длины пройденного пути, площади покрытия арены и времени, проведённого в центре арены (диаметр 20 см) [37]. Число вертикальных стоек и эпизоды умывания подсчитывались вручную.

**Тест «подвешивание за хвост» (*tail suspension test*).** Установка представляет собой горизонтальную штангу, расположенную на высоте 30 см, на которой с помощью липкой ленты животные фиксируются за хвост. В этом положении животные не могут сбежать или же ухватиться за ближайшие поверхности. Чтобы предотвратить карабкание животных по хвосту, на него надевается пластиковый гладкий цилиндр. При подвешивании мыши за хвост регистрировалось время неподвижности и число эпизодов неподвижности. Подвижность в этом тесте определялась как любые произвольные движения животных: попытки дотянуться до стенок установки и перекладины, сильная тряска или движения конечностей, похожие на бег; маятникообразные раскачивания, возникающие в связи с предыдущими движениями, подвижностью не считались. Продолжительность тестирования составляла 6 мин, производилась видеорегистрация теста.

**Приподнятый крестообразный лабиринт (*elevated plus maze*)** — это пересекающиеся под прямым углом рукава, два из которых открыты и два закрыты. Длина рукавов составляла 30 см, ширина — 6 см, расстояние над уровнем пола — 60 см. Закрытые рукава имели стенки из непрозрачного пластика высотой 20 см (безопасные рукава). Животное помещали на место пересечения четырёх рукавов лабиринта, лицом по направлению к открытому рукаву. В последующие 5 мин с использованием оригинального программного обеспечения «EthoStudio» фиксировались следующие показатели: время пребывания в открытых и

закрытых рукавах, а также исследованная площадь рукавов. Число выглядываний из закрытого рукава и свешивания с края арены подсчитывались вручную.

**Тест принудительного плавания (*forced swim test*).** Мышь помещали в прозрачный стеклянный цилиндр диаметром 15 и высотой 25 см, наполненный водой ( $t = 25^{\circ}\text{C}$ ). После 2-минутного периода адаптации, в течение 4 мин автоматически регистрировалась подвижность, а также вручную регистрировалась неподвижность животного с помощью оригинального программного обеспечения «EthoStudio». Для расчёта уровня подвижности программа измеряла скорость изменения силуэта животного, которая определялась как количество пикселей, связанных с животным, изменённых между двумя соседними кадрами [38, 39].

**Водный лабиринт Морриса (*Morris water maze*).** Установка для теста представляла собой круглый бассейн диаметром 110 см со стенками высотой 30 см. Бассейн заполняли водой (температура —  $25^{\circ}\text{C}$ , высота столба воды —  $\sim 15$  см) и добавляли сухое молоко для непрозрачности. В программе «EthoStudio» установка делилась на 4 сектора. Стеклоплатформа диаметром 6 см помещалась в геометрический центр нижнего правого сектора так, что она оказывалась на 0,5 см ниже уровня воды, становясь невидимой для животных. На ближайшую к платформе стену бассейна клеили чёрный прямоугольник размером  $6 \times 12$  см, который служил визуальным ориентиром. Животное автоматически трассировалось при помощи веб-камеры, и его поведение анализировалось в программе «EthoStudio».

Обучение животных проводилось в течение 4 дней, по 3 тестирования каждый раз. При обучении животное помещали в центр одного из секторов, кроме целевого, и в течение 60 с оно искало платформу. Вне зависимости от того, была найдена платформа или нет, в конце каждого тестирования мышь помещали на платформу и удерживали (если требовалось) там в течение 15 с. Параметры, которые измерялись в течение тестирования: латентное время нахождения платформы (с), пройденный путь (см) и суммарное расстояние до платформы (см), которое вычислялось как сумма расстояний от мыши до платформы в каждый момент времени. Считалось среднее по трём тестированиям.

На пятый день проводили контрольное тестирование для проверки качества формирования пространственной памяти у животных. Для этого платформу убрали, животное помещали в центр бассейна и фиксировали

его перемещение в течение 60 с. Оценивали время нахождения в целевом секторе (%), потом считали среднее по трём тестированиям. Статистически значимое превышение времени нахождения в целевом секторе над случайным (25%) свидетельствовало о том, что мышь помнит расположение платформы.

**Статистический анализ.** Все полученные результаты проверялись на соответствие нормальному распределению по критерию Колмогорова–Смирнова и Диагностини–Пирсона. Экстремальные значения исключались с помощью критерия Диксона. Динамические результаты поведенческого тестирования в домашней клетке (потребление воды, пищи, пройденный путь), а также такие показатели, как латентное время нахождения платформы, расстояние до платформы и пройденный путь в водном тесте Морриса, обрабатывались дисперсионным анализом (ANOVA) для повторных измерений. Также проводилось апостериорное сравнение по Фишеру. Остальные результаты поведенческих тестов, а также все результаты молекулярных методик обрабатывались с помощью *t*-критерия Стьюдента или *U*-критерия Манна–Уитни. Все значения представлены как  $m \pm SEM$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Сверхэкспрессия CDNF.** Интрагиппокампальная инъекция AAV-CDNF вызвала повышение уровня мРНК *Cdnf* более чем в 10 раз ( $t = 2,752$ ;  $p = 0,0015$ ; рис. 2, б). Вестерн-блот-анализ также показал, что уровень белка CDNF в гиппокампе экспериментальных животных значительно вырос ( $U = 1$ ;  $p = 0,0006$ ; рис. 2, в и г). Таким образом, была достигнута сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе экспериментальных животных, что также было подтверждено данными флуоресцентной микроскопии (рис. 2, д). По результатам иммуногистохимического анализа с кальретикулином, проведённому на срезах гиппокампа, было обнаружено, что экспрессируемый CDNF преимущественно локализуется в ЭПР (рис. 2, д).

**Эффекты сверхэкспрессии CDNF на поведение в условиях домашней клетки.** Сверхэкспрессия CDNF не повлияла на общую физическую активность животных, которая оценивалась по изменению пройденной дистанции ( $F_{(1,17)} = 1,81$ ;  $p > 0,05$ ). В то же время здесь отмечается эффект дня тестирования ( $F_{(3,51)} = 22,58$ ;  $p < 0,001$ ), то есть к четвёртому дню животные проходили меньшее расстояние вне зависимости от группы (рис. 3, а). Общий прой-

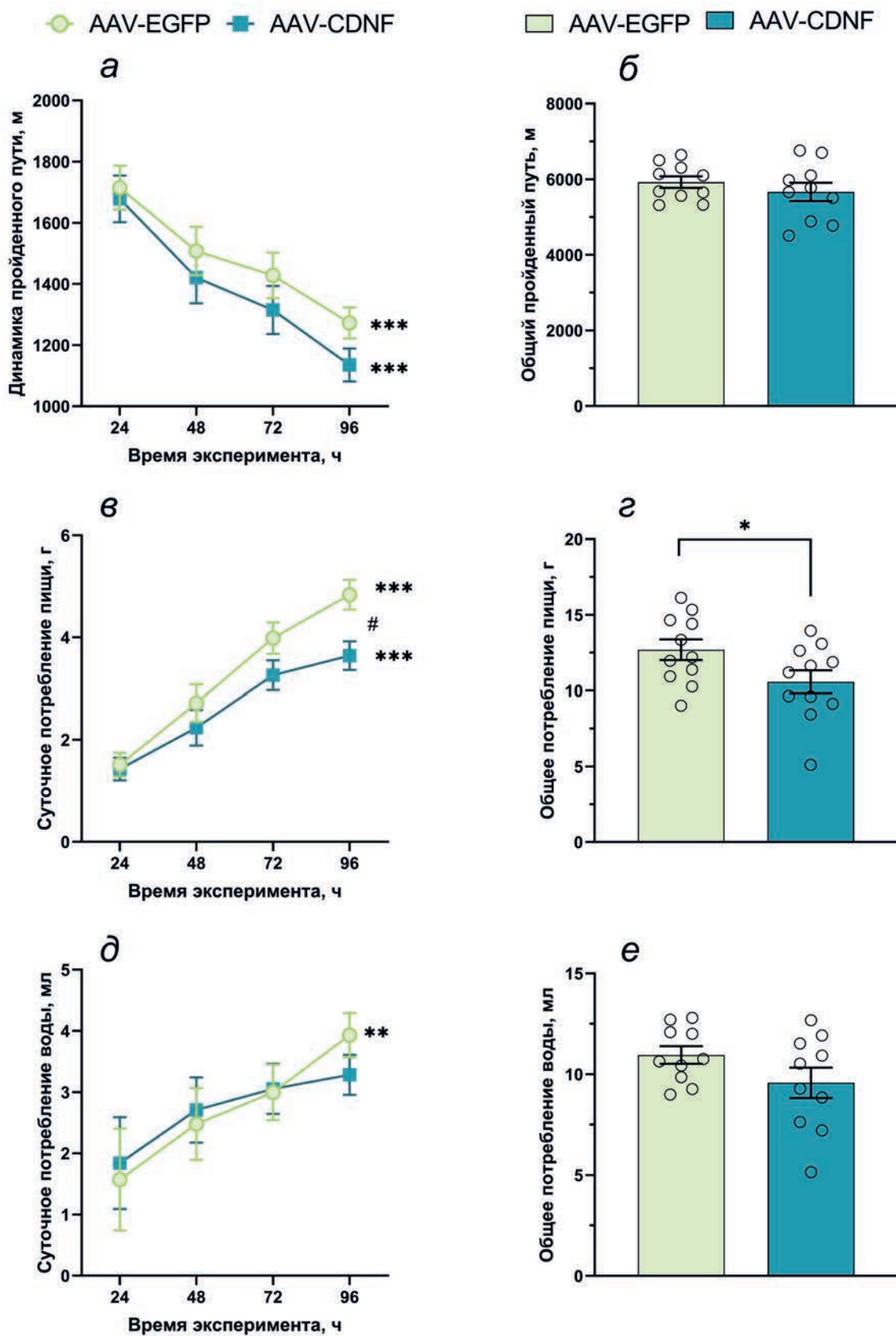
денный путь у групп AAV-EGFP и AAV-CDNF ( $t = 0,9$ ;  $p > 0,05$ ) не отличался (рис. 3, б).

Динамика потребления пищи достоверно различалась у разных групп животных ( $F_{(1,19)} = 6,18$ ;  $p < 0,05$ ; рис. 3, в). Апостериорное сравнение выявило достоверную разницу между животными из групп AAV-EGFP и AAV-CDNF на четвёртый день ( $p < 0,01$ ). Эффект дня достоверно отмечается у всех групп ( $F_{(3,57)} = 39,53$ ;  $p < 0,001$ ). Однако взаимодействия факторов сверхэкспрессия  $\times$  день тестирования не выявлено ( $F_{(3,57)} = 1,4$ ;  $p > 0,05$ ). Общее потребление пищи оказалось достоверно ниже у животных со сверхэкспрессией CDNF ( $t = 2,079$ ;  $p = 0,05$ ; рис. 3, г).

Сверхэкспрессия CDNF не повлияла ни на динамику потребления воды ( $F_{(1,18)} = 0,003$ ;  $p > 0,05$ ; рис. 3, д), ни на общее количество потреблённой воды ( $t = 1,59$ ;  $p > 0,05$ ; рис. 3, е). Для обеих групп отмечается эффект дня тестирования ( $F_{(3,54)} = 4,33$ ;  $p < 0,001$ ). При апостериорном сравнении установлено, что основной вклад в «эффект дня» осуществляет разница, возникающая к четвёртому дню в группе AAV-EGFP ( $p < 0,01$ ). Взаимодействия факторов не выявлено ( $F_{(3,54)} = 0,3$ ;  $p > 0,05$ ).

Сверхэкспрессия CDNF не оказала влияния на цикл сон/бодрствование. Анализ динамики длительности эпизодов сна и их количества не выявил отличий между исследуемыми группами животных ( $F_{(1,20)} = 0,01$ ;  $p > 0,05$  и  $F_{(1,20)} = 3,46$ ;  $p > 0,05$  соответственно). Однако как длительность эпизодов сна, так и количество эпизодов достоверно отличаются в зависимости от времени суток ( $F_{(89,18)} = 18,74$ ;  $p < 0,001$  и  $F_{(89,18)} = 13,82$ ;  $p < 0,001$  соответственно; рис. 4). При этом животные всех групп проявляют меньшую активность в светлое время, что было подтверждено при анализе средней продолжительности эпизодов сна и их количества в зависимости от фазы суток ( $F_{(1,4)} = 97,25$ ;  $p < 0,001$  и  $F_{(1,4)} = 198,1$ ;  $p < 0,001$  соответственно; рис. 4). Эффект сверхэкспрессии отмечался для количества эпизодов сна ( $F_{(1,4)} = 4,32$ ;  $p < 0,05$ ), но не их средней продолжительности ( $F_{(1,4)} = 0,02$ ;  $p > 0,05$ ) при оценке с учётом фазы суток. Разница объясняется большим количеством эпизодов в группе AAV-CDNF в светлое время суток, выявленным при апостериорном тестировании ( $p < 0,05$ ). Взаимодействия факторов сверхэкспрессия  $\times$  фаза суток не выявлено для обоих параметров ( $F_{(1,4)} = 0,006$ ;  $p > 0,05$  и  $F_{(1,4)} = 1,54$ ;  $p > 0,05$  соответственно).

**Сверхэкспрессия CDNF не повлияла на тревожность, депрессивно-подобное и исследовательское поведение.** Сверхэкспрессия CDNF



**Рис. 3.** Поведение животных со сверхэкспрессией CDNF и животных контрольной группы в домашней клетке: *а* – динамика пройденного пути; *б* – общий пройденный путь; *в* – динамика суточного потребления пищи; *г* – общее потребление пищи; *д* – динамика суточного потребления воды; *е* – общее потребление воды. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p = 0,05$  – для обеих групп по сравнению с первым днём; #  $p < 0,01$  – для группы AAV-CDNF по сравнению с AAV-EGFP



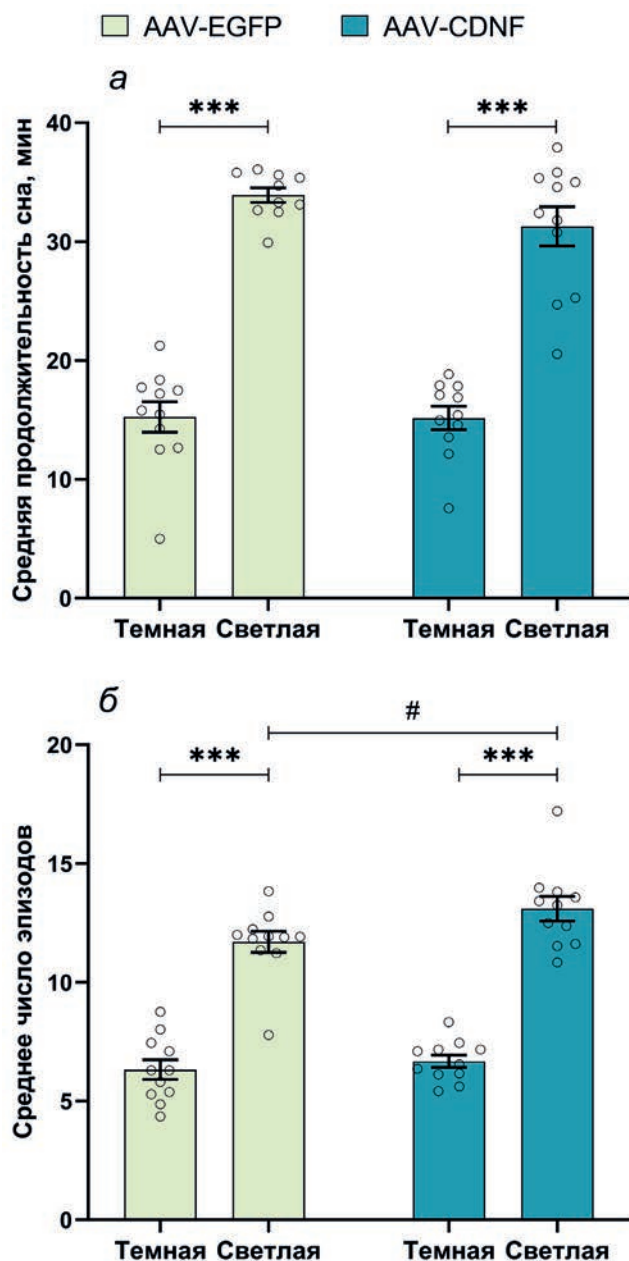


Рис. 4. Средняя продолжительность (а) и среднее количество (б) эпизодов сна животных со сверхэкспрессией CDNF и животных контрольной группы в зависимости от фазы суток. \*\*\*  $p < 0,001$  — по сравнению с тёмной фазой; #  $p < 0,05$  — для группы AAV-CDNF по сравнению с AAV-EGFP

не повлияла на исследовательское и тревожно-подобное поведение ни в тесте «открытое поле», ни в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». По результатам тестов «подвешивание за хвост» и «принудительное плавание» также не было обнаружено эффектов CDNF на депрессивно-подобное поведение (табл. 3).

**Эффекты сверхэкспрессии CDNF на обучение.** Тестирование в водном лабиринте Мор-

риса показало, что животные экспериментальной группы обучались быстрее. Анализ повторных измерений ANOVA для динамики обучения мышей выявил эффект сверхэкспрессии на латентное время нахождения платформы ( $F_{(1,15)} = 4,45$ ;  $p = 0,05$ ; рис. 5, а) и на суммарное расстояние до платформы в каждый момент времени ( $F_{(1,15)} = 6,23$ ;  $p < 0,05$ ; рис. 5, б). Влияние дня тестирования также отмечалось в обоих случаях ( $F_{(3,45)} = 7,14$ ;  $p < 0,001$  и  $F_{(3,45)} = 6,92$ ;  $p < 0,001$  соответственно). В свою очередь, на пройденный путь влияла только принадлежность животных к той или иной группе ( $F_{(1,15)} = 8,45$ ;  $p = 0,0109$ ), а эффекта дня не наблюдалось ( $F_{(3,45)} = 2,57$ ;  $p > 0,05$ ; рис. 5, в). Апостериорное сравнение показало, что животные из группы AAV-CDNF уже на второй день тестирования достоверно уменьшали расстояние до платформы по сравнению с первым днём тестирования ( $p < 0,05$ ), в то время как для контрольной группы достоверное отличие появляется только к последнему дню тестирования ( $p < 0,05$ ; рис. 5, б). Также апостериорное сравнение показало уменьшение общего пройденного пути по сравнению с первым днём тестирования только для группы AAV-CDNF ( $p < 0,05$ ), также на второй день выявляется разница по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ; рис. 5, в).

День контрольного теста (без платформы) показал, что животные всех групп провели больше времени в целевой четверти (где ранее располагалась платформа). Этот показатель статистически выше в сравнении с 25%-ной вероятностью случайного нахождения в целевом секторе, что означает устойчивое формирование пространственной памяти у всех экспериментальных животных (рис. 5, г).

Также в условиях домашней клетки был проведён тест «оперантная стенка». Сверхэкспрессия CDNF не повлияла на такие показатели, как количество тычков носом, количество съеденных гранул и общее время тычков носом (табл. 3).

Таким образом, нами впервые показано, что сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе улучшает пространственное обучение у мышей с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению. Вместе с тем CDNF не оказал влияния на ассоциативное обучение, что может указывать на различную роль CDNF в механизмах, контролирующих пространственное и ассоциативное обучение.

**Влияние сверхэкспрессии CDNF на экспрессию генов нейропластичности.** Учитывая выявленные изменения в поведении мышей,

Таблица 3. Результаты поведенческих тестов

| Параметр                                             | M ± SEM       |               | p-значение |
|------------------------------------------------------|---------------|---------------|------------|
|                                                      | AAV-EGFP      | AAV-CDNF      |            |
| Тест «оперантная стенка»                             |               |               |            |
| Количество тычков носом                              | 94,40 ± 15,47 | 54,64 ± 15,63 | 0,08       |
| Количество съеденных гранул                          | 6,00 ± 1,24   | 4,10 ± 1,12   | 0,32       |
| Общее время тычков носом (с)                         | 62,46 ± 16,35 | 41,32 ± 11,86 | 0,44       |
| Тест «открытое поле»                                 |               |               |            |
| Время, проведенное в центре арены (%)                | 3,74 ± 1,33   | 4,49 ± 1,60   | 0,72       |
| Исследованная площадь арены (%)                      | 66,26 ± 4,28  | 64,32 ± 6,56  | 0,80       |
| Пройденный путь (м)                                  | 14,27 ± 0,24  | 14,32 ± 0,57  | 0,93       |
| Количество вертикальных стоек                        | 2,67 ± 0,82   | 4,00 ± 1,33   | 0,39       |
| Количество умываний                                  | 0,50 ± 0,19   | 0,75 ± 0,16   | 0,61       |
| Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»           |               |               |            |
| Время, проведенное в открытых рукавах (%)            | 4,05 ± 0,98   | 4,35 ± 0,66   | 0,89       |
| Время, проведенное в закрытых рукавах (%)            | 87,88 ± 2,62  | 88,44 ± 1,02  | 0,86       |
| Исследованная площадь открытых рукавов (%)           | 17,56 ± 2,78  | 23,96 ± 1,32  | 0,07       |
| Исследованная площадь закрытых рукавов (%)           | 87,55 ± 0,88  | 87,67 ± 0,68  | 0,91       |
| Число свешиваний с края установки                    | 4,44 ± 1,12   | 3,88 ± 0,55   | 0,67       |
| Число выглядываний из закрытых рукавов               | 11,44 ± 1,82  | 15,43 ± 0,90  | 0,09       |
| Тест «подвешивание за хвост»                         |               |               |            |
| Время неподвижности (с)                              | 79,29 ± 8,34  | 66,29 ± 3,85  | 0,19       |
| Количество эпизодов неподвижности                    | 13,44 ± 0,80  | 14,5 ± 0,70   | 0,34       |
| Тест «принудительное плавание»                       |               |               |            |
| Мобильность (степень изменения силуэта животного), % | 11,26 ± 0,50  | 11,1 ± 0,44   | 0,83       |

мы оценили уровень экспрессии ключевых генов, связанных с процессами обучения и памяти. Результаты обобщены в табл. 4. Среди исследованных генов достоверное отличие в экспрессии было выявлено только для *Htr2a* ( $t = 2,210$ ;  $p = 0,04$ ), кодирующего серотониновый 5-HT<sub>2A</sub>-рецептор.

Известно, что CDNF может выступать в роли регулятора UPR [15], а UPR, в свою очередь, может влиять на когнитивные функции в моделях нейродегенеративных заболеваний, не только модулируя ответ на стресс ЭПР, но

и воздействуя на синаптическую пластичность [40]. Принимая во внимание вышеописанные данные и локализацию CDNF в ЭПР, мы решили сфокусироваться на экспрессии генов UPR (рис. 6).

Было обнаружено увеличение экспрессии сплайсированной формы *Xbp* (*sXbp*) (рис. 6, *д*;  $t = 2,624$ ;  $p = 0,017$ ), а также *Ire1α* (рис. 6, *е*) на уровне тенденции ( $p = 0,0616$ ). При этом отношение сплайсированной формы *Xbp* (*sXbp*) к несплайсированной (*uXbp*) отличается достоверно ( $t = 2,604$ ;  $p = 0,018$ ; рис. 6, *ж*).

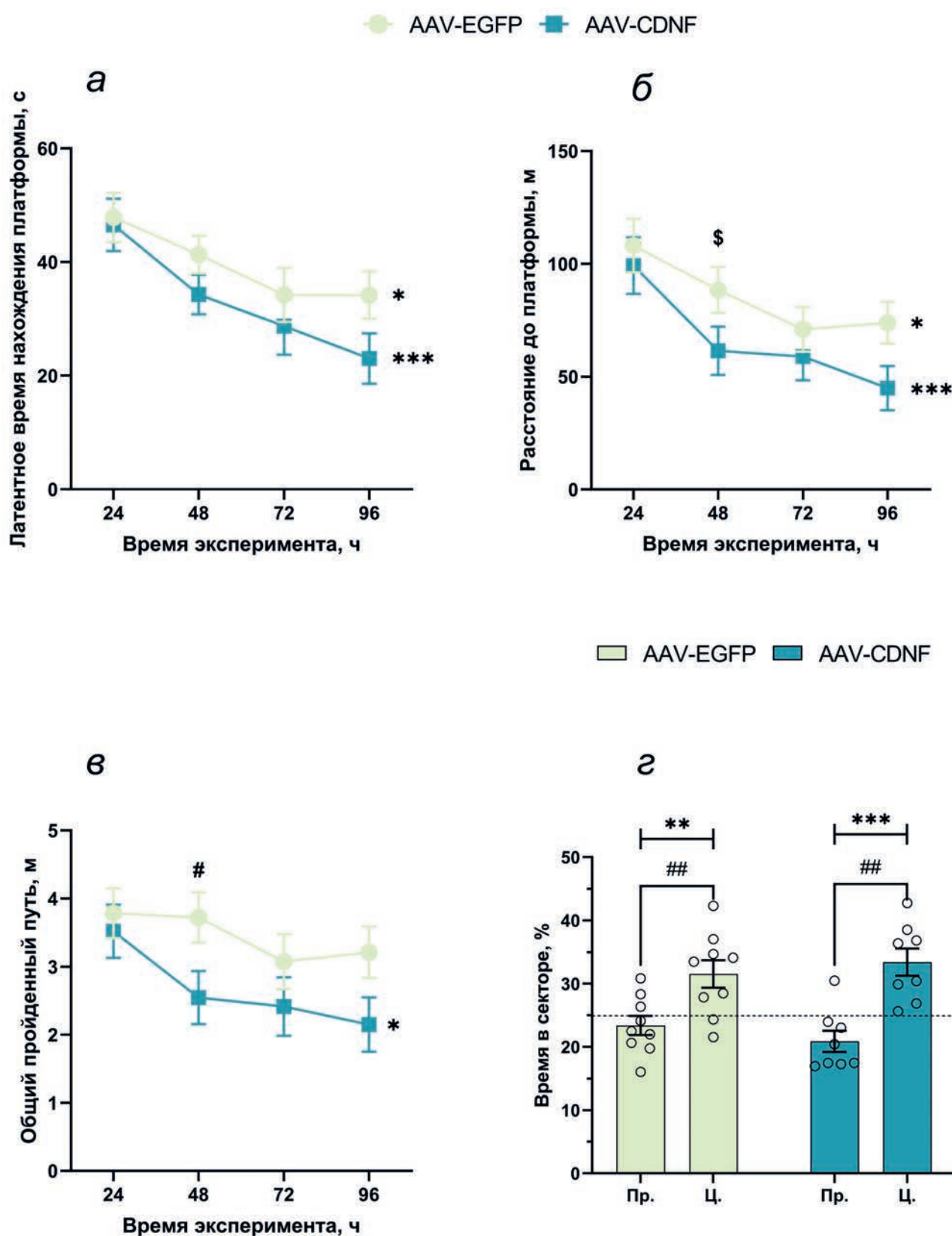


Рис. 5. Латентное время нахождения платформы (а), расстояние до платформы (б) и общий пройденный путь (в) в тесте «водный лабиринт Морриса» для животных со сверхэкспрессией CDFN и животных контрольной группы. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – по сравнению с первым днём тестирования; \$  $p < 0,05$  – для группы AAV-CDNF по сравнению с первым днём тестирования; #  $p < 0,05$  – по сравнению с контрольной группой. г – Контрольное тестирование для проверки качества формирования пространственной памяти. Время (%), проведённое в целевом секторе (Ц.): \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  – по сравнению с противоположным сектором (Пр.); ##  $p < 0,01$  – по сравнению с 25%-ной вероятностью случайного нахождения в целевом секторе (обозначено пунктирной линией)

**Таблица 4.** Профиль экспрессии генов в гиппокампе для животных со сверхэкспрессией CDNF (AAV-CDNF) и животных контрольной группы (AAV-EGFP)

| Ген           | m ± SEM              |                      | p-значение | Характеристика гена                                                                                                             |
|---------------|----------------------|----------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | AAV-EGFP             | AAV-CDNF             |            |                                                                                                                                 |
| <i>Htr1a</i>  | 119,372 ± 14,9095    | 136,9180 ± 16,0019   | 0,4329     | 1A-подтип серотониновых рецепторов                                                                                              |
| <i>Htr2a</i>  | 31,5110 ± 1,3773     | 37,6930 ± 2,4348     | 0,0403     | 2A-подтип серотониновых рецепторов                                                                                              |
| <i>Htr2b</i>  | 11,2980 ± 1,2811     | 15,5690 ± 2,8993     | 0,1903     | 2B-подтип серотониновых рецепторов                                                                                              |
| <i>Htr7</i>   | 12,6867 ± 0,4399     | 13,2297 ± 1,0833     | 0,6479     | 7-подтип серотониновых рецепторов                                                                                               |
| <i>Akt-1</i>  | 493,3750 ± 89,2579   | 425,3310 ± 42,6366   | 0,5003     | RAC-alpha serine/threonine-protein kinase — ключевой фермент PI3/Akt-сигнального пути                                           |
| <i>Arc</i>    | 33,0988 ± 6,7011     | 57,1540 ± 13,3297    | 0,1554     | activity regulated cytoskeleton associated protein — ген раннего ответа, один из главных регуляторов синаптической пластичности |
| <i>Avpr1a</i> | 0,0118 ± 0,0003      | 0,0137 ± 0,0027      | 0,4698     | 1A-рецептор аргинин-вазопрессина                                                                                                |
| <i>Bax</i>    | 10,0878 ± 1,6144     | 8,9317 ± 1,4453      | 0,8639     | BCL2 Associated X — активатор апоптоза                                                                                          |
| <i>Bcl-xl</i> | 31,3613 ± 3,2143     | 30,0603 ± 3,0493     | 0,7962     | Bcl-2-Like Protein 1 — ингибитор апоптоза                                                                                       |
| <i>Bdnf</i>   | 92,5860 ± 7,4267     | 85,8040 ± 7,2094     | 0,5206     | нейротрофический фактор мозга                                                                                                   |
| <i>c-Fos</i>  | 14,1278 ± 2,1041     | 12,4967 ± 1,8462     | 0,5958     | ген раннего ответа                                                                                                              |
| <i>Creb</i>   | 32,3000 ± 4,7879     | 33,3883 ± 2,8045     | 0,8665     | cAMP response element binding protein — транскрипционный фактор                                                                 |
| <i>Drd1</i>   | 2,6805 ± 0,2429      | 3,4728 ± 0,5516      | 0,2799     | D1-дофаминовый рецептор                                                                                                         |
| <i>Drd2</i>   | 1,5910 ± 0,2287      | 2,5990 ± 0,6282      | 0,2556     | D2-дофаминовый рецептор                                                                                                         |
| <i>Gria1</i>  | 1110,5000 ± 91,0357  | 1056,7080 ± 116,4134 | 0,7201     | глутаматный ионотропный AMPA1-рецептор (α1-субъединица)                                                                         |
| <i>Gria2</i>  | 1056,9540 ± 144,9108 | 1077,4820 ± 110,9364 | 0,5787     | глутаматный ионотропный AMPA2-рецептор (α2-субъединица)                                                                         |
| <i>Grik1</i>  | 21,0377 ± 1,1859     | 19,7733 ± 1,7413     | 0,3527     | глутаматный ионотропный каинатный рецептор (1-субъединица)                                                                      |
| <i>Grik2</i>  | 112,1920 ± 12,8476   | 110,4676 ± 8,9398    | 0,6305     | глутаматный ионотропный каинатный рецептор (β2-субъединица)                                                                     |
| <i>Grin1</i>  | 773,9467 ± 40,1829   | 766,6870 ± 75,0227   | 0,9330     | глутаматный ионотропный NMDA1-рецептор (α1-субъединица)                                                                         |
| <i>Grin2a</i> | 501,7465 ± 63,7042   | 469,2562 ± 37,8923   | 0,6664     | глутаматный ионотропный NMDA2A-рецептор (ε1-субъединица)                                                                        |
| <i>Grin2b</i> | 327,4900 ± 22,9015   | 320,2550 ± 18,8293   | 0,8100     | глутаматный ионотропный NMDA2B-рецептор (ε2-субъединица)                                                                        |
| <i>Grm1</i>   | 96,7208 ± 5,0159     | 109,4579 ± 11,9102   | 0,3374     | глутаматный метаботропный рецептор 1                                                                                            |
| <i>Grm2</i>   | 80,5865 ± 5,6277     | 79,4585 ± 5,9721     | 0,8922     | глутаматный метаботропный рецептор 2                                                                                            |



Таблица 4 (продолжение)

| Ген           | m ± SEM            |                    | p-значение | Характеристика гена                                       |
|---------------|--------------------|--------------------|------------|-----------------------------------------------------------|
|               | AAV-EGFP           | AAV-CDNF           |            |                                                           |
| <i>Grm3</i>   | 120,8930 ± 5,9356  | 132,7440 ± 11,1860 | 0,5288     | глутаматный метаботропный рецептор 3                      |
| <i>Grm4</i>   | 0,7130 ± 0,1083    | 1,0190 ± 0,2466    | 0,3930     | глутаматный метаботропный рецептор 4                      |
| <i>Grm5</i>   | 218,2150 ± 13,8453 | 227,5493 ± 18,4510 | 0,6905     | глутаматный метаботропный рецептор 5                      |
| <i>Kalrn</i>  | 194,6956 ± 5,8838  | 201,5212 ± 10,6467 | 0,5816     | калирин – киназа-активатор Rho-ГТФаз                      |
| <i>Mapk3</i>  | 1,0560 ± 0,0948    | 0,9830 ± 0,1292    | 0,3427     | митоген-активируемая протеинкиназа 3                      |
| <i>Nfxb</i>   | 9,2062 ± 1,013     | 9,5600 ± 0,8037    | 0,7958     | транскрипционный фактор                                   |
| <i>Pik3r1</i> | 53,4200 ± 3,2130   | 52,0680 ± 4,4137   | 0,8072     | регуляторная субъединица 1<br>фосфатидилинозитол-3-киназы |
| <i>Plcg1</i>  | 67,5700 ± 7,3740   | 69,980 ± 15,0900   | 0,5288     | фосфолипаза С гамма 1                                     |
| <i>rPol2</i>  | 5,4170 ± 0,9583    | 3,6736 ± 0,7517    | 0,1647     | РНК-полимераза II субъединица А                           |
| <i>Syp</i>    | 20,1800 ± 2,3135   | 23,8340 ± 2,4439   | 0,2919     | синаптофизин                                              |

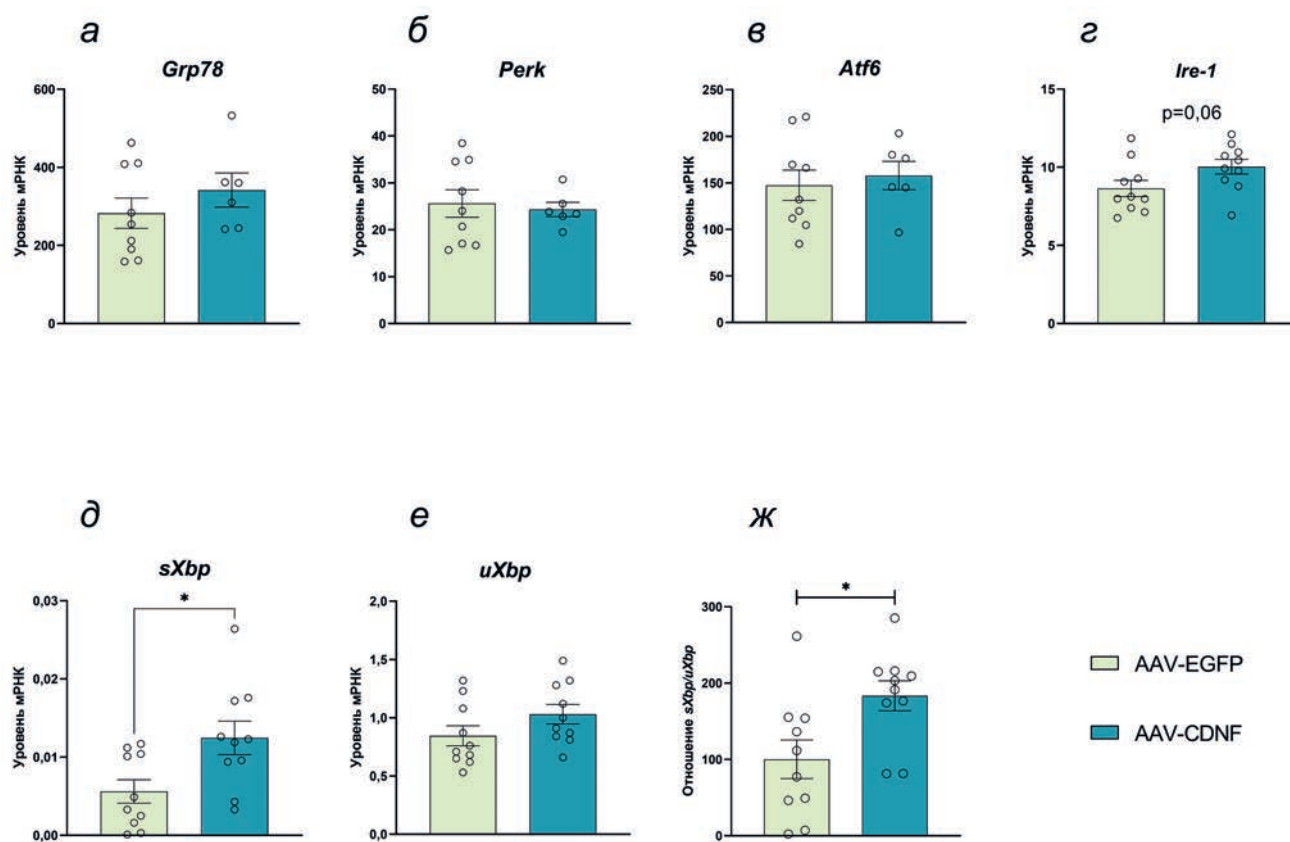
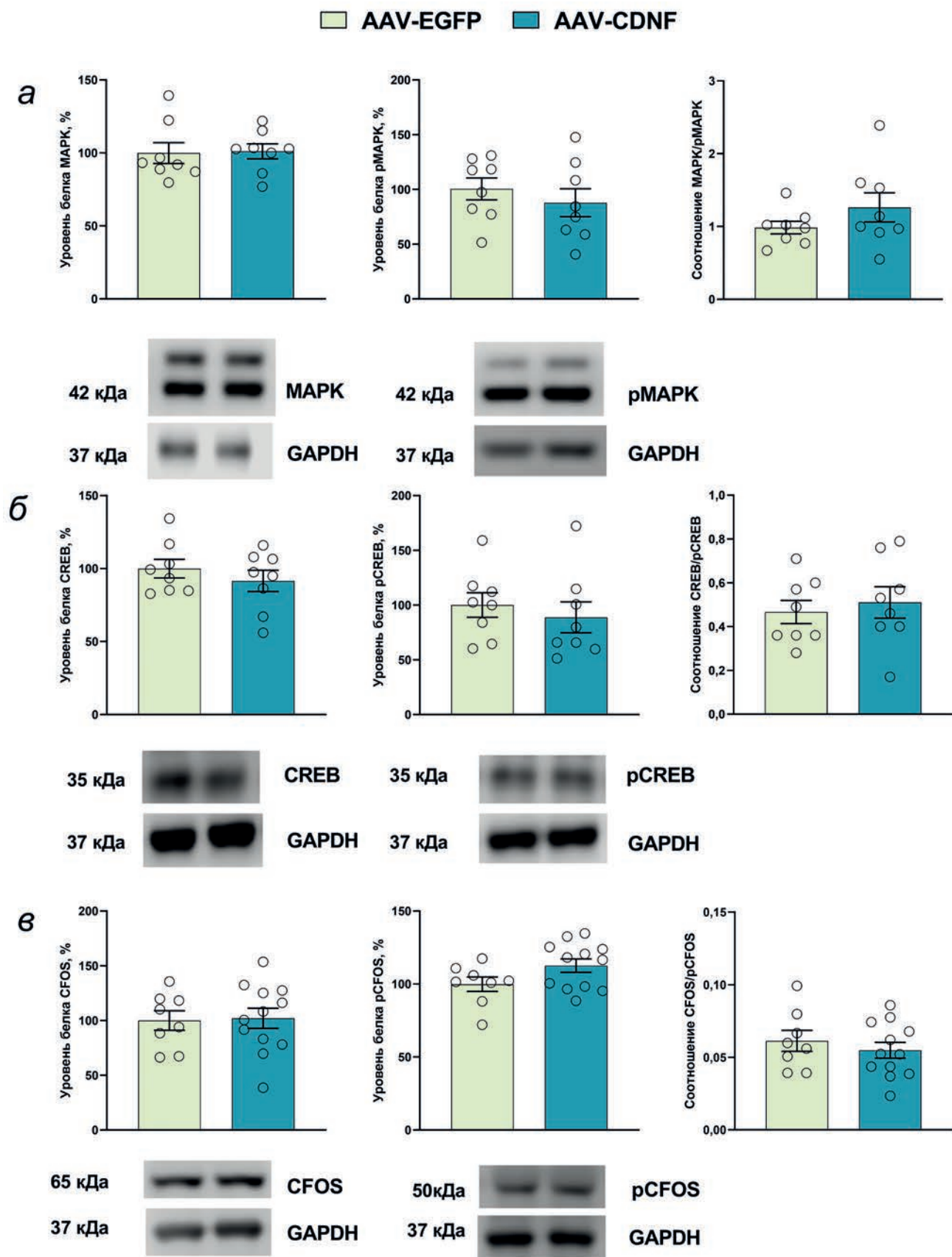


Рис. 6. Уровень экспрессии генов UPR: *Grp78* (а), *Perk* (б), *Atf6* (в), *Ire1a* (г), *sXbp* (д), *uXbp* (е) и соотношение *sXbp/uXbp* (ж). Уровень мРНК (а–г) представлен как число копий гена, отнесённое на 100 копий *rPol2*. Для панелей (д) и (е) экспрессия представлена как отношение уровней экспрессии *sXbp* и *uXbp* к уровню экспрессии *rPol2*. \* $p < 0,05$  – для CDNF относительно группы AAV-EGFP



**Рис. 7.** Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка, его фосфорилированной формы и их соотношение, а также результаты иммуноблота на мембранах для MAPK/pMAPK (а), CREB/pCREB (б) и CFOS/pCFOS (в). Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH

Ввиду того, что активность каскадов зачастую изменяется не на уровне экспрессии, а на уровне посттрансляционных модификаций, в первую очередь фосфорилирования, было решено оценить не только количество белка, но и отношение между обычной и фосфорилированной формой белков раннего ответа CREB и CFOS, а также MAP-киназы. Однако сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе не повлияла на уровень вышеперечисленных белков, фосфорилированных форм этих белков или их соотношение (рис. 7).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате данной работы было обнаружено, что сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе не влияет на двигательную активность, потребление воды, а также исследовательское и тревожно-подобное поведение. Ранее было показано, что как трансгенные мыши APP/PS1 (являются моделью болезни Альцгеймера), так и мыши дикого типа совершали больше подходов как к новым, так и к старым объектам в тесте «новый объект» после микроинъекции CDNF, то есть проявляли большую исследовательскую активность [14]. Стоит отметить, что тест «новый объект» лучше подходит для описания неophobia, а в более специфичном тесте на спонтанное исследовательское поведение обнаруженная разница не подтвердилась. Поэтому авторы приходят к выводу, что ни микроинъекция белка, ни эндогенный CDNF не вызывает побочных эффектов в виде усиления тревожности, гипо- или гиперактивности, и наши данные согласуются с этим выводом [14].

Ранее было установлено, что как фармакологическое (мусцимол) [41], так и оптогенетическое [42] ингибирование глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа нарушает консолидацию памяти о недавнем приёме пищи, сокращает время до наступления следующего приёма пищи и увеличивает его объём. Также установлено, что вентральный гиппокамп участвует в восприятии таких важных нейроэндокринных регуляторов, как лептин, грелин и глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1). Обнаруженное нами снижение потребления пищи под действием сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе подтверждает участие CDNF в регуляции пищевого поведения, однако механизм данного эффекта ещё предстоит установить.

Повышение экспрессии CDNF в гиппокампе не оказало существенного влияния на

депрессивно-подобное поведение мышей, оценённое в тестах «принудительное плавание» и «подвешивание за хвост». На этой же линии мышей в том же тесте ранее был продемонстрирован антидепрессантный эффект центрального введения рекомбинантного белка BDNF [26], однако глиальный нейротрофический фактор GDNF при центральном введении не оказал влияния на неподвижность в тесте «подвешивание за хвост» [30]. В то же время и BDNF, и GDNF оказывали значительный антидепрессантный эффект в тесте «принудительное плавание». Вероятно, CDNF не влияет на депрессивно-подобное поведение «депрессивных» мышей ASC, что отличает его от классических нейротрофических факторов BDNF и GDNF. Однако следует принимать во внимание, что в упомянутых работах мы вводили белок BDNF или GDNF системно, в желудочек мозга, тогда как в настоящем исследовании увеличение количества CDNF осуществлялось локально, только в гиппокампе.

Ранее было показано нарушение угасания памяти страха у мышей линии ASC, и было предположено, что данное нарушение может играть важную роль в формировании депрессивно-подобного фенотипа этих животных [43]. Также была показана устойчивость мышей этой линии к амнестической стимуляции [44]. Сверхэкспрессия CDNF в нейронах гиппокампа мышей ASC улучшила пространственное обучение животных. Можно предположить, что данное улучшение связано с повышенной устойчивостью памяти у мышей данной линии. Однако в работе Kemppainen et al. [14] было продемонстрировано, что индукция сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе улучшала пространственную память как у мышей линии APP/PS1, так и у мышей дикого типа. Здесь стоит отметить два момента. Во-первых, в указанном исследовании в AAV был встроен ген *CDNF* человека, а во-вторых, транскрипция осуществлялась под контролем промотора цитомегаловируса (CMV), что не позволяло достичь специфической экспрессии в нейронах. Если первое обстоятельство вряд ли играет большую роль в силу высокой консервативности CDNF среди млекопитающих, второе существенно осложняет картину. В созданной нами плазмиде экспрессия гена *Cdnf* контролируется синапсиновым промотором (Syn), обеспечивающим избирательную экспрессию целевого гена в нервных клетках. Таким образом, мы впервые показали, что именно сверхэкспрессия нейронального CDNF улучшает пространственное обучение животных. Поскольку изменилась

динамика обучения, мы можем предполагать эффект на кратковременную память, не обнаруженный в исследовании Kemppainen et al. [14]. Более того, эффект сверхэкспрессии CDNF в нейронах, вероятно, зависит от генотипа. Это поднимает важный вопрос о том, изменена ли функция CDNF при тех или иных нейропатологиях. Пока что исследование данной проблемы находится в зачаточном состоянии. Имеется лишь несколько работ, в которых попытались оценить связь полиморфизмов в гене *CDNF* с развитием БП, шизофренией или кокаиновой зависимостью [45–47].

На данном этапе мы не можем проследить всю последовательность молекулярных событий, ведущих к поведенческим изменениям, однако нам удалось выявить несколько потенциальных «ключевых игроков». Одним из них, безусловно, является транскрипционный фактор *Xbp1* (X-box binding protein-1). Наличие связи экспрессии *Cdnf* и *Xbp1*, а также увеличение образования его сплайсированной формы уже были показаны ранее на клеточной культуре в контексте изучения UPR [48]. Известно, что активная форма белка XBP1 образуется только со сплайсированного транскрипта при участии IRE1. С помощью иммуногистохимического анализа мы подтвердили, что CDNF локализуется в ЭПР, откуда прямо или опосредованно может влиять на экспрессию *Irela*. Действительно, нами была замечена сильная тенденция к увеличению экспрессии *Irela* в опытной группе. Можно предположить, что *in vivo* существуют механизмы, вовлечённые в клеточный ответ на стресс ЭПР, однако при отсутствии стресса эти же механизмы, вероятно, выполняют другие функции. В пользу этой гипотезы выступает и тот факт, что у нокаутных по *Cdnf* животных не наблюдалось изменений в базальной экспрессии генов UPR [12]. Влияние экспрессии *Xbp1* на формирование пространственной памяти и гиппокамп-зависимое обучение было показано в исследовании Martinez et al. [49]. Было установлено, что животным с кондиционным нокаутом по *Xbp1* (*XBP1<sup>Nes-/-</sup>*) требовалось больше попыток, чтобы выполнить задание в тесте гибкости памяти, а также они показывали меньший процент замираний в тесте контекстуального условно-рефлекторного пассивного избегания. Животные со сверхэкспрессией XBP1, напротив, демонстрировали улучшение во всех вышеперечисленных тестах. Основным эффектором изменений был назначен BDNF, так как имеются данные, подтверждающие его роль мастера-регулятора. Однако в нашем исследовании изменений на уровне экспрес-

сии *Bdnf* не отмечалось. Другой механизм, объясняющий изменение когнитивных функций, предполагает в качестве ключевого посредника благоприятных эффектов sXBP1 — калирин (Kal7) [50]. В нашем эксперименте подтверждений активации данного пути также не было найдено. Не исключено и существование альтернативных каскадов, вовлекающих, например, KIF17.

Несмотря на выраженный эффект сверхэкспрессии CDNF на обучение в водном лабиринте Морриса, её влияния на ассоциативное обучение обнаружено не было, что может указывать на различную роль CDNF в механизмах, контролирующих пространственное и ассоциативное обучение.

Нами установлено достоверное увеличение экспрессии 2A-подтипа серотониновых рецепторов (5-HT<sub>2A</sub>) в группе со сверхэкспрессией CDNF. Представляется маловероятным, что данное обстоятельство могло привести к столь существенному изменению динамики обучения животных в водном лабиринте Морриса. Действительно, существует целый ряд исследований на различных модельных объектах, указывающий на взаимосвязь 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов и процессов памяти [51], однако их результаты достаточно противоречивы. В целом, существующие данные показывают, что активация 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов при системной инъекции или при местной микроинфузии, по-видимому, усиливают у мышей две формы памяти, зависящей от гиппокампа: память объекта и условно-рефлекторную память страха. При этом в отношении заданий, связанных с пространственным обучением, результат, скорее, обратный. Так, при подкожной инъекции псилоцина, который является агонистом 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов, у крыс нарушалось пространственное обучение в карусельном тесте и память о нахождении платформы в водном лабиринте Морриса, но не было эффекта на консолидацию памяти [52].

Ранее высказывалось мнение, что основным свойством CDNF, которое отличает его от классических НТФ, является то, что его влияние на неповреждённые нейроны слабое или даже отсутствует [1, 53]. Однако накапливаются данные, свидетельствующие, что CDNF может не только способствовать выживанию специфической популяции нейронов в условиях угрозы, но также запускает некоторые молекулярные каскады в неповреждённом мозге, осуществляет тонкую регуляцию нормального поведения, а также вовлечён в механизмы формирования различных типов патологического поведения. В ходе нашей работы



было обнаружено, что нейрональный CDNF участвует в механизмах формирования пространственной памяти у мышей линии ASC с генетически-детерминированным депрессивно-подобным поведением. Было показано, что избыточно экспрессирующийся в гиппокампе CDNF локализуется в ЭПР и приводит к активации Ire1 $\alpha$ /Xbp1-пути, традиционно ассоциируемого со стрессом ЭПР. Таким образом, несмотря на то что CDNF активирует уникальные молекулярные каскады, что отличает его от классических нейротрофических факторов, он тем не менее обладает существенным нейротрофным потенциалом, реализуемым на уровне поведенческой пластичности.

**Вклад авторов.** Я.П. Каминская — проведение экспериментов, анализ результатов, написание текста; Т.В. Ильчибаева — создание вирусных конструкторов, визуализация; Н.В. Хоцкин — проведение экспериментов; А.С. Цыбко — концепция, проведение экспериментов, редактирование текста статьи; В.С. Науменко — редактирование текста статьи, общее руководство проектом.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00011). Содержание животных было поддержано бюджетным проектом № FWNR-2022-0023.

**Благодарности.** Исследование было осуществлено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), поддержанного Министерством науки и высшего образования России (уникальный идентификационный номер проекта: RFMEFI62119X0023).

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

**Соблюдение этических норм.** Все экспериментальные процедуры были проведены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the Eighth Edition, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council © 2020 National Academy of Sciences (USA)) и одобрены этическим комитетом ИЦиГ СО РАН (заключение № 34 от 15 июня 2016 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindholm, P., Voutilainen, M. H., Laurén, J., Peränen, J., Leppänen, V.-M., Andressoo, J.-O., Lindahl, M., Janhunen, S., Kalkkinen, N., Timmusk, T., Tuominen, R. K., and Saarma, M. (2007) Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons *in vivo*, *Nature*, **448**, 73-77, doi: 10.1038/nature05957.
2. Parkash, V., Lindholm, P., Peränen, J., Kalkkinen, N., Oksanen, E., Saarma, M., Leppänen, V.-M., and Goldman, A. (2009) The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional, *Protein Eng. Des. Sel.*, **22**, 233-241, doi: 10.1093/protein/gzn080.
3. Voutilainen, M. H., Bäck, S., Peränen, J., Lindholm, P., Raasmaja, A., Männistö, P. T., Saarma, M., and Tuominen, R. K. (2011) Chronic infusion of CDNF Prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, **228**, 99-108, doi: 10.1016/j.expneurol.2010.12.013.
4. Lindholm, D., Wootz, H., and Korhonen, L. (2006) ER stress and neurodegenerative diseases, *Cell Death Differ.*, **13**, 385-392, doi: 10.1038/sj.cdd.4401778.
5. Garea-Rodríguez, E., Eesmaa, A., Lindholm, P., Schlumbohm, C., König, J., Meller, B., Kriegstein, K., Helms, G., Saarma, M., and Fuchs, E. (2016) Comparative analysis of the effects of neurotrophic factors CDNF and GDNF in a nonhuman primate model of Parkinson's disease, *PLoS One*, **11**, e0149776, doi: 10.1371/journal.pone.0149776.
6. Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Van, D. N., Latva-Ranta, M., and Ruddock, L. (2007) A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors, *J. Cell Biol.*, **179**, 1193-1204, doi: 10.1083/jcb.200705180.
7. Lindholm, P., and Saarma, M. (2010) Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors, *Dev. Neurobiol.*, **70**, 360-371, doi: 10.1002/dneu.20760.
8. Apostolou, A., Shen, Y., Liang, Y., Luo, J., and Fang, S. (2008) Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death, *Exp. Cell Res.*, **314**, 2454-2467, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.05.001.
9. Bruhn, H. (2005) A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins, *Biochem. J.*, **389**, 249-257, doi: 10.1042/BJ20050051.
10. Mätlik, K., Yu, L., Eesmaa, A., Hellman, M., Lindholm, P., Peränen, J., Galli, E., Anttila, J., Saarma, M., Permi, P., Airavaara, M., and Arumäe, U. (2015) Role of two sequence motifs of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in its survival-promoting activity, *Cell Death Dis.*, **6**, e2032, doi: 10.1038/cddis.2015.371.
11. Božok, V., Yu, L., Palgi, J., and Arumäe, U. (2018) Antioxidative CXXC peptide motif from mesencephalic

- astrocyte-derived neurotrophic factor antagonizes programmed cell death, *Front. Cell Dev. Biol.*, **6**, 106, doi: 10.3389/fcell.2018.00106.
12. Lindahl, M., Chalazonitis, A., Palm, E., Pakarinen, E., Danilova, T., Phamb, T. D., Setlikb, W., Rao, M., Vöikar, V., Huotari, J., Kopra, J., Andressoo, J.-O., Piepponen, P. T., Airavaara, M., Panhelainen, A., Gershon, M. D., and Saarma, M. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor-deficiency leads to degeneration of enteric neurons and altered brain dopamine neuronal function in mice, *Neurobiol. Dis.*, **134**, 104696, doi: 10.1016/j.nbd.2019.104696.
  13. Chen, Y.-C. C., Baronio, D., Semenova, S., Abdurakhmanova, S., and Panula, P. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor regulates multiple neuronal subtypes and behavior, *J. Neurosci.*, **40**, 6146-6164, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2636-19.2020.
  14. Kempainen, S., Lindholm, P., Galli, E., Lahtinen, H.-M. M., Koivisto, H., Hämäläinen, E., Saarmab, M., and Tanila, H. (2015) Cerebral dopamine neurotrophic factor improves long-term memory in APP/PS1 transgenic mice modeling Alzheimer's disease as well as in wild-type mice, *Behav. Brain Res.*, **291**, 1-11, doi: 10.1016/j.bbr.2015.05.002.
  15. Voutilainen, M. H., De Lorenzo, F., Stepanova, P., Bäck, S., Yu, L.-Y., Lindholm, P., Pörsti, E., Saarma, M., Männistö, P. T., and Tuominen, R. K. (2017) Evidence for an additive neurorestorative effect of simultaneously administered CDNF and GDNF in hemiparkinsonian rats: implications for different mechanism of action, *eNeuro*, **4**, ENEURO.0117-16.2017, doi: 10.1523/ENEURO.0117-16.2017.
  16. Kesner, R. P. (2018) An analysis of dentate gyrus function (an update), *Behav. Brain Res.*, **354**, 84-91, doi: 10.1016/J.BBR.2017.07.033.
  17. Papp, G., Witter, M. P., and Treves, A. (2007) The CA3 network as a memory store for spatial representations, *Learn. Mem.*, **14**, 732-744, doi: 10.1101/LM.687407.
  18. Fredes, F., and Shigemoto, R. (2021) The role of hippocampal mossy cells in novelty detection, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **183**, 107486, doi: 10.1016/J.NLM.2021.107486.
  19. Sun, D., Mei, L., and Xiong, W. C. (2023) Dorsal dentate gyrus, a key regulator for mood and psychiatric disorders, *Biol. Psychiatry*, **93**, 1071-1080, doi: 10.1016/J.BIOPSYCH.2023.01.005.
  20. Kondaurova, E. M., Bazovkina, D. V., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2006) Selective Breeding for catalepsy changes the distribution of microsatellite D13Mit76 alleles linked to the 5-HT1A serotonin receptor gene in mice, *Genes, Brain Behav.*, **5**, 596-601, doi: 10.1111/j.1601-183X.2006.00212.x.
  21. Kulikov, A. V., Bazovkina, D. V., Kondaurova, E. M., and Popova, N. K. (2008) Genetic structure of hereditary catalepsy in mice, *Genes Brain Behav.*, **7**, 506-512, doi: 10.1111/j.1601-183X.2008.00387.x.
  22. Kulikov, A. V., Kozlachkova, E. Y., Maslova, G. B., and Popova, N. K. (1993) Inheritance of predisposition to catalepsy in mice, *Behav. Genet.*, **23**, 379-384, doi: 10.1007/BF01067439.
  23. Tikhonova, M. A., Lebedeva, V. V., Kulikov, A. V., Bazovkina, D. V., and Popova, N. K. (2006) Effect of imipramine on the behavior and cerebral 5-HT1A serotonin receptors in mice genetically predisposed to catalepsy, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **141**, 48-50, doi: 10.1007/s10517-006-0090-7.
  24. Tikhonova, M. A., Alperina, E. L., Tolstikova, T. G., Bazovkina, D. V., Di, V. Y., Idova, G. V., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2010) Effects of chronic fluoxetine treatment on catalepsy and the immune response in mice with a genetic predisposition to freezing reactions: the roles of types 1A and 2A serotonin receptors and the Tph2 and SERT genes, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **40**, 521-527, doi: 10.1007/s11055-010-9291-7.
  25. Базовкина Д. В., Куликов А. В., Кондаурова Е. М., Попова Н. К. (2005) Селекция на предрасположенность к каталепсии усиливает депрессивно-подобные характеристики поведения у мышей, *Генетика*, **41**, 1222-1228.
  26. Naumenko, V. S., Kondaurova, E. M., Bazovkina, D. V., Tsybko, A. S., Tikhonova, M. A., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2012) Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains, *Neuroscience*, **214**, 59-67, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.031.
  27. Björkholm, C., and Monteggia, L. M. (2016) BDNF – a key transducer of antidepressant effects, *Neuropharmacology*, **102**, 72-79, doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.034.
  28. Caviedes, A., Lafourcade, C., Soto, C., and Wyneken, U. (2017) BDNF/NF-KB signaling in the neurobiology of depression, *Curr. Pharm. Des.*, **23**, 3154-3163, doi: 10.2174/138161282366617011141915.
  29. Mondal, A. C., and Fatima, M. (2019) Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: role of antidepressants treatment, *Int. J. Neurosci.*, **129**, 283-296, doi: 10.1080/00207454.2018.1527328.
  30. Naumenko, V. S., Bazovkina, D. V., Semenova, A. A., Tsybko, A. S., Il'chibaeva, T. V., Kondaurova, E. M., and Popova, N. K. (2013) Effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in mouse strains genetically predisposed to behavioral disorders, *J. Neurosci. Res.*, **91**, 1628-1638, doi: 10.1002/jnr.23286.
  31. Chen, S.-H., Haam, J., Walker, M., Scappini, E., Naughton, J., and Martin, N. P. (2019) Recombinant viral vectors as neuroscience tools, *Curr. Protoc. Neurosci.*, **87**, e67, doi: 10.1002/cpns.67.
  32. Kondaurova, E. M., Plyusnina, A. V., Ilchibaeva, T. V., Eremin, D. V., Rodnyy, A. Y., Grygoreva, Y. D.,

- and Naumenko, V. S. (2021) Effects of a Cc2d1a/Freud-1 knockdown in the hippocampus on behavior, the serotonin system, and BDNF, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13319, doi: 10.3390/ijms222413319.
33. Kondaurova, E. M., Belokopytova, I. I., Kulikova, E. A., Khotskin, N. V., Ilchibaeva, T. V., Tsybko, A. S., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2023) On the role of serotonin 5-HT(1A) receptor in autistic-like behavior: cross talk of 5-HT and BDNF systems, *Behav. Brain Res.*, **438**, 114168, doi: 10.1016/j.bbr.2022.114168.
  34. Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., Voronova, I. P., Tikhonova, M. A., and Popova, N. K. (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor MRNAs using genomic DNA as an external standard, *J. Neurosci. Methods*, **141**, 97-101, doi: 10.1016/J.JNEUMETH.2004.06.005.
  35. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT1A receptor gene expression in the brain, *Mol. Biol.*, **40**, 30-36, doi: 10.1134/S0026893306010067/METRICS.
  36. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and Kulikov, A. V. (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 197-203, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.008.
  37. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., and Kulikov, V. A. (2008) Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 345-351, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024.
  38. Khotskin, N. V., Plyusnina, A. V., Kulikova, E. A., Bazhenova, E. Y., Fursenko, D. V., Sorokin, I. E., Kolotygin, I., Mormedec, P., Tereninac, E. E., Sheveleva, O. B., and Kulikov, A. V. (2019) On association of the lethal yellow (AY) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior, *Behav. Brain Res.*, **359**, 446-456, doi: 10.1016/j.bbr.2018.11.013.
  39. Kulikov, A. V., Morozova, M. V., Kulikov, V. A., Kirichuk, V. S., and Popova, N. K. (2010) Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test, *J. Neurosci. Methods*, **191**, 26-31, doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.06.002.
  40. Hetz, C., and Saxena, S. (2017) ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration, *Nat. Rev. Neurol.*, **13**, 477-491, doi: 10.1038/nrneurol.2017.99.
  41. Henderson, Y. O., Smith, G. P., and Parent, M. B. (2013) Hippocampal neurons inhibit meal onset, *Hippocampus*, **23**, 100-107, doi: 10.1002/hipo.22062.
  42. Hannapel, R., Ramesh, J., Ross, A., Lalumiere, R. T., Roseberry, A. G., and Parent, M. B. (2019) Postmeal optogenetic inhibition of dorsal or ventral hippocampal pyramidal neurons increases future intake, *eNeuro*, **6**, 457-475, doi: 10.1523/ENEURO.0457-18.2018.
  43. Dubrovina, N. I., Zinov'ev, D. R., Zinov'eva, D. V., and Kulikov, A. V. (2009) Learning and extinction of a passive avoidance response in mice with high levels of predisposition to catalepsy, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **39**, 475-480, doi: 10.1007/s11055-009-9152-4.
  44. Sinovyev, D. R., Dubrovina, N. I., and Kulikov, A. V. (2009) Development of amnesia in different mouse strains, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **147**, 557-559, doi: 10.1007/S10517-009-0583-2.
  45. Lohoff, F. W., Bloch, P. J., Ferraro, T. N., Berrettini, W. H., Pettinati, H. M., Dackis, C. A., O'Brien, C. P., Kampman, K. M., and Oslin, D. W. (2009) Association analysis between polymorphisms in the conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and cocaine dependence, *Neurosci. Lett.*, **453**, 199-203, doi: 10.1016/j.neulet.2009.02.026.
  46. Choi, J. M., Hong, J. H., Chae, M. J., Hung, N. P., Kang, H. S., Ma, H.-I., and Kim, Y. J. (2011) Analysis of mutations and the association between polymorphisms in the cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.*, **493**, 97-101, doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.013.
  47. Yang, Y., Yu, H., Li, W., Liu, B., Zhang, H., Ding, S., Lu, Y., Jiang, T., and Lv, L. (2018) Association between cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) 2 polymorphisms and schizophrenia susceptibility and symptoms in the han chinese population, *Behav. Brain Funct.*, **14**, 1, doi: 10.1186/s12993-017-0133-4.
  48. Arancibia, D., Zamorano, P., and Andrés, M. E. (2018) CDNF Induces the adaptive unfolded protein response and attenuates endoplasmic reticulum stress-induced cell death, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1865**, 1579-1589, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.08.012.
  49. Martínez, G., Vidal, R. L., Mardones, P., Serrano, F. G., Ardiles, A. O., Wirth, C., Valdés, P., Thielen, P., Schneider, B. L., Kerr, B., Valdés, J. L., Palacios, A. G., Inestrosa, N. C., Glimcher, L. H., and Hetz, C. (2016) Regulation of memory formation by the transcription factor XBP1, *Cell Rep.*, **14**, 1382-1394, doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.028.
  50. Cissé, M., Duplan, E., Lorivel, T., Dunys, J., Bauer, C., Meckler, X., Gerakis, Y., Lauritzen, I., and Checler, F. (2017) The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the kalirin-7 pathway in Alzheimer model, *Mol. Psychiatry*, **22**, 1562-1575, doi: 10.1038/mp.2016.152.
  51. Zhang, G., and Stackman, R. W. (2015) The role of serotonin 5-HT2A receptors in memory and cognition, *Front. Pharmacol.*, **6**, 225, doi: 10.3389/fphar.2015.00225.
  52. Rambousek, L., Palenicek, T., Vales, K., and Stuchlik, A. (2014) The effect of psilocin on memory acquisition, retrieval, and consolidation in the rat, *Front. Behav. Neurosci.*, **8**, 1-7, 180, doi: 10.3389/fnbeh.2014.00180.
  53. Lindholm, P., and Saarma, M. (2022) Cerebral dopamine neurotrophic factor protects and repairs dopamine neurons by novel mechanism, *Mol. Psychiatry*, **27**, 1310-1321, doi: 10.1038/s41380-021-01394-6.

## THE EFFECT OF HIPPOCAMPAL OVEREXPRESSION OF DOPAMINE NEUROTROPHIC FACTOR (CDNF) ON THE BEHAVIOR OF MICE WITH GENETIC PREDISPOSITION TO DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR

Y. P. Kaminskaya, T. V. Ilchibaeva, N. V. Khotskin, V. S. Naumenko, and A. S. Tsybko\*

*Federal research center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: antoncybko@mail.ru*

Cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) is the promising tool for treatment of Parkinson's disease. However, its role in the regulation of non-motor behavior, including various psychopathologies, remains unclear. In this regard, the aim of present work was to study the effect of CDNF overexpression in the hippocampus on the behavior of ASC mice (Antidepressant Sensitive Cataleptics) with a genetic predisposition to depression-like behavior. CDNF overexpression in mouse hippocampal neurons was induced using an adeno-associated viral vector. Four weeks after stereotaxic injection of the AAV-CDNF construct into the dorsal hippocampus, home cage behavior, exploratory, anxiety and depressive-like behaviors, as well as spatial and associative learning were assessed. We found significant improvements in the dynamics of spatial learning in the Morris water maze in CDNF-overexpressing animals. At the same time, no effect of CDNF was found on other studied behaviors. The behavior of the experimental animals in the home cage conditions did not differ from that in the control group, except for a decrease in the total amount of food eaten and a slight increase in the number of sleep episodes in the light phase of the day. In the present study we also attempted to determine the molecular basis for the above mentioned changes by genes expression assessment. We did not find significant changes in the mRNA level of key kinases, genes involved in neuroplasticity and neuronal survival as well as genes encoding receptors for the main neurotransmitter systems. However, animals overexpressing CDNF show increased level of spliced Xbp indicating activation of the Ire1 $\alpha$ /Xbp1 pathway traditionally associated with ER stress. Immunohistochemical analysis showed that CDNF was co-localized with the ER marker calreticulin. Thus, the effects of endogenous CDNF on behavior that we have found may be mediated by a specific molecular cascade, which emphasizes its difference from classical neurotrophic factors.

**Keywords:** neurotrophic factors, cerebral dopamine neurotrophic factor CDNF, depressive-like behavior, learning, ER stress, unfolded protein response UPR



## SkQ1 УЛУЧШАЕТ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА И НОРМАЛИЗУЕТ АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ И NADPH-ГЕНЕРИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ АДЬЮВАНТ-ИНДУЦИРОВАННОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ У КРЫС

© 2023 Е.Д. Крыльский\*, Т.Н. Попова, Д.А. Жаглин,  
Г.А. Разуваев, С.А. Олейник

*Воронежский государственный университет,  
394018 Воронеж, Россия; электронная почта: evgenij.krylsky@yandex.ru*

Поступила в редакцию 20.04.2023

После доработки 08.07.2023

Принята к публикации 08.07.2023

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой тяжёлое системное аутоиммунное заболевание воспалительного характера. Окислительный стресс и чрезмерное формирование митохондриальных активных форм кислорода (АФК) рассматриваются в настоящее время в качестве центральных патогенетических механизмов деструкции компонентов соединительной ткани и факторов, поддерживающих высокую активность воспалительного процесса и аутоиммунного ответа. Целью настоящей работы стала оценка воздействия митохондриально-направленного антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1) на показатели иммунного статуса, интенсивность свободнорадикального окисления и функционирование компонентов антиоксидантной системы (АОС) и NADPH-генерирующих ферментов у крыс с адьювант-индуцированным РА. Лабораторные животные были разделены на 4 группы: контрольную группу; группу животных с РА; животных, которым с 7 дня развития РА внутривенно вводили SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг каждые 24 ч в течение последующих 8 дней; животных, получавших по вышеуказанной схеме SkQ1 в дозе 625 нмоль/кг. Материал для исследования забирали на 15 день после начала эксперимента. У крыс определяли скорость оседания эритроцитов, уровень ревматоидного фактора и циркулирующих иммунных комплексов, а также концентрацию иммуноглобулинов классов А, М и G с помощью иммуноферментного метода. Интенсивность свободнорадикального окисления оценивали на основании параметров железоиндуцированной биохемилюминесценции, содержания диеновых конъюгатов и активности аконитатгидратазы. Активность ферментов и содержание метаболитов в тканях животных анализировали спектрофотометрически. Результаты работы показали, что развитие РА было сопряжено с возрастанием показателей иммунного ответа и интенсивности свободнорадикального окисления. Наблюдалось также развитие дисбаланса в функционировании АОС и возрастание активности NADPH-генерирующих ферментов. Введение SkQ1 приводило к дозозависимому изменению показателей окислительного статуса в направлении контроля, что сопровождалось нормализацией параметров иммунного статуса. По-видимому, посредством снижения уровня митохондриальных АФК тестируемое соединение тормозило активизацию воспалительного ответа и последующую генерацию свободных радикалов иммунокомпетентными клетками, обуславливая развитие в тканях окислительного стресса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний, ревматоидный артрит, окислительный стресс, иммунный статус, иммуноглобулины, антиоксидантная система.

**DOI:** 10.31857/S0320972523080043, **EDN:** IJABG

Принятые сокращения: АГ – аконитатгидратаза; АОС – антиоксидантная система; АФК – активные формы кислорода; Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; ГП – глутатионпероксидаза; ГР – глутатионредуктаза; ГТ – глутатионтрансфераза; ДК – диеновые конъюгаты; ПОЛ – перекисное окисление липидов; РА – ревматоидный артрит; СОД – супероксиддисмутаза; ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы; GSH – восстановленный глутатион; Ig – иммуноглобулины; I<sub>max</sub> – интенсивность максимальной вспышки хемилюминесценции; NADP-ИДГ – NADP-зависимая изоцитратдегидрогеназа; RF – ревматоидный фактор; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний; tgα<sub>2</sub> – тангенс угла наклона касательной к кривой хода хемилюминесценции.

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой системную аутоиммунную патологию, связанную с хроническим воспалительным процессом и поражающую как суставы, так и внесуставные ткани. Патфизиологические механизмы РА до конца не выяснены. Наличие генетической предрасположенности в совокупности с внешними факторами риска может привести к модификации путём цитруллинирования собственных белков-антигенов, включая иммуноглобулины (Ig) G, коллаген 2 типа и виментин. Образующиеся в ходе этого процесса аутоантигены поглощаются антигенпрезентирующими клетками, которые впоследствии активируют иммунный ответ. В-Клетки подвергаются соматической рекомбинации, начинают пролиферировать и дифференцироваться в плазматические клетки, которые вырабатывают аутоантитела, такие как ревматоидный фактор (RF) [1].

Окислительный стресс играет важную роль в иницировании и поддержании патогенетических механизмов РА. В физиологических условиях производство и нейтрализация активных форм кислорода (АФК) должны поддерживаться в динамическом балансе, поскольку данные агенты, помимо прочего, являются ключевыми компонентами защиты против патогенов. В патологических условиях АФК, с большой интенсивностью вырабатываемые суставными нейтрофилами, моноцитами и макрофагами, способны повреждать различные клеточные структуры, включая ДНК, углеводы, белки и липиды, способствуя возникновению окислительного стресса. АФК являются также активаторами ядерного фактора  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), ответственного за транскрипцию генов, участвующих в реализации воспалительного ответа [2]. Кроме этого, АФК напрямую или косвенно, путём активации матриксных металлопротеиназ, повреждают внеклеточный матрикс [3].

Важную роль в различных патологических состояниях, включая РА, играет перекисное окисление липидов (ПОЛ). В результате ПОЛ из полиненасыщенных жирных кислот образуются пероксильные радикалы, что сопряжено с повреждением клеточных мембран. Более того, ПОЛ липопротеинов низкой плотности способствует усилению воспалительного ответа посредством повышения уровня хемокинов, молекул адгезии и конечных продуктов гликирования [3, 4]. Имеющиеся исследования демонстрируют, что уровень ПОЛ статистически значимо выше у пациентов с РА по

сравнению с контролем. Кроме того, маркеры ПОЛ значительно коррелируют с активностью заболевания [5].

Помимо суставных проявлений, при РА наблюдается повреждение других органов и тканей. В частности, кардиоваскулярная патология на фоне РА развивается вследствие избыточной секреции в кровь провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками, индукции окислительного стресса, аномального иммунного ответа. Показано, что уровень провоспалительных цитокинов и белков острой фазы воспаления напрямую связан с тяжестью коронарной болезни сердца и риском атеротромбоза. У пациентов с РА также повышен риск развития сердечной недостаточности [6].

Вопрос о существовании печёночных проявлений РА в настоящее время является дискуссионным. Тем не менее существует мнение, что печёночные патологии сопровождают до 74% случаев РА. Препараты, используемые для лечения РА, могут оказывать гепатотоксическое действие. Лекарственное поражение печени особенно часто встречается при РА во время лечения нестероидными противовоспалительными препаратами и метотрексатом [7].

Ряд исследований показал, что окислительный стресс связан с возникновением мышечной слабости при РА. Как известно, мышечная ткань богата митохондриями, которые рассматриваются в качестве одного из основных источников АФК. Доказано, что митохондриальная дисфункция, заключающаяся в изменении экспрессии ряда митохондриальных генов, а также в изменении размера и формы митохондрий из биоптатов скелетных мышц пациентов, коррелирует с тяжестью РА [8].

Как известно, длительное воздействие АФК приводит к повреждению митохондриальной ДНК (мтДНК), изменению митохондриальной функции, апоптозу и остановке роста клеток. Повышенное содержание внеклеточной мтДНК в плазме крови и синовиальной жидкости больных РА свидетельствует о взаимосвязи воспалительного артрита и степени повреждения мтДНК [9–11]. Повреждённые митохондрии могут также вызывать иммунный ответ и активизацию воспаления. Окисленные компоненты митохондрий, такие как мтДНК, белки и липиды, накапливаются в воспалённых ревматоидных суставах и способствуют выработке аутоантител и аутоиммунному ответу, который, в свою очередь, усиливает окислительный стресс [12].

Антиоксидантная защитная система предотвращает окислительное повреждение клеток и тканей и включает такие ферменты,

как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза (ГП), глутатионредуктаза (ГР) и глутатионтрансфераза (ГТ), и неферментативные компоненты. Основным неферментативным антиоксидантом является L-глутамил-цистеинилглицин, или восстановленный глутатион (GSH). Проведённые исследования показывают, что развитие дисбаланса и нарушения в работе системы антиоксидантной защиты играют важнейшую роль в патогенезе РА [3, 13–15].

В настоящее время актуален поиск способов митохондриально-направленных воздействий, способных тормозить развитие метаболических нарушений в тканях суставных компонентов. В частности, было показано, что использование полимерных мицелл позволяет осуществить доставку берберина в митохондрии фибробластов. При исследовании *in vivo* эффективности данной системы доставки берберина было продемонстрировано, что у крыс с адьювант-индуцированным артритом наблюдалось значительное уменьшение отёка конечности, подавление выработки цитокинов и снижение степени повреждения костей [16]. Имеются также данные о том, что уролитин А нормализует митофагию и митохондриальное дыхание в первичных хондроцитах из суставов здоровых доноров и пациентов с остеоартритом [17]. Уролитин А, помимо этого, тормозил прогрессирование патологии при моделировании остеоартрита у мышей, что было связано с его позитивным воздействием на функционирование митохондрий [17].

В отношении РА интерес представляет исследование протекторных свойств 10-(6'-платохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1), являющегося действующим веществом препарата «Визомитин» (применяется в качестве глазных капель при синдроме сухого глаза и начальных стадиях катаракты, в основе патогенеза которых лежит окислительный стресс) [18]. SkQ1 активно проникает через клеточную мембрану и накапливается в матриксе митохондрий. Важно отметить, что SkQ1 является восстанавливаемым антиоксидантом многоразового действия, поскольку после окисления АФК SkQ1 восстанавливается в исходное, активное состояние за счёт электрон-транспортной цепи митохондрий [19]. Таким образом, применение SkQ1 обуславливает уменьшение повреждений, вызванных митохондриальными АФК [20]. Ранее были получены первые результаты, указывающие на перспективность применения SkQ1 на модели РА [21].

Таким образом, целью настоящей работы стал анализ воздействия SkQ1 на состояние

иммунного статуса, а также показатели интенсивности свободнорадикального окисления и функционирования антиоксидантной системы (АОС) в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс с адьювант-индуцированным РА.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс Wistar массой 180–200 г (питомник «КролИнфо», Россия), содержащихся при температуре 20–25 °С, 12-часовом световом дне и доступе к воде и корму (4RF21 для мышей и крыс на короткий и средний периоды, «Фармбиолайн», Россия) *ad libitum*. Работа выполнялась с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Животные были разделены на 4 экспериментальные группы: первая группа животных (контроль,  $n = 12$ ) не подвергалась воздействиям; вторая группа (РА,  $n = 12$ ) – животные, которым индуцировали экспериментальный РА путём подкожного введения в подушечку лапки полного адьюванта Фрейнда («Thermo Fisher Scientific», США), содержащего 0,5 мг/мл убитых микобактерий, в объёме 100 мкл [22]; третья группа (РА + SkQ1 1250,  $n = 12$ ) – животные, которым с 7 дня развития РА внутрибрюшинно вводили SkQ1 в 0,9%-ном хлориде натрия в дозе 1250 нмоль/кг каждые 24 ч в течение последующих 8 дней; животные четвертой группы (РА + SkQ1 625,  $n = 12$ ) по вышеуказанной схеме получали SkQ1 в дозе 625 нмоль/кг. На 15 день эксперимента животных наркотизировали хлороформом и забирали кровь из сердца в пробирки, ополоснутые 0,9%-ным раствором хлорида натрия. После свёртывания кровь центрифугировали при 2500 g для получения сыворотки. Участок икроножной мышцы воспалённой конечности, а также печень и сердце крыс извлекали в ёмкость с ледяным физиологическим раствором, промывали и немедленно приступали к приготовлению гомогената. При получении гомогената навеску тканей крысы гомогенизировали в охлаждённой среде выделения (0,05 М Tris-HCl буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 2 мМ β-меркаптоэтанола) и центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин. Полученный супернатант и сыворотку крови незамедлительно использовали для проведения исследований.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) крови крыс определяли по методу Панченкова [23].



Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом преципитации с полиэтиленгликолем с молекулярным весом 6000 единиц («Serva», Германия) с последующим измерением оптической плотности. Содержание Ig класса A (IgA), M (IgM) и G (IgG) определяли иммуноферментным методом с использованием диагностических наборов Cusabio® ELISA kits («Cusabio», Китай). Для отмывки планшетов использовали промыточное устройство Stat Fax 2600 («Awareness Technology», США), результаты регистрировали с помощью ИФА-фотометра Stat Fax 4300 Chromate («Awareness Technology»). Уровень RF в сыворотке крови крыс определяли с помощью набора Rheumatoid factor FS («Diagnostic systems», Германия).

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления и общую антиоксидантную активность в образце измеряли методом биохемилюминесценции, индуцированной пероксидом водорода с сульфатом железа [24]. Кинетическую кривую биохемилюминесценции регистрировали в течение 30 с, используя биохемилюминометр БХЛ-07 («Medozons», Россия), и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S) и интенсивность максимальной вспышки ( $I_{\max}$ ), которые характеризуют активность протекания свободнорадикальных процессов в образце, а также величину тангенса угла наклона касательной к кривой хода хемилюминесценции ( $\text{tg}\alpha_2$ ), отражающую общую антиоксидантную активность. Реакционная среда содержала 0,4 мл 0,02 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,5), 0,4 мл 0,01 мМ  $\text{FeSO}_4$  и 0,2 мл 2%-ного раствора пероксида водорода (v/v), вносимого непосредственно перед измерением. Исследуемый материал добавляли в объеме 0,1 мл до внесения пероксида водорода. Для анализа концентрации диеновых конъюгатов (ДК) к исследуемому образцу добавляли гептан и изопропанол, перемешивали и осаждали центрифугированием при 3000 g. Гептановую фазу супернатанта разбавляли этанолом и анализировали спектрофотометрически при 233 нм [25].

Активность исследуемых ферментов определяли на спектрофотометре U-1900 («Hitachi», Япония). Активность СОД определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзиматической системе феназинметасульфата и NADH [26]. Среда спектрофотометрирования включала следующие компоненты: 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,8), 0,33 мМ ЭДТА, 0,41 мМ нитросинего тетразолия, 0,01 мМ феназинметасульфата, 0,8 мМ NADH. Исследуемый образец вноси-

ли в количестве 0,03 мл на 1 мл среды инкубации. Реакцию инициировали добавлением NADH и регистрировали прирост оптической плотности за 5 мин при длине волны 540 нм. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-ного ингибирования восстановления нитросинего тетразолия. Активность каталазы определяли при длине волны 410 нм с использованием следующих реактивов: буферно-субстратная смесь, содержащая 10 мл Tris-HCl буфера (pH 7,4) и 30 мл 0,08%-ного (v/v) пероксида водорода; 4,5%-ный раствор аммония молибденовокислого [27]. Активность аконитатгидратазы (АГ) оценивали в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 7,8), содержащем 4 мМ цитрата натрия («PanReac», Испания). Измерение активности ГП проводили в среде для спектрофотометрии: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ NADPH («AppliChem», Германия), 0,85 мМ GSH («AppliChem»), 0,37 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1 Ед./мл ГР («Sigma-Aldrich», США) [28]. Активность ГР оценивали в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH («AppliChem») и 0,8 мМ окисленного глутатиона («AppliChem») [29]. Активность ГТ измеряли в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензола («Sigma-Aldrich»), 5 мМ GSH («AppliChem») [30]. Концентрацию GSH определяли с помощью реактива Элмана [31]. Концентрацию цитрата оценивали по методу Нательсона [32]. Активность NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы (NADP-ИДГ) измеряли в среде для спектрофотометрии, состоящей из 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,8), 1,5 мМ изоцитрата, 2 мМ  $\text{MnCl}_2$ , 0,4 мМ NADP. Среда спектрофотометрирования для оценки активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) представляла собой 50 мМ Tris-HCl буфер (pH 7,8), содержащий 3,2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ NADP, 1,0 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Для определения содержания белка использовали биуретовый метод. Активность ферментов представлена в виде ферментативных единиц (Е)/мл сыворотки крови, Е/г сырой массы ткани и Е/мг белка.

Результаты анализировали с помощью программы SPSS Statistics 23.0 с использованием одновыборочного критерия Колмогорова—Смирнова для оценки нормальности распределения значений переменных. Значения показателей в группах сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа или критерия Краскела—Уоллиса. *t*-Критерий Стьюдента или критерий Манна—Уитни



использовали для попарных сравнений. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

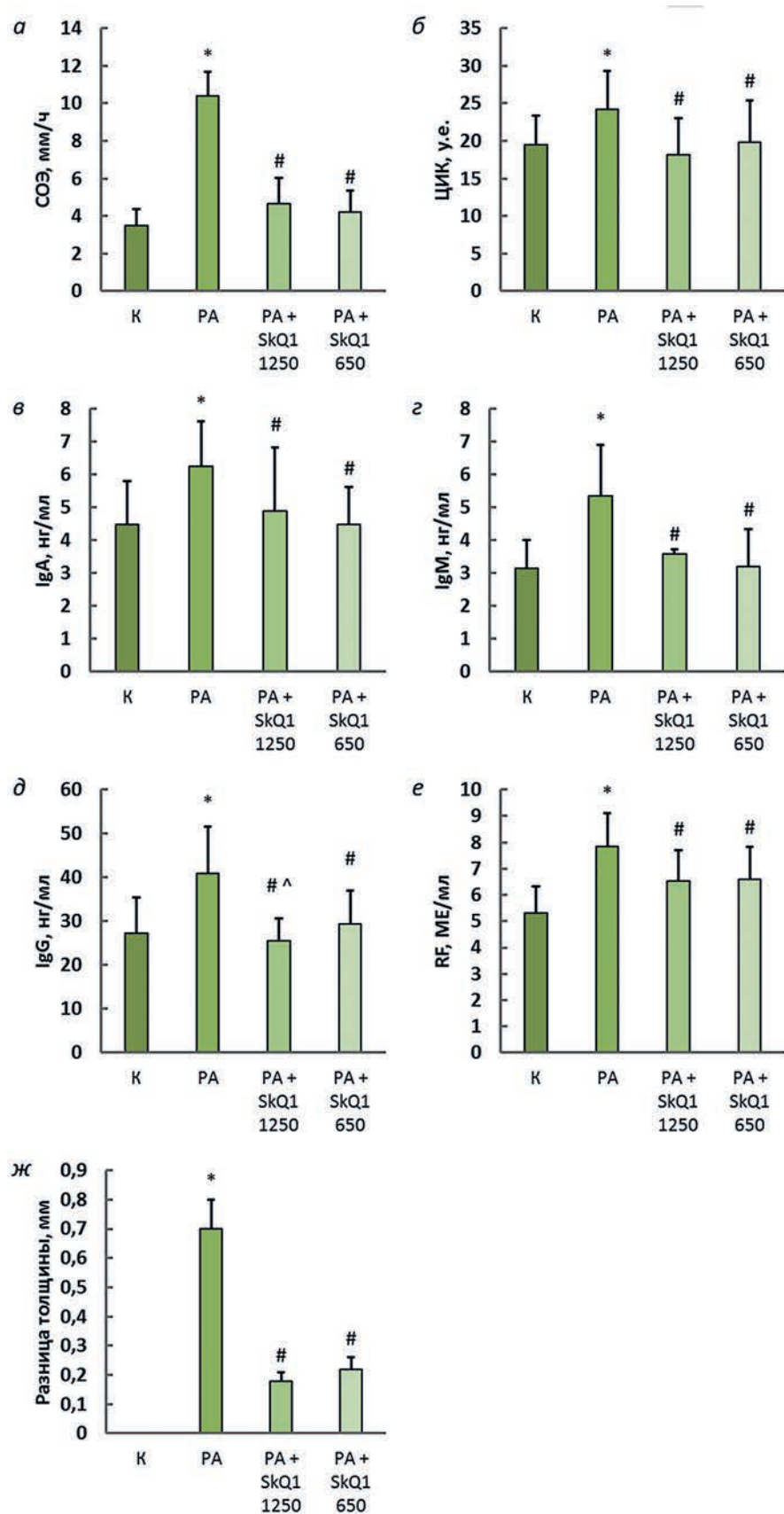
**SkQ1 способствует нормализации показателей иммунного статуса при экспериментальном РА у крыс.** Результаты проведенной работы показали, что введение SkQ1 крысам с РА способствовало уменьшению СОЭ, уровня ЦИК и RF, а также концентрации IgA, IgM и IgG в сыворотке крови (рис. 1). При этом дозозависимый эффект SkQ1 прослеживался только по отношению к содержанию IgG. Так, введение животным с патологией тестируемого соединения в дозах 1250 и 625 нмоль/кг приводило к снижению данного параметра в 1,6 и 1,4 раза соответственно. Показатели уровня ЦИК, RF, концентрации IgA и IgM приближались к аналогичным значениям для контрольной группы при использовании обеих дозировок SkQ1. Помимо этого, у животных, получавших на фоне РА SkQ1, регистрировалось менее выраженное увеличение толщины воспаленной конечности, в которую вводили полный адъювант Фрейнда (см. рис. 1).

**SkQ1 снижает показатели интенсивности свободнорадикального окисления при индуцированном РА.** Важным фактором развития воспаления при РА является окислительный стресс. Результаты работы показали, что моделирование РА у крыс сопровождалось возрастанием интенсивности свободнорадикального окисления в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах (рис. 2, табл. 1). Введение SkQ1 животным с патологией приводило к изменению параметров биохемилюминесценции, концентрации ДК, активности АГ и содержания цитрата в направлении значений контрольной группы. На ряд анализируемых параметров более выраженное действие тестируемое соединение оказывало в дозе 1250 нмоль/кг. В частности, в сыворотке крови  $I_{\max}$  под действием SkQ1 в дозировке 1250 нмоль/кг снижалась на 36% по сравнению со значениями для группы с РА. Использование соединения в дозе 625 нмоль/кг, в отличие от большей дозировки, не оказывало значительного влияния на параметр S в сыворотке животных с патологией.  $tg\alpha_2$  снижался на 42 и 27% в сыворотке крови и мышцах в группе животных РА + SkQ1 1250 соответственно, что было более существенно, чем в группе РА + SkQ1 625. Использование протектора в большей дозировке также приводило

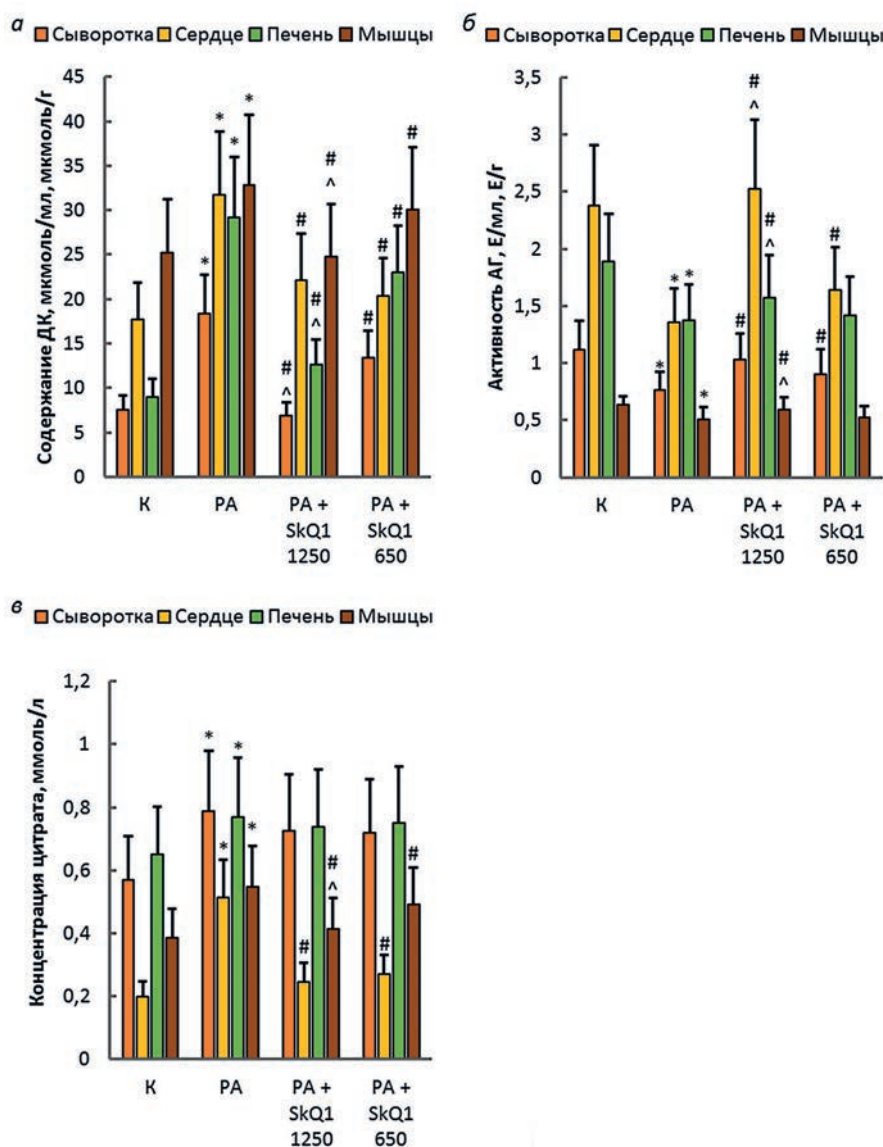
**Таблица 1.** Показатели биохемилюминесценции при РА у крыс и введении SkQ1

| Показатели                 | Группы животных |               |                |               |
|----------------------------|-----------------|---------------|----------------|---------------|
|                            | Контроль        | РА            | РА + SkQ1 1250 | РА + SkQ1 650 |
| $I_{\max}$ , сыворотка, мВ | 68,5 ± 15,1     | 102,5 ± 23,0* | 65,6 ± 14,2#^  | 97,5 ± 21,8#  |
| $I_{\max}$ , сердце, мВ    | 51,5 ± 11,4     | 65,4 ± 11,5*  | 48,1 ± 10,2#   | 50,1 ± 11,9#  |
| $I_{\max}$ , печень, мВ    | 42,0 ± 9,4      | 52,1 ± 11,1*  | 42,9 ± 8,0#    | 47,1 ± 8,6#   |
| $I_{\max}$ , мышцы, мВ     | 94,1 ± 10,2     | 131,1 ± 29,6* | 89,8 ± 20,3#   | 96,0 ± 21,3#  |
| S, сыворотка, мВ·с         | 903 ± 205       | 1197 ± 247*   | 1064 ± 223#^   | 1210 ± 374    |
| S, сердце, мВ·с            | 485 ± 105       | 715 ± 157*    | 459 ± 104#     | 476 ± 107#    |
| S, печень, мВ·с            | 92 ± 21         | 109 ± 25*     | 105 ± 23       | 115 ± 31      |
| S, мышцы, мВ·с             | 528 ± 120       | 675 ± 155*    | 556 ± 121#     | 593 ± 137#    |
| $tg\alpha_2$ , сыворотка   | 14,0 ± 3,1      | 24,1 ± 5,7*   | 13,9 ± 3,2#^   | 24,6 ± 6,0    |
| $tg\alpha_2$ , сердце      | 7,1 ± 1,5       | 8,5 ± 2,0*    | 7,8 ± 1,7#^    | 9,5 ± 2,1     |
| $tg\alpha_2$ , печень      | 8,1 ± 1,8       | 10,1 ± 2,2*   | 9,1 ± 2,0#^    | 10,0 ± 2,3    |
| $tg\alpha_2$ , мышцы       | 34,5 ± 8,1      | 48,8 ± 10,2*  | 35,7 ± 8,0#^   | 41,9 ± 9,3#   |

Примечание. Данные представлены как среднее значение ± SD. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА; ^  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА + SkQ1 650.



**Рис. 1.** СОЭ (а), уровень ЦИК (б), содержание IgA (в), IgM (г), IgG (д), уровень RF (е) и прирост толщины воспалённой конечности после введения полного адьюванта Фрейнда (ж) у животных с РА, получавших SkQ1. К – контроль. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА; ^  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА + SkQ1 650



**Рис. 2.** Содержание ДК (мкмоль/мл сыворотки и мкмоль/г ткани на панели а), активность АГ (Е/мл сыворотки и Е/г сырой массы ткани на панели б) и концентрация цитрата (ммоль/л сыворотки, гомогената на панели в) у животных с РА, получавших SkQ1. К – контроль. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА; ^  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА + SkQ1 650

к более существенному понижению концентрации ДК и увеличению активности АГ. Так, в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс из группы РА + SkQ1 1250 наблюдалось снижение уровня ДК соответственно на 62, 30, 57 и 25% по сравнению с группой с РА. Активность АГ у крыс, получавших SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг, возрастала в данных тканях соответственно на 34, 86, 14 и 15%. Содержание цитрата при этом достоверно снижалось в сердце и мышцах на 52 и 24% соответственно.

**SkQ1 способствует снижению выраженности дисбаланса в функционировании АОС.** Дисфункция компонентов антиоксидантной защиты является одним из ключевых факторов повреждения тканей при РА. Полученные дан-

ные показали, что индукция РА у крыс сопровождалась дисбалансом в функционировании АОС. В частности, наблюдалось возрастание активности СОД, каталазы, ГП и ГР и падение активности ГТ и содержания GSH в тканях животных с патологией (табл. 2, рис. 3). Применение SkQ1 в обеих дозах на фоне РА в большинстве случаев способствовало снижению выраженности данных изменений. При этом активность СОД в мышцах значимо изменялась только под действием SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг, тогда как в сыворотке крови данная дозировка оказывала менее существенное действие на активность каталазы по сравнению с дозой 625 нмоль/кг: было зарегистрировано снижение показателя на 41%

Таблица 2. Активность СОД, каталазы, ГП, ГР и ГТ при РА у крыс при введении SkQ1

| Показатели                | Группы животных |                |                 |                |
|---------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
|                           | Контроль        | РА             | РА + SkQ1 1250  | РА + SkQ1 650  |
| СОД, сыворотка, Е/мл      | 37,0 ± 9,0      | 61,4 ± 12,7*   | 41,1 ± 9,9#     | 38 ± 8,2#      |
| СОД, сердце, Е/г          | 200,1 ± 45,7    | 286,0 ± 68,2*  | 226,2 ± 52,4#   | 208,1 ± 42,0#  |
| СОД, печень, Е/г          | 7,3 ± 1,6       | 20,4 ± 4,9*    | 9,3 ± 2,2#      | 8,9 ± 1,6      |
| СОД, мышцы, Е/г           | 45,3 ± 8,1      | 63,2 ± 9,2*    | 57,3 ± 8,6#     | 64,6 ± 8,9     |
| Каталаза, сыворотка, Е/мл | 0,090 ± 0,020   | 0,157 ± 0,031* | 0,142 ± 0,032#^ | 0,092 ± 0,020# |
| Каталаза, сердце, Е/г     | 0,650 ± 0,154   | 0,891 ± 0,207* | 0,658 ± 0,158#  | 0,712 ± 0,168# |
| Каталаза, печень, Е/г     | 0,640 ± 0,150   | 0,751 ± 0,172* | 0,635 ± 0,152#  | 0,640 ± 0,151# |
| Каталаза, мышцы, Е/г      | 0,619 ± 0,147   | 0,804 ± 0,158* | 0,607 ± 0,149#  | 0,593 ± 0,141# |
| ГП, сыворотка, Е/мл       | 0,159 ± 0,035   | 0,185 ± 0,042* | 0,171 ± 0,040   | 0,184 ± 0,038  |
| ГП, сердце, Е/г           | 0,351 ± 0,085   | 0,525 ± 0,128* | 0,441 ± 0,102#^ | 0,581 ± 0,141  |
| ГП, печень, Е/г           | 0,137 ± 0,032   | 0,172 ± 0,040* | 0,127 ± 0,030#^ | 0,168 ± 0,031  |
| ГП, мышцы, Е/г            | 2,539 ± 0,617   | 2,866 ± 0,687* | 2,880 ± 0,702   | 2,930 ± 0,704  |
| ГР, сыворотка, Е/мл       | 0,038 ± 0,006   | 0,047 ± 0,007* | 0,041 ± 0,007#  | 0,049 ± 0,008  |
| ГР, сердце, Е/г           | 0,106 ± 0,020   | 0,124 ± 0,021* | 0,110 ± 0,020#  | 0,113 ± 0,019# |
| ГР, печень, Е/г           | 0,780 ± 0,187   | 0,952 ± 0,218* | 0,754 ± 0,172#  | 0,742 ± 0,177# |
| ГР, мышцы, Е/г            | 0,220 ± 0,035   | 0,302 ± 0,051* | 0,263 ± 0,041#^ | 0,295 ± 0,054  |
| ГТ, сыворотка, Е/мл       | 0,060 ± 0,013   | 0,029 ± 0,006* | 0,028 ± 0,007   | 0,029 ± 0,007  |
| ГТ, сердце, Е/г           | 1,013 ± 0,155   | 0,710 ± 0,112* | 0,886 ± 0,165#  | 0,801 ± 0,139# |
| ГТ, печень, Е/г           | 0,640 ± 0,098   | 0,473 ± 0,073* | 0,532 ± 0,081#  | 0,561 ± 0,107# |
| ГТ, мышцы, Е/г            | 0,384 ± 0,051   | 0,268 ± 0,038* | 0,313 ± 0,049#^ | 0,261 ± 0,042  |

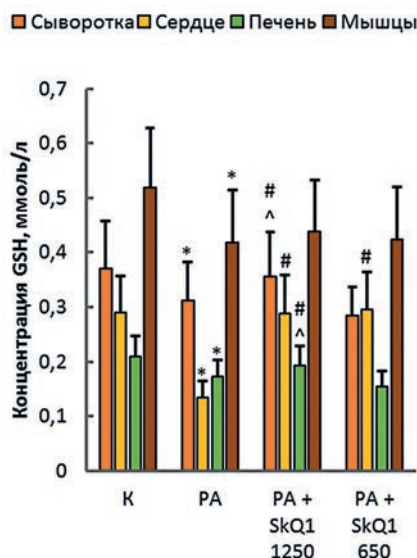
Примечание. Данные представлены как среднее значение ± SD. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА; ^  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА + SkQ1 650.

в группе РА + SkQ1 625 против снижения на 10% в группе РА + SkQ1 1250. Активность ГП достоверно уменьшалась в сердце и печени животных из группы РА + SkQ1 1250 по сравнению с данными группы с патологией. Величина наблюдаемых изменений составила 16 и 26% соответственно. Активность ГР достоверно изменялась в направлении контроля во всех тканях в группе РА + SkQ1 1250, а также в сердце и печени животных из группы РА + SkQ1 625. Активность ГТ, пониженная у крыс с РА, восстанавливалась под действием SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг в сердце, печени

и мышцах, а при использовании SkQ1 в дозе 625 нмоль/кг — в сердце и печени. Концентрация GSH также изменялась в направлении контроля в сыворотке крови, сердце и печени животных группы РА + SkQ1 1250.

**SkQ1 способствовал нормализации активности NADPH-генерирующих ферментов при РА.** Основными поставщиками NADPH для глутатионовой АОС являются NADP-ИДГ и Г6ФДГ, в связи с чем был проведён анализ воздействия SkQ1 на данные ферменты при РА. Результаты работы показали, что SkQ1 оказывал некоторое стимулирующее воздействие





**Рис. 3.** Концентрация GSH (ммоль/л сыворотки, гомогената) у животных с РА, получавших SkQ1. К – контроль. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА; ^  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА + SkQ1 650

на активность NADP-ИДГ в сердце крыс, которая при РА понижалась (рис. 4). Так, применение дозы 1250 нмоль/кг приводило к увеличению данного параметра в 2,4 раза относительно значений для группы с патологией. Активность фермента в мышцах и сыворотке крови животных под действием SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг изменялась в направлении контроля, тогда как тестируемое соединение в дозировке 625 нмоль/кг не оказывало значимого воздействия на данный показатель в мышцах крыс с РА. На активность Г6ФДГ, которая повышалась в тканях крыс при РА, наибольший эффект SkQ1 оказывал в дозе 1250 нмоль/кг. Так, при введении протектора в данной дозировке активность фермента понижалась в сыворотке крови, сердце и печени животных соответственно на 62, 18 и 10% по сравнению с данными для группы с патологией. Удельная активность исследуемых в настоящей работе ферментов представлена в Приложении.

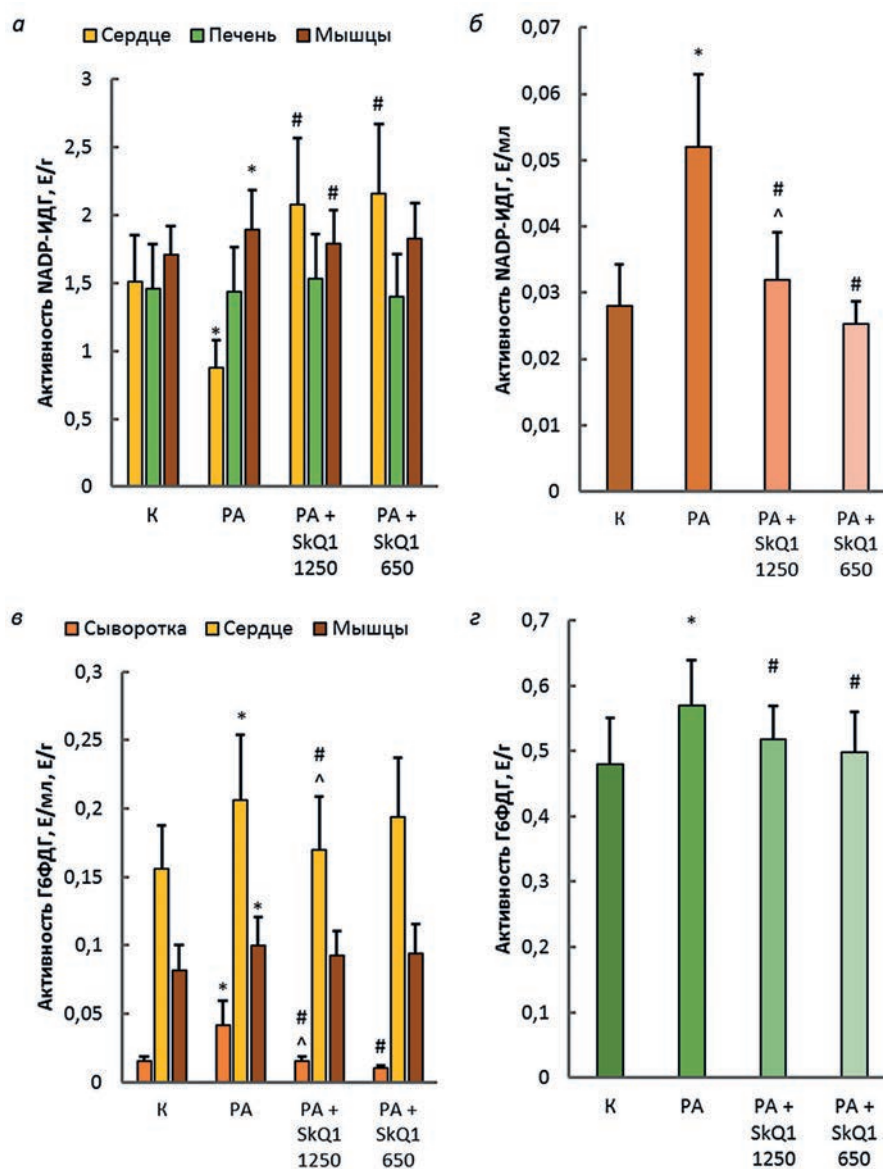
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Окислительный стресс, сопряжённый с усиленным образованием АФК и дисфункцией АОС, играет одну из ключевых ролей в поддержании высокой интенсивности воспаления при РА. Митохондрии, являясь ключевым компонентом клеточного энергетического обмена, выступают в качестве основных источников АФК и вносят существенный

вклад в регуляцию воспалительных процессов и формирование аутоиммунного ответа [33]. Снизить уровень митохондриальных АФК и стимулированный ими воспалительный ответ возможно с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов, в частности SkQ1. В настоящем исследовании было продемонстрировано, что применение SkQ1 при адъювант-индуцированном РА приводило к уменьшению интенсивности свободнорадикального окисления и смягчению выраженности дисбаланса в функционировании АОС и NADPH-генерирующих ферментов, что сопровождалось нормализацией параметров иммунного статуса у экспериментальных животных.

Результаты настоящей работы продемонстрировали снижение уровня IgA, IgM, IgG, ЦИК и RF, неспецифического маркера воспаления – СОЭ, а также выраженности отёка воспалённой конечности у крыс с РА, получавших SkQ1. Судя по всему, данный эффект тестируемое соединение проявляло посредством торможения интенсивности свободнорадикального окисления в тканях животных с патологией. Как известно, в условиях окислительного стресса наблюдается деградация ингибитора фактора NF-κB, который играет важнейшую роль в активизации воспалительной реакции. Кроме того, накапливающиеся при РА конечные продукты гликирования белков активируют рецепторы конечных продуктов гликирования, что является важным механизмом развития кардиоваскулярных осложнений при РА [3]. Повреждённые в условиях окислительного стресса митохондрии могут высвобождать ассоциированные с повреждениями молекулярные паттерны (DAMPs), которые действуют через модуляцию врождённого иммунитета посредством редокс-чувствительных воспалительных путей, в частности NF-κB-пути, или прямой активации NLRP3 инфламасомы – цитозольного рецептора, способствующего созреванию провоспалительных цитокинов [33].

Результаты настоящей работы согласуются с полученными ранее данными, продемонстрировавшими перспективность применения SkQ1 в качестве дополнения к основной терапии РА. Так, было показано, что данное соединение предотвращало разрушение кости, дегенерацию и воспалительную инфильтрацию хряща при аутоиммунном артрите у крыс, что могло быть связано с активацией апоптоза нейтрофилов под действием SkQ1 [21]. Судя по всему, продемонстрированная способность тестируемого соединения оказывать регуляторное воздействие на жизнеспособность



**Рис. 4.** Активность NADP-IDG в сердце, печени, мышцах (а) и сыворотке крови (б), а также активность Г6ФДГ в сыворотке крови, сердце, мышцах (Е/мл сыворотки и Е/г сырой массы ткани на панели (в)) и печени (г) животных с РА, получавших SkQ1. К – контроль. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА; ^  $p < 0,05$  по сравнению с группой РА + SkQ1 650

иммунных клеток в совокупности с нормализующим влиянием SkQ1 на показатели иммунного статуса, показанного в настоящем исследовании, лежали в основе уменьшения клинических проявлений патологии у животных с аутоиммунным артритом [21]. Механизм действия SkQ1 мог быть связан с нивелированием дисфункции митохондрий, уменьшением генерации митохондриальных АФК и вызванных ими воспалительных реакций. Действительно, как показали результаты нашей работы, SkQ1 способен существенно снижать интенсивность свободнорадикального окисления при РА.

В соответствии с результатами настоящей работы у крыс с РА, помимо изменения

параметров иммунного статуса, наблюдалась интенсификация процессов свободнорадикального окисления, о чём свидетельствовало повышение параметров биохемилюминесценции, отражающих активность свободнорадикальных процессов и общий антиоксидантный потенциал, снижение активности АГ – чувствительной мишени для действия АФК [34], а также накопление субстрата данного фермента – цитрата. Введение SkQ1 крысам с РА приводило к изменению параметров интенсивности свободнорадикального окисления в направлении контрольных значений. Из литературы известно, что уменьшение выраженности окислительного стресса может снизить

степень развития воспалительного ответа и затормозить прогрессирование РА. В частности, применение таких антиоксидантов, как зингерон [35], фанхинолин [36] и витамин Е [37], способствовало снижению уровня продуктов свободнорадикального окисления, восстановлению активности компонентов АОС и торможению воспалительного ответа у экспериментальных животных. Кроме того, имеются сведения о том, что потребление антиоксидантов с пищей способствует смягчению воспалительных состояний и улучшению функции антиоксидантных ферментов у пациентов с РА [38]. Для SkQ1 также известна противовоспалительная активность. В частности, применение данного соединения нормализовывало воспалительный ответ, снижая содержание нейтрофилов и увеличивая содержание макрофагов в процессе заживления ран [39, 40], что достигалось посредством снижения уровня митохондриальных АФК и сопутствующей активации NLRP3 инфламмосомы. Необходимо отметить некоторое преимущество использования митохондриально-направленных антиоксидантов по сравнению с антиокислителями, не обладающими способностью накапливаться преимущественно в митохондриях. В частности, введение зингерона и витамина Е животным с экспериментальным артритом, как упоминалось выше, способствовало снижению выраженности патологии и воспалительных процессов [35, 37], однако для достижения данного эффекта требовалось использовать гораздо более высокие дозировки данных соединений: 128 и 290 тысяч нмоль/кг соответственно, по сравнению с 1250 и 650 нмоль/кг для SkQ1. Фанхинолин оказывал протекторный эффект в дозировках, сравнимых с использованными в настоящей работе [36], но введение данного соединения продолжалось на протяжении 21 дня, в то время как SkQ1 вводили 7 дней. Достаточно высокую протекторную активность при экспериментальном РА продемонстрировал антиоксидант ресвератрол, понижавший степень повреждения синовиальной ткани и тормозивший активацию иммунных клеток [41]. В то же время ресвератрол использовался в дозировке, превышающей таковую для SkQ1 примерно в 44 раза, и вводился 2 месяца. Данные различия подтверждают, что ингибирование свободнорадикального окисления в митохондриях является одним из наиболее эффективных способов смягчения АФК-опосредованного воспаления, поддерживающего прогрессирование аутоиммунного ответа и развитие дегенеративных изменений в суставах.

Ранее нами было показано, что у крыс с РА в условиях интенсификации свободнорадикального окисления наблюдалось развитие дисбаланса в функционировании АОС, заключавшегося в снижении активности ГТ и содержания GSH на фоне повышения активности СОД, каталазы, ГП и ГР [42, 43]. Хотя не существует однозначного мнения о состоянии АОС при РА, хорошо известно, что сдвиг прооксидантно-антиоксидантного баланса в сторону избыточного формирования АФК является одним из ключевых факторов дальнейшей активации воспаления и деструкции тканей при патологии [44]. Как показали полученные в настоящей работе результаты, применение митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 способствовало изменению активности СОД, каталазы, ГП, ГР, ГТ, а также содержания GSH у крыс с РА в направлении показателей контрольной группы. Очевидно, что реализация антиоксидантного эффекта SkQ1 в митохондриях являлась главной причиной нормализации функционирования компонентов АОС у крыс с патологией. Имеются сведения, что некоторые медиаторы воспаления, такие как интерлейкин 1 $\beta$  и фактор некроза опухоли  $\alpha$ , могут вызывать изменения функционирования митохондрий. Параллельно с этим окислительный стресс, индуцируемый в условиях активации аутоиммунного ответа и гипоксии в воспалённых суставах, увеличивает количество мутаций в мтДНК и выработку АФК митохондриями, способствуя ещё более сильной активации воспаления [33, 45]. Таким образом, механизм действия SkQ1 заключался, по-видимому, в разрывании порочного круга нарушения функции митохондрий, сопряжённого с усиленной генерацией АФК и дальнейшей активацией воспалительной реакции посредством высвобождения DAMPs, индукции NLRP3 инфламмосомы и сигнального пути NF- $\kappa$ B.

Основными поставщиками NADPH для восстановления окисленного глутатиона и функционирования глутатионовой АОС являются Г6ФДГ и NADP-ИДГ. Развитие патологии было сопряжено с увеличением активности данных ферментов в тканях крыс, что могло иметь адаптивное значение в связи с возрастанием потребности в NADPH глутатионовой АОС при интенсификации процессов свободнорадикального окисления на фоне РА [42]. Кроме того, NADPH при патологии мог интенсивно потребляться активированными нейтрофилами, обильно производящими супероксидный анион-радикал и вносящими существенный вклад в поддержание воспалительного ответа

и разрушение суставов [46]. Вместе с тем проведённые нами исследования продемонстрировали понижение активности NADP-ИДГ в сердце животных с РА. Имеются литературные данные, свидетельствующие о том, что в сердечной ткани в условиях развития адьювант-индуцированного артрита в существенных количествах накапливается 4-гидроксиноненаль — конечный продукт пероксидного окисления омега-6-полиненасыщенных жирных кислот. 4-Гидроксиноненаль образует аддукты с NADP-ИДГ, инактивируя тем самым данный фермент [47]. Введение животным с патологией SkQ1 приводило к изменению активности NADPH-генерирующих ферментов в направлении контроля, что, очевидно, было сопряжено с нормализацией активности ГП и ГР под действием тестируемого соединения. Помимо этого, снижение интенсивности воспалительных процессов под действием SkQ1 могло также вносить вклад в уменьшение потребности NADPH-оксидазы в NADPH. Известно, что Г6ФДГ играет важную роль не только в поддержании редокс-баланса клеток путём поставки NADPH для глутатионовой АОС, но и в поддержании работы NADPH-оксидазы и воспалительного ответа [48, 49]. В данном свете нормализация активности Г6ФДГ и NADP-ИДГ выглядит как возможный подход к снижению интенсивности генерации АФК при патологиях, сопряжённых с воспалением. Активность NADP-ИДГ в сердце крыс с РА при введении SkQ1 восстанавливалась и несколько превышала значения активности для контрольной группы. По-видимому, вследствие улучшения окислительного статуса в клетках сердца под действием тестируемого соединения существенно снижалась концентрация 4-гидроксиноненала, инактивирующего NADP-ИДГ, что давало возможность компенсировать потребность в NADPH данным компонентом метаболизма при окислительном стрессе, вызванном полным адьювантом Фрейнда.

Таким образом, введение крысам с РА SkQ1 способствовало снижению интенсивно-

сти свободнорадикального окисления и изменению активности антиоксидантных, NADPH-генерирующих ферментов, содержания GSH и цитрата в направлении значений контрольной группы. Улучшение окислительно-восстановительного баланса в тканях крыс с РА под действием SkQ1 приводило к нормализации параметров иммунного статуса, что, по-видимому, было обусловлено торможением АФК-опосредованной активизации воспаления и аутоиммунного ответа. По совокупности анализируемых показателей дозировка SkQ1 1250 нмоль/кг оказывала более выраженный эффект.

**Вклад авторов.** Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова — концепция и руководство работой; Д.А. Жаглин, Г.А. Разуваев, С.А. Олейник — проведение экспериментов; Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова — обсуждение результатов исследования, написание текста статьи.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность директору НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, академику РАН Скулачёву В.П. за предоставление SkQ1 для проведения данного исследования, постоянное внимание, плодотворное обсуждение результатов исследований и ценные рекомендации при выполнении работы. Авторы также выражают признательность генеральному директору ООО «Митотех», ведущему научному сотруднику НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, к.б.н. Скулачёву М.В. за помощь при интерпретации и обсуждении полученных результатов, а также полезные рекомендации для написания представленной рукописи.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Radu, A. F., and Bungau, S. G. (2021) Management of rheumatoid arthritis: an overview, *Cells*, **10**, 2857, doi: 10.3390/cells10112857.
2. Da Fonseca, L. J. S., Nunes-Souza, V., Goulart, M. O. F., and Rabelo, L. A. (2019) Oxidative stress in rheumatoid arthritis: what the future might hold regarding novel biomarkers and add-on therapies, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 7536805, doi: 10.1155/2019/7536805.
3. Phull, A. R., Nasir, B., Ul Haq, I., and Kim, S. J. (2018) Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis,



- Chem. Biol. Interact.*, **281**, 121-136, doi: 10.1016/j.cbi.2017.12.024.
4. Ferreira, H. B., Melo, T., Paiva, A., and Domingues, M. R. (2021) Insights in the role of lipids, oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis unveiled by new trends in lipidomic investigations, *Antioxidants*, **10**, 45, doi: 10.3390/antiox10010045.
  5. Mititelu, R. R., Pădureanu, R., Băcănoiu, M., Pădureanu, V., Docea, A. O., Calina, D., Barbulescu, A. L., and Buga, A. M. (2020) Inflammatory and oxidative stress markers – mirror tools in rheumatoid arthritis, *Biomedicines*, **8**, 125, doi: 10.3390/biomedicines8050125.
  6. Del Buono, M., Abbate, A., and Toldo, S. (2018) Interplay of inflammation, oxidative stress and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis, *Heart*, **104**, 1991-1992, doi: 10.1136/heartjnl-2018-313313.
  7. Radovanović-Dinić, B., Tešić-Rajković, S., Zivkovic, V., and Grgov, S. (2018) Clinical connection between rheumatoid arthritis and liver damage, *Rheumatol. Int.*, **38**, 715-724, doi: 10.1007/s00296-018-4021-5.
  8. Steinz, M. M., Santos-Alves, E., and Lanner, J. T. (2020) Skeletal muscle redox signaling in rheumatoid arthritis, *Clin. Sci.*, **134**, 2835-2850, doi: 10.1042/CS20190728.
  9. Lee, S. H., Chang, D. K., Goel, A., Boland, C. R., Bugbee, W., Boyle, D. L., Firestein, G. S. (2003) Microsatellite instability and suppressed DNA repair enzyme expression in rheumatoid arthritis, *J. Immunol.*, **170**, 2214-2220, doi: 10.4049/jimmunol.170.4.2214.
  10. Biniecka, M., Fox, E., Gao, W., Ng, C. T., Veale, D. J., Fearon, U., and O'Sullivan, J. (2011) Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis, *Arthritis Rheum.*, **63**, 2172-2182, doi: 10.1002/art.30395.
  11. Harty, L. C., Biniecka, M., O'Sullivan, J., Fox, E., Mulhall, K., Veale, D. J., and Fearon, U. (2012) Mitochondrial mutagenesis correlates with the local inflammatory environment in arthritis, *Ann. Rheum. Dis.*, **71**, 582-588, doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200245.
  12. Kan, S., Duan, M., Liu, Y., Wang, C., and Xie, J. (2014) Role of mitochondria in physiology of chondrocytes and diseases of osteoarthritis and rheumatoid arthritis, *Cartilage*, **13**, 1102S-1121S, doi: 10.1177/19476035211063858.
  13. Oğul, Y., Gür, F., Cengiz, M., Gür, B., Sarı, R. A., and Kızıltunç, A. (2021) Evaluation of oxidant and intracellular anti-oxidant activity in rheumatoid arthritis patients: *in vivo* and *in silico* studies, *Int. Immunopharmacol.*, **97**, 107654, doi: 10.1016/j.intimp.2021.107654.
  14. Mateen, S., Moin, S., Khan, A. Q., Zafar, A., Fatima, N., and Shahzad, S. (2017) Role of hydrotherapy in the amelioration of oxidant-antioxidant status in rheumatoid arthritis patients, *Int. J. Rheum. Dis.*, **21**, 1822-1830, doi: 10.1111/1756-185X.13118.
  15. Behl, T., Upadhyay, T., Singh, S., Chigurupati, S., Alsubayiel, A. M., Mani, V., Vargas-De-La-Cruz, C., Uivarosan, D., Bustea, C., Sava, C., Stoicescu, M., Radu, A. F., Bungau, S. G. (2021) Polyphenols targeting MAPK mediated oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis, *Molecules*, **26**, 6570, doi: 10.3390/molecules26216570.
  16. Fan, X. X., Xu, M. Z., Leung, E. L. H., Jun, C., Yuan, Z., and Liu, L. (2020) ROS-responsive berberine polymeric micelles effectively suppressed the inflammation of rheumatoid arthritis by targeting mitochondria, *Nano Micro Lett.*, **12**, 76, doi: 10.1007/s40820-020-0410-x.
  17. D'Amico, D., Olmer, M., Fouassier, A. M., Valdés, P., Andreux, P. A., Rinsch, C., and Lotz, M. (2022) Urolithin A improves mitochondrial health, reduces cartilage degeneration, and alleviates pain in osteoarthritis, *Aging Cell*, **21**, e13662, doi: 10.1111/accel.13662.
  18. Сенокосова Е. А., Крутицкий С. С., Груздева О. В., Антонова Л. В., Скулачев М. В., Григорьев Е. В. (2022) Исследование антиоксидантного эффекта митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на модели изолированного сердца крысы, *Общая реаниматология*, **18**, 36-44, doi: 10.15360/1813-9779-2022-4-36-44.
  19. Skulachev, V. P., Anisimov, V. N., Antonenko, Y. N., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Elichev, V. P., Filenko, O. F., Kalina, N. I., Kapelko, V. I., Kolosova, N. G., Kopnin, B. P., Korshunova, G. A., Lichinitser, M. R., Obukhova, L. A., Pasyukova, E. G., Pisarenko, O. I., Roginsky, V. A., Ruuge, E. K., Senin, I. I., Severina, I. I., Skulachev, M. V., Spivak, I. M., Tashlitsky, V. N., Tkachuk, V. A., Vysokikh, M. Y., Yaguzhinsky, L. S., and Zorov, D. B. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437-461, doi: 10.1016/j.bbabo.2008.12.008.
  20. Wei, Y., Troger, A., Spahiu, V., Perekhvatova, N., Skulachev, M., Petrov, A., Chernyak, B., and Asbell, P. (2019) The role of SKQ1 (visomitin) in inflammation and wound healing of the ocular surface, *Ophthalmol. Ther.*, **8**, 63-73, doi: 10.1007/s40123-018-0158-2.
  21. Andreev-Andrievskiy, A. A., Kolosova, N. G., Stefanova, N. A., Lovat, M. V., Egorov, M. V., Manskikh, V. N., Zinovkin, R. A., Galkin, I. I., Prihodko, A. S., Skulachev, M. V., and Lukashev, A. N. (2016) Efficacy of mitochondrial antioxidant plastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium bromide (SkQ1) in the rat model of autoimmune arthritis, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 8703645, doi: 10.1155/2016/8703645.
  22. Taurog, J. D., Argentieri, D. C., McReynolds, R. A. (1988) Adjuvant arthritis, *Methods Enzymol.*, **162**, 339-355, doi: 10.1016/0076-6879(88)62089-1.
  23. Луговская С. А., Морозова В. Т., Почтарь М. Е., Долгов В. В. (2014) *Лабораторная гематология*, Триада, Тверь.

24. Piskarev, I. M., Trofimova, S. V., Ivanova, I. P., and Burkhina, O. E. (2015) Investigation of the level of free-radical processes in substrates and biological samples using induced chemiluminescence, *Biophysics*, **60**, 400-408, doi: 10.1134/S0006350915030148.
25. Recknagel, R. O., and Ghoshal, A. K. (1966) Lipoperoxidation of rat liver microsomal lipids induced by carbon tetrachloride, *Nature*, **210**, 1162-1163, doi: 10.1038/2101162a0.
26. Nishikimi, M., Rao, N. A., and Yagi, K. (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 849-864, doi: 10.1016/s0006-291x(72)80218-3.
27. Góth, L. (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clin. Chim. Acta*, **196**, 143-151, doi: 10.1016/0009-8981(91)90067-m.
28. Paglia, D. E., and Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169.
29. Zanetti, G. (1979) Rabbit liver glutathione reductase. Purification and properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 241-246, doi: 10.1016/0003-9861(79)90415-6.
30. Warholm, M., Guthenberg, C., Von Bahr, C., and Mannervik, B. (1985) Glutathione transferases from human liver, *Method Enzymol.*, **113**, 499-504, doi: 10.1016/s0076-6879(85)13065-x.
31. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys.*, **82**, 70-77, doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
32. Афанасьев В. Г., Зайцев В. С., Вольфсон Т. И. (1973) К микрометоду определения лимонной кислоты в сыворотке крови с помощью фотоэлектроколориметра, *Лаб. дело*, **4**, 115-116.
33. López-Armada, M. J., Fernández-Rodríguez, J. A., and Blanco, F. J. (2022) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rheumatoid arthritis, *Antioxidants*, **11**, 1151, doi: 10.3390/antiox11061151.
34. Liu, R. Z., Zhang, S., Zhang, W., Zhao, X. Y., and Du, G. H. (2023) Baicalein attenuates brain iron accumulation through protecting aconitase 1 from oxidative stress in rotenone-induced Parkinson's disease in rats, *Antioxidants*, **12**, 12, doi: 10.3390/antiox12010012.
35. Bashir, N., Ahmad, S. B., Rehman, M. U., Muzaamil, S., Bhat, R. R., Mir, M. U. R., Shazly, G. A., Ibrahim, M. A., Elossaily, G. M., Sherif, A. Y., and Kazi, M. (2021) Zingerone (4-(4-hydroxy-3-methylphenyl) butane-2-one) modulates adjuvant-induced rheumatoid arthritis by regulating inflammatory cytokines and antioxidants, *Redox Rep.*, **26**, 62-70, doi: 10.1080/13510002.2021.1907518.
36. Lu, S., Liu, T., Li, H., and Fan, H. (2019) Fangchinoline supplementation attenuates inflammatory markers in experimental rheumatoid arthritis-induced rats, *Biomed. Pharmacother.*, **111**, 142-150, doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.043.
37. Dai, W., Qi, C., and Wang, S. (2018) Synergistic effect of glucosamine and vitamin E against experimental rheumatoid arthritis in neonatal rats, *Biomed. Pharmacother.*, **105**, 835-840, doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.136.
38. Arablou, T., Aryaeian, N., Djalali, M., Shahram, F., and Rasouli, L. (2019) Association between dietary intake of some antioxidant micronutrients with some inflammatory and antioxidant markers in active rheumatoid arthritis patients, *Int. J. Vitamin Nutr. Res.*, **89**, 238-245, doi: 10.1024/0300-9831/a000255.
39. Demyanenko, I. A., Popova, E. N., Zakharova, V. V., Ilyinskaya, O. P., Vasilieva, T. V., Romashchenko, V. P., Fedorov, A. V., Manskikh, V. N., Skulachev, M. V., Zinovkin, R. A., Pletjushkina, O. Y., Skulachev, V. P., and Chernyak, B. V. (2015) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice, *Aging (Albany NY)*, **7**, 475-485, doi: 10.18632/aging.100772.
40. Demyanenko, I. A., Zakharova, V. V., Ilyinskaya, O. P., Vasilieva, T. V., Fedorov, A. V., Manskikh, V. N., Zinovkin, R. A., Pletjushkina, O. Y., Chernyak, B. V., Skulachev, V. P., and Popova, E. N. (2017) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves dermal wound healing in genetically diabetic mice, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 6408278, doi: 10.1155/2017/6408278.
41. Riveiro-Naveira, R. R., Valcárcel-Ares, M. N., Almonte-Becerril, M., Vaamonde-García, C., Loureiro, J., Hermida-Carballo, L., López-Peláez, E., Blanco, F. J., López-Armada, M. J. (2016) Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model, *Rheumatology*, **55**, 1889-1900, doi: 10.1093/rheumatology/kew255.
42. Kryl'skii, E. D., Popova, T. N., and Kirilova, E. M. (2015) Activity of glutathione antioxidant system and NADPH-generating enzymes in rats with experimental rheumatoid arthritis, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **160**, 24-27, doi: 10.1007/s10517-015-3089-0.
43. Крыльский Е. Д., Попова Т. Н., Кирилова Е. М., Сафонова О. А. (2016) Воздействие липоевой кислоты на активность каспаз, показатели иммунного и антиоксидантного статуса при ревматоидном артрите у крыс, *Биоорг. химия*, **42**, 431-439, doi: 10.7868/S0132342316040138.
44. Ponist, S., Zloh, M., and Bauerova, K. (2019) in *Animal Models in Medicine and Biology* (Tvrdá, E., and Yenissetti, S. C., eds), IntechOpen, London, pp. 195-216.
45. Cai, W. W., Yu, Y., Zong, S. Y., and Wei, F. (2020) Metabolic reprogramming as a key regulator in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Inflamm. Res.*, **69**, 1087-1101, doi: 10.1007/s00011-020-01391-5.
46. Benna, J. E., Hayem, G., Dang, P. M. C., Fay,

- M., Chollet-Martin, S., Elbim, C., Meyer, O., and Gougerot-Pocidallo, M. A. (2002) NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy, *Inflammation*, **26**, 273-278, doi: 10.1023/a:1021460517468.
47. Shi, Q., Abusarah, J., Baroudi, G., Fernandes, J. C., Fahmi, H., and Benderdour, M. (2012) Ramipril attenuates lipid peroxidation and cardiac fibrosis in an experimental model of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.*, **14**, R223, doi: 10.1186/ar4062.
48. Nadeem, A., Al-Harbi, N. O., Ahmad, S. F., Ibrahim, K. E., Siddiqui, N., and Al-Harbi, M. M. (2018) Glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition attenuates acute lung injury through reduction in NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, *Clin. Exp. Immunol.*, **191**, 279-287, doi: 10.1111/cei.13097.
49. Martínez-Navarro, F. J., Martínez-Morcillo, F. J., López-Muñoz, A., Pardo-Sánchez, I., Martínez-Menchón, T., Corbalán-Vélez, R., Cayuela, M. L., Pérez-Oliva, A. B., García-Moreno, D., and Mulero, V. (2020) The vitamin B6-regulated enzymes PYGL and G6PD fuel NADPH oxidases to promote skin inflammation, *Dev. Comp. Immunol.*, **108**, 103666, doi: 10.1016/j.dci.2020.103666.

### SkQ1 IMPROVES IMMUNE STATUS AND NORMALISES THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT AND NADPH-GENERATING ENZYMES IN ADJUVANT-INDUCED RHEUMATOID ARTHRITIS IN RATS

E. D. Kryl'skii\*, T. N. Popova, D. A. Zhaglin, G. A. Razuvaev, and S. A. Oleynik

*Voronezh State University, 394018 Voronezh, Russia; e-mail: evgenij.krylsky@yandex.ru*

Rheumatoid arthritis (RA) is a severe systemic autoimmune inflammatory disease. Oxidative stress and excessive formation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) are now considered to be the central pathogenetic mechanisms of connective tissue component destruction and the factors responsible for a highly active inflammatory process and autoimmune response. The aim of the present work was to evaluate the effect of mitochondrial-directed antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on immune status, intensity of free radical-induced oxidation and functioning of antioxidant system (AOS) and NADPH-generating enzymes in rats with adjuvant-induced RA. Laboratory animals were divided into 4 groups: a control group; a group of animals with RA; animals injected intraperitoneally with SkQ1 at a dose of 1250 nmol/kg every 24 hours during the next 8 days from day 7 of RA development, and animals given SkQ1 at a dose of 625 nmol/kg according to the above scheme. Material for the study was taken on day 15 after the start of the experiment. The rate of erythrocyte sedimentation, the level of circulating immune complexes, and the concentration of immunoglobulins A, M and G were determined in rats by enzyme immunoassay. The intensity of free radical-induced oxidation was assessed by iron-induced biochemiluminescence, diene conjugate content and aconitate hydratase activity. Enzyme activity and metabolite content in animal tissues were analysed spectrophotometrically. The results of the work showed that the development of RA was associated with an increase in the indicators of immune response and intensity of free radical-induced oxidation. The development of an imbalance in AOS functioning and an increase in the activity of NADPH-generating enzymes was also observed. The administration of SkQ1 resulted in a dose-dependent change in the oxidative status indicators towards the control, which was accompanied by the normalization of the immune status parameters. It seems that the tested compound decreased the level of mitochondrial ROS, resulting in an inhibition of the inflammatory response. The consequence of these changes could be inhibition of free radical generation by immunocompetent cells and subsequent mitigation of the severity of oxidative stress in the tissues.

**Keywords:** 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium, rheumatoid arthritis, oxidative stress, immune status, immunoglobulins, antioxidant system

## АНАЛИЗ ТРАНСФЕРРИНА В МОЧЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ С ПОМОЩЬЮ НАНОТЕЛ

© 2023 А.М. Сачко<sup>1</sup>, О.С. Горяйнова<sup>1</sup>, Т.И. Иванова<sup>1,2</sup>, И.Ю. Николаева<sup>3</sup>,  
М.Е. Тарнопольская<sup>3</sup>, А.Ю. Бычков<sup>3</sup>, М.Я. Гаас<sup>4</sup>, Н.В. Воробьев<sup>5,6</sup>,  
А.Д. Каприн<sup>4,7</sup>, П.В. Шегай<sup>4,7</sup>, С.В. Тиллиб<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН,  
119334 Москва, Россия; электронная почта: tillib@genebiology.ru

<sup>2</sup> Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –  
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 249036 Обнинск, Калужская обл., Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, геологический факультет,  
119234 Москва, Россия

<sup>4</sup> Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия

<sup>5</sup> Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена –  
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 125284 Москва, Россия

<sup>6</sup> Первый Московский государственный медицинский университет  
имени И.М. Сеченова Минздрава России, 119991 Москва, Россия

<sup>7</sup> Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России,  
125284 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.11.2022

После доработки 14.06.2023

Принята к публикации 03.07.2023

Известно, что коэффициент насыщения трансферрина (Tf) железом в крови человека является важным клиническим параметром. Для анализа тонких изменений в относительной представленности разных форм трансферрина, потенциально связанных с патологическим процессом, могут быть использованы специфические антитела. Недавно авторы данного исследования смогли получить и охарактеризовать высокоспецифические однодоменные антитела (нанотела), узнающие преимущественно железо-насыщенную (holo-Tf) или железо-ненасыщенную (apo-Tf) форму трансферрина. В данной работе в условиях более приближенных к физиологическим, чем в ранее проводимых экспериментах, мы дополнительно продемонстрировали, что эти уникальные нанотела обладают чрезвычайно высокой дифференциальной специфичностью связывания разных форм Tf в различных биологических жидкостях человека. Нам удалось с помощью этих нанотел впервые провести анализ относительной представленности форм Tf в образцах мочи больных раком мочевого пузыря (РМП). Было показано, что повышение концентрации общего Tf в образцах мочи, нормализованных по креатинину, ассоциировано со степенью прогресса и роста злокачественности РМП. В образцах здоровых доноров и на ранних стадиях РМП (G1) Tf детектируется в сильно меньших количествах (в сравнении с более поздними стадиями) и лишь при дополнительном концентрировании исследуемых проб. Для большинства исследованных образцов мочи больных РМП ожидаемо (как ранее показано в случае Tf в крови терминальных больных раком яичников) концентрация apo-Tf явно выше, чем holo-Tf, особенно в случае наиболее продвинутого мышечно-инвазивного РМП. Неожиданностью для нас стало обнаружение в образцах мочи некоторых больных РМП примерно равных количеств apo-Tf и «holo-Tf». Мы предположили, что фракция «holo-Tf» в данном случае в значительной степени может быть представлена «вторичными комплексами», образуемыми apo-Tf в соединении с ионами, отличными от  $Fe^{3+}$ , накапливающимися в моче некоторых раковых больных и способными связываться с apo-Tf, меняя его конформацию в направлении holo-Tf. Методом масс-спектропии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме мы получили первые результаты, подтверждающие предположенную нами гипотезу. Препарат «holo-Tf» в этих образцах мочи оказался сильно обогащен цинком и никелем. Также в этом препарате наблюдается относительное обогащение кадмием, но он присутствует в сильно меньших концентрациях. Полученные данные указывают на то, что используемое нанотело,

Принятые сокращения: МС-ИСП – масс-спектропия с ионизацией в индуктивно-связанной плазме; РМП – рак мочевого пузыря; Tf – белок трансферрин; apo-Tf – не содержащая железо форма Tf; holo-Tf – насыщенная железом форма Tf; TfR – рецептор трансферрина.

\* Адресат для корреспонденции.



узнающее преимущественно железо-насыщенную форму трансферрина (holo-Tf), способно также связывать Tf в ассоциации с иными ионами металлов, отличными от железа. Эта способность потенциально может открыть новые возможности в исследованиях относительной представленности разных ионов металлов в ассоциации с трансферрином в биологических жидкостях человека в норме и патологии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** однодоменное антитело, нанотело, апо- и голо-трансферрин, аффинная хроматография, рак мочевого пузыря, МС-ИСП.

**DOI:** 10.31857/S0320972523080055, **EDN:** IJFNHI

## ВВЕДЕНИЕ

Поддержание и регуляция гомеостаза железа, необходимого микроэлемента для ключевых физиологических процессов, осуществляется целым каскадом белков, в котором сбой одного из звеньев может приводить к тяжелым патологическим последствиям [1]. Транспорт железа и депонирование осуществляется в основном посредством комплексов железо/трансферрин и железо/ферритин. Высокая скорость пролиферации большинства опухолевых клеток, зависящая в том числе от поступления достаточного количества железа, часто ассоциирована с повышенной экспрессией рецепторов трансферрина [2]. Трансферрин (Tf) — это гликопротеин размером 80 кДа, состоящий из двух гомологичных частей, или долей (N- и C- по 40 кДа). Каждая доля способна связывать один ион свободного трехвалентного железа ( $\text{Fe}^{3+}$ ), то есть к Tf можно присоединить до двух ионов железа. Насыщенную железом форму Tf обозначают как holo-Tf. Не содержащая железо форма Tf, называемая apo-Tf, способна с высокой эффективностью связывать  $\text{Fe}^{3+}$  в крови, превращаясь в holo-Tf, и транспортировать  $\text{Fe}^{3+}$  на поверхность клетки для интернализации посредством взаимодействия с рецептором трансферрина (TfR). Комплекс железосвязанного Tf с рецептором, образующийся на поверхности клетки, интернализуется посредством клатрин-зависимого эндоцитоза. Работа протонного насоса в эндосомальной мембране приводит к снижению pH до 5,5, что запускает конформационные изменения как в Tf, так и в TfR1, которые ведут к последующему высвобождению железа и превращению holo-Tf в apo-Tf. Трехвалентное железо ( $\text{Fe}^{3+}$ ) превращается в двухвалентное железо ( $\text{Fe}^{2+}$ ), комплекс рецептор/apo-Tf затем возвращается на поверхность клетки, где apo-Tf высвобождается из связи с рецептором при нейтральных значениях pH [3].

Если для ферритина было показано, что его уровень в сыворотке крови может являться биомаркером для выявления ряда опухо-

лей на продвинутых стадиях болезни [4], то до последнего времени мало внимания уделялось другому белку острой фазы — трансферрину. Уровень сывороточного Tf снижен при воспалениях, злокачественных процессах, в случае перегрузки железом и повышен при дефиците железа [5]. Совсем недавно авторы данной статьи с соавторами показали, что измерение уровня трансферрина и его насыщенности железом в крови имеет большой потенциал в оценке риска как рака яичников, так и функционального железодефицита у пациентов с диагнозом рак яичников [6].

Важным клиническим параметром является коэффициент насыщения трансферрина железом, который рассчитывается как отношение содержания железа в крови пациента к показателю общей железосвязывающей способности сыворотки крови [7]. Для более прямого анализа тонких изменений в относительной представленности разных форм Tf, потенциально связанных с патологическим процессом, могут быть использованы специфические антитела. Недавно авторы данного исследования смогли получить и охарактеризовать, по-видимому, первые такие высокоспецифические однодоменные антитела (нанотела), узнающие преимущественно holo-Tf (aTf1) или apo-Tf (aTf2) [8]. Было показано, что параллельное использование иммуносорбентов, создаваемых на основе этих нанотел, потенциально может выявлять изменения в относительной представленности apo- и holo-Tf в биологических жидкостях человека. Так, с помощью метода, основанного на иммуноаффинной хроматографии и последующего электрофоретического фракционирования специфически связавшихся и затем элюированных изоформ трансферрина, мы недавно продемонстрировали заметное уменьшение доли железонасыщенного трансферрина (holo-Tf) относительно свободного от железа трансферрина (apo-Tf) в плазме крови больных раком яичников женщин [6]. Если в норме отношение holo-Tf/apo-Tf определялось в диапазоне 30–55%/45–70%, то у больных раком яичников

это соотношение — 10–23%/77–95%. Полученные результаты наглядно демонстрируют эффективность данного метода анализа, и его применение может быть ценным дополнением при выборе тактики лечения онкологических больных с разными формами железодефицита, а также при формировании группы риска среди больных с новообразованиями яичников.

В представленной работе с помощью специально разработанной аффинной хроматографии со стадией элюции при нейтральном значении pH мы показали, что полученные ранее два нанотела обладают альтернативной специфичностью и способны связывать в биологических жидкостях человека или только тот эпитоп Tf, который формируется в отсутствие связи Tf (доли Tf) с ионами металлов (эпитоп аро-Tf), или альтернативный эпитоп Tf (доли Tf), для формирования которого требуется связь Tf с ионами металлов (эпитоп holo-Tf). Иммуносорбенты на основе этих нанотел были затем использованы с целью анализа диагностического потенциала как уровня общего Tf, так и соотношения holo-Tf и аро-Tf в образцах мочи больных раком мочевого пузыря (РМП) на разных стадиях болезни. Нам удалось показать прямую количественную ассоциацию общего Tf с прогрессом РМП. Для большинства образцов мочи мы наблюдали ожидаемое заметное уменьшение доли holo-Tf относительно аро-Tf, как это ранее было показано для Tf в крови больных раком яичников женщин [6]. Вместе с тем в ряде проб мочи больных РМП мы обнаружили неожиданное (в сравнении с большинством других исследованных в этой работе проб) относительное увеличение доли Tf, выделяемого с помощью нанотел aTf1, связывающих holo-Tf. Известно, что раковые клетки, как правило, требуют повышенное количество ионов железа, что должно приводить к относительному уменьшению holo-Tf. Для объяснения наблюдаемых эпизодических случаев увеличения доли holo-Tf в моче некоторых больных РМП мы выдвинули гипотезу о том, что выявляемый «holo-Tf» может состоять в значительной мере из вторичных комплексов, образованных аро-Tf в соединении с ионами, отличными от  $Fe^{3+}$  и накапливающимися в моче ракового больного. Связывание аро-Tf с такими ионами предположительно меняет конформацию Tf, делая доступными эпитопы, характерные именно для holo-Tf, которые узнаются holo-Tf-специфическим нанотелом. Мы получили первые подтверждения данной гипотезы с помощью анализа ионов металлов в препарате «holo-Tf» в образцах мочи методом масс-спектрометрии

с ионизацией в индуктивно-связанной плазме (МС-ИСП). Препарат «holo-Tf» в образцах мочи, где не было явного преобладания аро-Tf, оказался сильно обогащен цинком и никелем. Полученные данные указывают на то, что используемое нанотело, узнающее преимущественно железо-насыщенную форму трансферрина (holo-Tf), способно также связывать трансферрин в ассоциации с иными ионами металлов, отличными от железа. Эта способность потенциально может открыть новые возможности в исследованиях относительной представленности разных ионов металлов в ассоциации с трансферрином в биологических жидкостях человека в норме и патологии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Образцы мочи и плазмы крови.** В работе использовали образцы мочи 13 первичных больных, находящихся на лечении по поводу РМП в отделении онкоурологии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена — филиала «НМИЦ радиологии» Минздрава России (таблица). У 12 больных диагностирована уротелиальная карцинома мочевого пузыря, представленная в большинстве случаев (8) немышечно-инвазивным РМП — № 2–9. Мышечно-инвазивный рак диагностирован у 4 пациентов — № 10–13. У одного пациента были обнаружены доброкачественные новообразования мочевого пузыря (№ 1). Постановку диагноза и классификацию заболеваний проводили в соответствии с клиническими рекомендациями Минздрава России (протокол от 20.12.2019 г. № 10/2-3-4). Образцы утренней мочи вскоре после получения транспортировали из Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена в Институт биологии гена РАН, где их сразу подвергали низкоскоростному центрифугированию (2000 g, 15 мин) при комнатной температуре. Аликвоты супернатантов помещали на хранение в морозильник на  $-80^{\circ}C$ . Образцы утренней мочи здоровых доноров брали у добровольцев разного пола, не отличающихся значимо по возрасту от больных РМП исследуемой группы.

Плазма крови здорового донора получена в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба — филиале «НМИРЦ» Минздрава России.

**Работа с нанотелами, создание и использование иммуносорбентов.** Мы использовали продуценты нанотел, а также протоколы наработки и очистки адаптированных нанотел, узнающих

Характеристика проб мочи больных РМП

| №/Диагноз<br>(а, б, в) | Пол | Возраст<br>(годы) | Стадия<br>(TNM) | Степень<br>злокачественности* | Белок (Б)<br>г/литр | Креатинин (Кр)<br>г/литр | Б/Кр  |
|------------------------|-----|-------------------|-----------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------|-------|
| 1 <sup>а</sup>         | Ж   | 74                | —               | —                             | 0,079               | 1,513                    | 0,052 |
| 2 <sup>б</sup>         | М   | 54                | pT1N0M0         | G1                            | 0,186               | 2,720                    | 0,068 |
| 3 <sup>б</sup>         | М   | 61                | pT1N0M0         | G1                            | 0,139               | 5,328                    | 0,026 |
| 4 <sup>б</sup>         | М   | 31                | cT1N0M0         | G1                            | 0,035               | 1,157                    | 0,031 |
| 5 <sup>б</sup>         | Ж   | 79                | pT1N0M0         | HG (G2)                       | 0,371               | 3,589                    | 0,103 |
| 6 <sup>б</sup>         | М   | 71                | pT1N0M0         | HG (G2)                       | 0,624               | 5,782                    | 0,108 |
| 7 <sup>б</sup>         | М   | 58                | pT1N0M0         | HG (G2)                       | 0,373               | 2,300                    | 0,162 |
| 8 <sup>б</sup>         | Ж   | 44                | pT1N0M0         | HG (G2)                       | 0,233               | 0,496                    | 0,470 |
| 9 <sup>б**</sup>       | Ж   | 83                | pT1N0M0         | —                             | 1,345               | 1,522                    | 0,884 |
| 10 <sup>в</sup>        | М   | 81                | pT2N0M0         | HG (G3)                       | 0,943               | 2,839                    | 0,332 |
| 11 <sup>в</sup>        | М   | 62                | pT2N0M0         | HG                            | 1,865               | 1,755                    | 1,063 |
| 12 <sup>в**</sup>      | Ж   | 68                | pT2N0M0         | —                             | 1,947               | 0,983                    | 1,980 |
| 13 <sup>в</sup>        | М   | 62                | pT4aN1M0        | HG (G4)                       | 0,757               | 0,128                    | 5,896 |

Примечание. Диагноз: <sup>а</sup> — доброкачественное новообразование (№ 1); <sup>б</sup> — немышечно-инвазивный РМП (№ 2–9); <sup>в</sup> — мышечно-инвазивный РМП (№ 10–13).

\* Высокая степень злокачественности, низкодифференцированная опухоль — HG (high-grade), G2–G4; низкая степень злокачественности, высокодифференцированная опухоль — LG (low grade), G1.

\*\* Установить степень злокачественности клеток не удалось для данного образца.

holo-Tf (aTf1) или apo-Tf (aTf2), которые совсем недавно были получены и описаны соавторами данной статьи [8]. Получаемые нанотела содержат на C-конце длинную линкерную последовательность (28 аминокислот длинного варианта шарнирного участка неканонического верблюжьего антитела), после которой идут два пептидных фрагмента: гемагглютинин (НА)-таг, позволяющий детектировать нанотело с помощью коммерческих антител к этому пептиду, и последовательность из 6 остатков гистидина (His-таг), позволяющая эффективно очищать содержащий ее белок с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni<sup>2+</sup>-NTA-агарозе, используя HIS-Select Nickel Affinity Gel («Sigma-Aldrich», США). Линкерный линейный участок содержит 4 удобно расположенных и хорошо доступных остатка лизина. По этим остаткам очень удобно проводить химические реакции пришивки других молекул, в том числе иммобилизовать нанотело на CNBr-сефарозе. Адаптированные нанотела пришивали к CNBr-активированной сефарозе 4В («GE Healthcare Life Sciences», США), согласно рекомендациям производителя, и как

описано ранее [8, 9]. Примерно 300 мкг нанотел брали для пришивки на каждые 100 мкл сефарозы. Таким образом получали иммуносорбенты (иммуоаффинные колонки), специфичность которых определялась свойствами иммобилизованного нанотела. Эти иммуносорбенты использовали, как описано ранее [8, 9]. Опыты с разными образцами мочи, нормализованными (выравненными) относительно концентрации креатинина и соответственно разбавленными не менее чем в 2 раза в 1× PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), проводили параллельно на отдельных колонках. Промывку несвязавшегося материала проводили 1× PBS в три этапа 10-кратным объемом колонки, и затем связавшийся материал элюировали 0,1 M Glycine-HCl (pH 2,5) в три этапа 3-кратным объемом колонки с последующей нейтрализацией элюата до pH 7,0 добавлением 1 M Tris.

Эксперименты по иммобилизации адаптированных нанотел на Ni<sup>2+</sup>-NTA-агарозе и последующему иммуоаффинному фракционированию компонентов плазмы крови подробно описаны ниже.

**Электрофорез белков.** Электрофоретический анализ белков обычно проводили в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ по Лэммли, как описано нами ранее [8, 9]. Использовали прибор MiniProtean 3 («Bio-Rad», США), источник питания — Эльф-4 («ДНКТехнология», Россия). В качестве белкового маркера использовали либо Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder («Thermo Fisher Scientific», США), либо Precision Plus Protein Standards Dual Color («Bio-Rad»). В качестве маркеров использовали также коммерческие препараты holo-Transferrin human (holo-Tf), apo-Transferrin human (apo-Tf) фирмы «Sigma-Aldrich» и препарат рекомбинантного растворимого рецептора трансферрина sTfR («HyTest», Россия).

Для разделения apo-Tf и holo-Tf использовали электрофорез в «неденатурирующем» ПААГ, разработанный Nowakowski et al. [10] (в модификации, представленной на интернет-странице BraunLab — [https://braunlab.de/?page\\_id=176](https://braunlab.de/?page_id=176)), который мы адаптировали для эффективного разделения holo-Tf и apo-Tf [8]. Использовали 8%-ный разделяющий и 4%-ный концентрирующий гели. По окончании электрофореза гель отмывали в дистиллированной воде (3 раза по 5 мин), затем окрашивали белки в Imperial™ Protein Stain («Thermo Fisher Scientific»). Подготовку проб для электрофоретического фракционирования белков в различных образцах проводили, как описано ранее [9, 10]. Объемы аликвот определяли в каждом конкретном случае. Объем наносимой на гель пробы уменьшали, концентрируя белки с помощью фильтрационно-центрифужных приспособлений Amicon («Millipore», США) с размером отсечения 10 кДа, или осаждали, используя метод Wessel–Fluegge [11].

**Измерение концентрации креатинина и общего белка в образцах мочи.** Количественное содержание креатинина и общего белка определяли с помощью анализатора мочи URiSCAN-БК («Эйлитон», Россия) и наборов реагентов той же фирмы для количественного определения содержания креатинина (Креатинин-UTS) и белка (ПГК-UTS) в моче, согласно протоколу фирмы-изготовителя.

**Масс-спектрометрия с ионизацией в индуктивно-связанной плазме.** Препараты для анализа получали в результате иммуноаффинной хроматографии аликвот биологических жидкостей на колонках с иммобилизованным нанотелом (aTf1), узнающим holo-Tf. Препараты (элюаты с колонок) нормировали по количеству трансферрина (100 мкг) и передавали на анализ в одинаковых объемах (300 мкл). Для измерения раствор разбавляли в 10 раз

3%-ной азотной кислотой. Измерения проводились на квадрупольном масс-спектрометре SUPEC 7000 («Focused Photonics Inc», Китай) с ионизацией в индуктивно-связанной плазме. Детектирование ионов осуществлялось электронным умножителем, сохраняющим линейность в диапазоне 9–10 порядков величины, что достигается автоматическим переключением между режимами счета импульсов и аналоговым. Калибровку чувствительности прибора по всей шкале масс проводили по эталонным 68-элементным калибровочным растворам А и В (ICP-MS-68A; «HPS», США), включающим все анализируемые элементы в пробах. Для контроля качества измерений и учета дрейфа чувствительности прибора анализы образцов чередовали с анализами эталонного образца с периодичностью 1 : 10. В качестве внутреннего стандарта в пробы вводили индий в концентрации 10 нг. Относительная погрешность анализа составляла 0,5–2%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В непосредственно предшествующих данному исследованию экспериментах, которые были совсем недавно опубликованы [8], мы описали получение и продемонстрировали потенциал применения (в формате иммуносорбентов) высокоспецифических однодоменных антител (нанотел), узнающих преимущественно holo-Tf (aTf1) или apo-Tf (aTf2) человека. Нам удалось подобрать вариант «неденатурирующего» ПААГ-электрофореза, в котором, в отличие от более традиционного электрофореза в SDS-ПААГ, очень сильно различаются электрофоретические подвижности двух форм трансферрина, apo-Tf и holo-Tf, что позволяет их количественно оценивать в образце биологической жидкости человека.

В недавно опубликованной работе, посвященной анализу форм Tf в сыворотках крови больных раком яичников [6], мы с другими соавторами продемонстрировали, что с помощью полученных анти-Tf-нанотел, пришитых к сефарозе, удается с очень высокой специфичностью выделять трансферрин из сыворотки крови человека. При фракционировании в SDS-ПААГ связавшихся и затем элюированных белков мы детектировали практически только один белок — трансферрин. Используя эти же нанотела, а также разработанные методы фракционирования разных форм Tf, в данной статье мы сфокусировали внимание на исследовании Tf в моче больных раком мочевого пузыря.

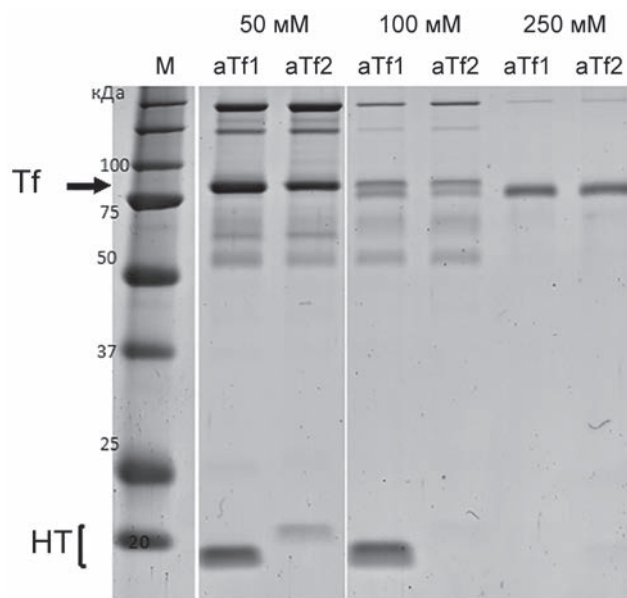


В ранее проводимой работе [8] для исследования связываемых иммобилизованными на сефарозе нанотелами разных изоформ трансферрина, разделяя связавшиеся белки в «неденатурирующем» ПААГ, мы использовали коммерческие препараты Tf (holo-Tf и apo-Tf фирмы «Sigma-Aldrich»), которые содержали примеси друг друга. При иммуноаффинной хроматографии для элюции связавшихся белков использовали кислые значения pH, при которых могли разрушаться комплексы Tf с железом и holo-Tf мог превращаться в apo-Tf, как это происходит в эндосомах *in vivo*. Указанные факторы могли влиять на получаемый результат соотношения связываемых нанотелами разных изоформ трансферрина. В предварительных экспериментах в этой работе мы попытались исключить эти факторы, чтобы уточнить степень специфичности используемых нанотел для разных форм Tf в биологических жидкостях человека. В качестве источника Tf мы взяли сначала свежесывороточную плазму крови нашего коллеги-добровольца (взятую в медицинском учреждении в тот же день без заморозки), а адаптированные нанотела были иммобилизованы на  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозе благодаря присутствию His-тага на их C-конце. Впоследствии иммобилизованное нанотело и связавшийся с ним белок могут быть аффинно проэлюированы раствором, содержащим высокую концентрацию имидазола, при нейтральном значении pH. В данном методе основным нежелательным фоновым эффектом является способность некоторых белков плазмы крови связываться напрямую с  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозой. Мы попытались учесть этот факт и провели тщательный подбор условий фракционирования.

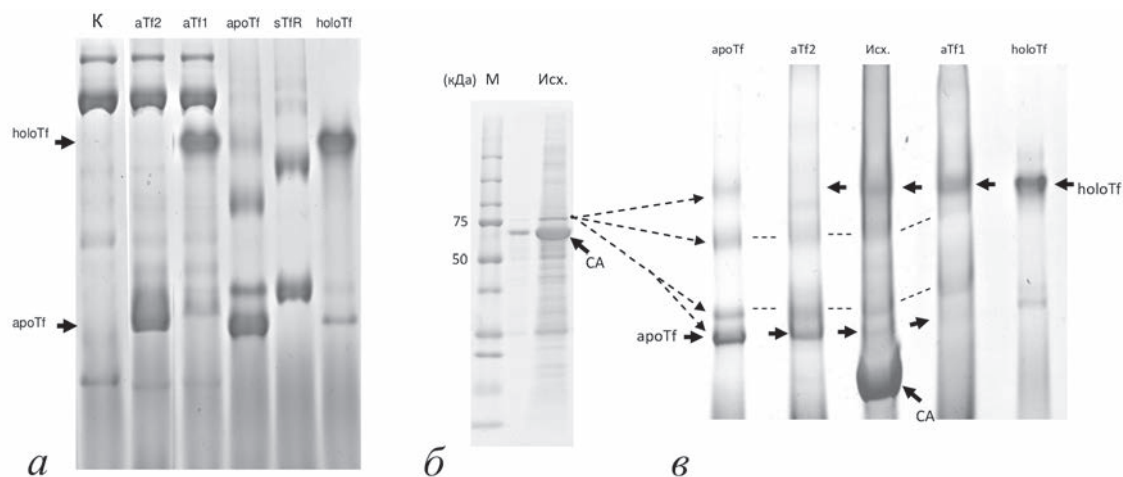
Плазму крови (250 мкл), разведенную в 3 раза  $1\times$  PBS (до 750 мкл), пропускали один раз через колонку с иммобилизованными нанотелами (использовали колонку объемом 500 мкл, на которой было иммобилизовано примерно 1,5 мг нанотел). Колонку промывали трижды тремя объемами  $1\times$  PBS с 10 мМ имидазола, затем проводили аффинную элюцию в том же растворе, увеличивая ступенчато концентрацию имидазола: 25, 50, 100 и 250 мМ. Каждый этап элюции включал добавление элюирующего раствора 3 раза по 500 мкл. Белки в полученных элюатах анализировали с помощью электрофореза в градиентном SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях. Как видно на рис. 1, основная часть Tf в комплексе с нанотелом элюировалась в присутствии 50 мМ имидазола, меньшая часть — 100 мМ имидазола. При предваритель-

ной элюции 25 мМ имидазола белки в элюате не детектировали (не показано). Из предыдущих наших опытов с аналогично модифицированными нанотелами мы знаем, что они обычно элюируются при концентрации имидазола выше 75 мМ. Из совокупности данных мы предполагаем, что после связывания с Tf у данных нанотел немного уменьшается прочность связи с  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозой, и комплексы нанотела с трансферрином элюируются при меньших концентрациях имидазола, чем свободное нанотело. При 250 мМ элюируется белок размером чуть меньше, чем Tf, без нанотел, по-видимому, связавшийся непосредственно с  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозой. Из полученного результата мы заключили, что для данного метода фракционирования оптимальным для элюции комплексов трансферрина, связавшегося с нанотелом, будет использование 70 мМ имидазола, а  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозу следует максимально загружать иммобилизуемыми нанотелами (по крайней мере 5 мг нанотел на 1 мл колонки), чтобы максимально насытить колонку нанотелом и таким образом, по возможности, максимально экранировать прямое связывание белков плазмы, включая Tf, с  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозой.

В таких предположительно оптимизированных условиях мы провели иммуноаффинную



**Рис. 1.** Подбор условий элюции разными концентрациями имидазола (50 мМ, 100 мМ и 250 мМ) белков плазмы крови, связавшихся иммуносорбентами, приготовленными на основе нанотел (НТ: aTf1 или aTf2), иммобилизованных на  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозе. Представлена электрофореграмма белков, фракционированных в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ. Стрелкой показано положение трансферрина (Tf). В крайней левой дорожке нанесен маркер (M) и указаны размеры (кДа) маркерных полос



**Рис. 2.** Электрофоретический анализ в «неденатурирующем» 8%-ном BisTris-ПААГ (*а* и *в*) связавшихся белков и трансферрина (Тf) плазмы крови здорового донора (*а*) или мочи больного РМП (*в*) с нанотелами (aTf1, aTf2 и К – контрольными нанотелами, не связывающими Тf), содержащими His-таг и иммобилизованными на  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозе. Маркерные белки: апо-Тf, holo-Тf и sTfR. *б* – Электрофорез в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ исходного образца белков мочи (Исх.) того же больного. Стрелками обозначены места локализации на геле апо-Тf и holo-Тf; пунктиром обозначены потенциальные формы Тf; М – маркер; СА – сывороточный альбумин

хроматографию с тремя подготовленными колонками, две из которых содержали иммобилизованные нанотела aTf1 и aTf2, а третья, контрольная (К), была насыщена ранее нами полученными нанотелами, которые не узнают мажорные белки человека. Плазму крови (500 мкл) пропускали один раз через колонку с иммобилизованными на  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозе нанотелами (на колонке объемом 500 мкл было иммобилизовано примерно 3 мг нанотел). Колонку промывали трижды тремя объемами  $1 \times \text{PBS}$  с 10 мМ имидазола, затем проводили аффинную элюцию тремя объемами элюирующего раствора с 70 мМ имидазола. Белки в полученных элюатах анализировали с помощью электрофореза в «неденатурирующем» геле. На рис. 2, *а* представлены полученные результаты электрофореза в «неденатурирующем» 8%-ном BisTris-ПААГ связавшихся белков и трансферрина (Тf) плазмы крови с нанотелами, иммобилизованными на  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозе.

Можно наглядно видеть полосы, соответствующие белкам плазмы крови, специфически (в отношении используемых нанотел) или неспецифически (как фон с  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозой, аналогичный фону в случае колонки с неспецифическим нанотелом, К) связывающиеся с используемыми иммуносорбентами. В качестве маркерных белков были использованы коммерческие препараты апо-Тf, holo-Тf и sTfR1 (растворимый рецептор трансферрина 1). Данные результаты нужно рассматривать как дополнительные к полученным нами же ранее [6, 9], в которых уже была показана высокая специфичность к трансферрину используемых нанотел. В данном случае нам удалось

продемонстрировать в условиях более приближенных к физиологическим, чем в предыдущих экспериментах, что нанотела aTf1 и aTf2 действительно обладают чрезвычайно высокой специфичностью связывания разных форм Тf из плазмы крови человека и являются на сегодняшний день уникальными инструментами для исследований соотношения разных форм Тf в биологических жидкостях. Можно видеть, что апо-Тf-специфическое нанотело aTf2 вообще не связывает железо-насыщенный holo-Тf и при этом связывает мажорный белок, аналогичный по подвижности основной полосе маркерного препарата апо-Тf. В то же время нанотело aTf1 эффективно связывает именно holo-Тf. Мы предполагаем, что каждое из используемых нанотел потенциально способно связывать также формы Тf, в которых только одна из двух долей (N- или C-) связана с ионом железа (металла). Эти промежуточные формы, скорее всего, должны разделяться при используемом электрофорезе, и, возможно, их (и их посттрансляционно модифицированные формы) мы видим как специфические минорные полосы (в элюатах каждого из двух иммуносорбентов с анти-Тf-нанотелами) в дополнение к неспецифическим фоновым белкам, сорбирующимся непосредственно на  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозе [12] и выявляемых также и в контрольной дорожке на рис. 2, *а*.

Применение  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозы для связывания трансферрина хоть и позволяет на «неденатурирующем» геле детектировать формы трансферрина, движущиеся в этом случае с существенно различающейся подвижностью, не подвергая их воздействию кислых условий

элюирования с CNBr-сефарозы, но и приводит к визуализации прочих связывающихся непосредственно с  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозой белков (представлены в контрольной пробе, К, на рис. 2, а). На более традиционном SDS-ПААГ, в отличие от «неденатурирующего» геля, все формы Tf движутся с одинаковой подвижностью, что было показано нами ранее [6, 9].

Аналогично описанному выше эксперименту с плазмой крови здорового донора мы провели иммуноаффинную хроматографию и последующее фракционирование связавшихся белков в «неденатурирующем» ПААГ для образца мочи больного РМП (на рис. 2, в представлен результат для образца № 8 из таблицы, в котором выявляются как apoTf, так и holoTf). Аликвота мочи (2500 мкл) была сконцентрирована в 10 раз (до 250 мкл) и один раз пропущена через колонку с иммобилизованными на  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозе нанотелами (использовали колонку объемом 100 мкл, на которой было иммобилизовано примерно 600 мкг нанотел). Колонку промывали трижды тремя объемами  $1 \times \text{PBS}$  с 10 мМ имидазола, затем проводили аффинную элюцию тремя объемами элюирующего раствора с 70 мМ имидазола. Белки в полученных элюатах анализировали с помощью электрофореза в градиентном «неденатурирующем» (6–10%) BisTris-ПААГ. На рис. 2, б представлено фракционирование в SDS-ПААГ исходного образца белков мочи. Из нашей предыдущей работы с этим образцом [9] мы знаем, что самым мажорным белком в нем является сывороточный альбумин (СА, он полностью уходит в проскок), а Tf присутствует в существенно увеличенном по сравнению с нормой количестве (от соответствующей ему полосы на рис. 2, в отходят стрелки). Из представленного результата можно видеть, что и здесь, как в случае плазмы крови, apo-Tf-специфическое нанотело aTf2 вообще не связывает железо-насыщенный holo-Tf и при этом связывает мажорный белок, аналогичный по подвижности основной полосе маркерного препарата apo-Tf. В то же время нанотело aTf1 эффективно связывает именно holo-Tf. Пунктирными линиями на рис. 2, в обозначены положения других минорных предполагаемых форм трансферрина, в которых только одна из двух долей (N- или C-) связана с ионом железа (металла). Такие формы, как можно предположить, особенно хорошо видны в коммерческом маркерном препарате apo-Tf.

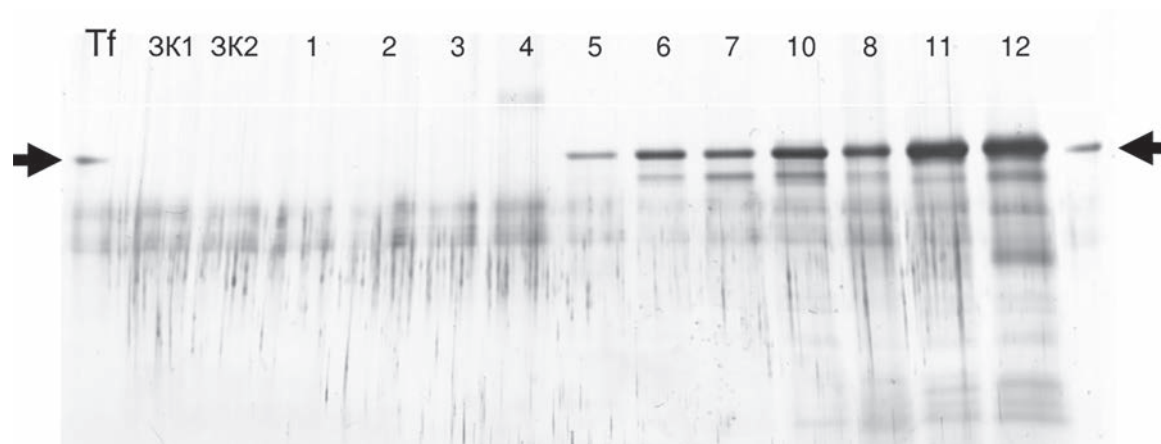
Убедившись дополнительно в высокой специфичности связывания Tf из биологической жидкости с помощью иммобилизованных нанотел aTf1 и aTf2 и описанного выше метода,

мы для последующих параллельных анализов форм трансферрина в образцах мочи больных раком мочевого пузыря решили использовать иммуносорбенты с нанотелами, пришитыми к сефарозе, и проводить фракционирование связавшихся, а затем элюированных белков в SDS-ПААГ.

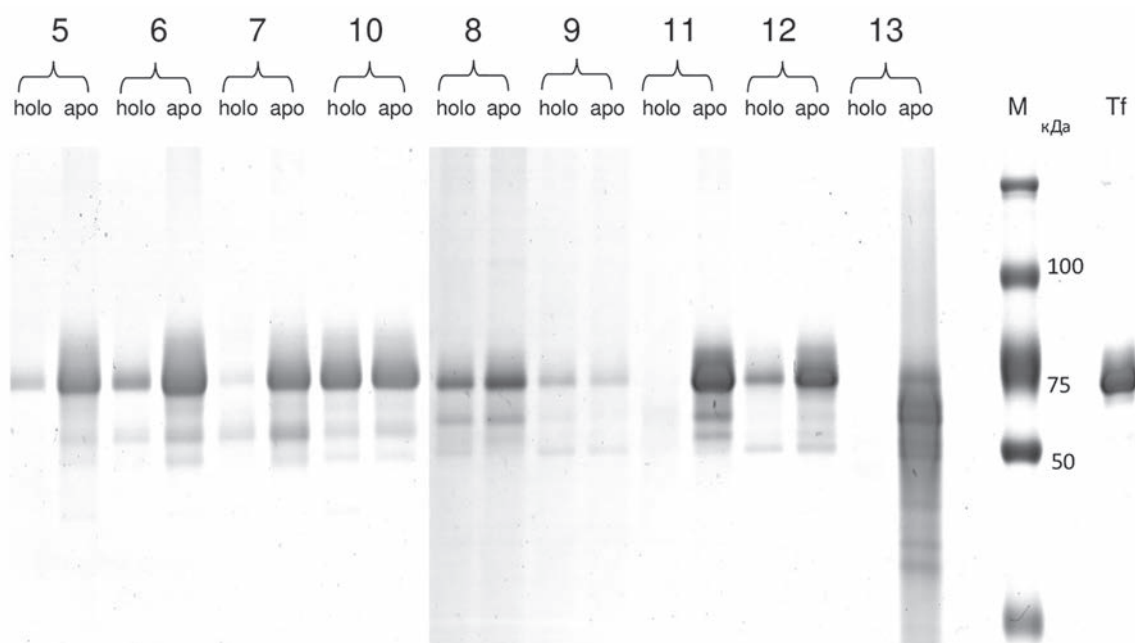
В последующей работе были использованы аннотированные образцы мочи 13 первичных больных с диагнозом рак мочевого пузыря (таблица). Во всех образцах мы определили концентрации креатинина (Кр) и общего белка (Б). Полученные данные приведены в таблице. Из представленных данных можно видеть, что отношение концентрации белка к концентрации креатинина в моче прямо коррелирует со степенью прогресса РМП от немышечно-инвазивных к мышечно-инвазивным и более злокачественным стадиям болезни.

Далее, мы провели сравнительный количественный анализ общего Tf в образцах мочи указанных в таблице больных, нормализованных (выравненных) относительно концентрации креатинина в этих образцах. Для фракционирования брали алиquotы (500 мкл) исходных образцов мочи больных и разводили их в 2 раза в  $1 \times \text{PBS}$ . Контрольные образцы мочи здоровых доноров (3К1, 3К2) брали по 14 мл и концентрировали в 14 раз. Все пробы параллельно были пропущены через индивидуальные 100 мкл колонки с предварительно иммобилизованными на CNBr-сефарозе нанотелами (300 мкг на 100 мкл колонки). Элюаты осаждали по Wessel–Fluegge, растворили в буфере для нанесения на гель (для электрофорезов по Лэммли) и наносили на гель алиquotы, соответствующие относительным объемам исходных образцов, выравненных по креатинину. Белки в полученных элюатах анализировали с помощью электрофореза в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях. На рис. 3 представлен результат электрофореза объединенных элюатов (общего Tf) из нормализованных образцов мочи. Видно, что повышение концентрации общего Tf в образцах мочи ассоциировано со степенью прогресса и роста злокачественности РМП. В образцах здоровых доноров и на ранних стадиях РМП (G1) Tf присутствует в сильно меньших количествах (его можно увидеть при концентрировании и нанесении соответствующих образцов в 10-кратных количествах), кроме того, использовался высокочувствительный метод окрашивания серебром [13] для детекции малопредставленного в исследуемых препаратах мочи трансферрина. Данный метод окрашивания используется для более чувствительной





**Рис. 3.** Детекция трансферрина в образцах мочи больных РМП, нормализованных по креатинину, в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ. Указаны номера образцов из таблицы. В двух крайних лунках (по бокам) нанесен коммерческий препарат Tf как маркер; 3K1 и 3K2 – образцы мочи здоровых доноров



**Рис. 4.** Детекция разных форм трансферрина (holo-Tf и apo-Tf) в образцах мочи больных РМП (указаны номера образцов из таблицы), нормализованных по креатинину. Элюаты белков, полученные в результате проведения иммуноаффинных хроматографий на колонках с нанотелами aTf1 (holo-Tf+) или aTf2 (apo-Tf+), фракционированы в градиентном (5–19%) SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях. Справа нанесены маркер (M) и коммерческий препарат трансферрина (Tf)

детекции белков на электрофореграмме, что, в свою очередь, приводит к усилению сигнала не только целевых белков, но и фоновых, что видно на данном изображении. Известно, что в раковых клетках активируются различные клеточные стрессы, такие как репликативный, протеотоксический, окислительный [14], которые могут приводить к деградации белков, и на продвинутых стадиях развития РМП часто выявляют деградацию белков. В наших экспериментах мы, предположительно, видим такую частичную деградацию трансферрина (в образцах с 6 по 12 на рис. 3).

В образцах мочи, где детектировали Tf, провели исследование относительной представленности разных форм Tf с помощью иммуносорбентов на основе нанотел aTf1 и aTf2. Колонки с иммобилизованными нанотелами были взяты с большим запасом по емкости (600 мкг нанотела на 100 мкл объема колонки), чтобы надежно связать весь соответствующий компонент из образца мочи. На рис. 4 представлены полученные результаты.

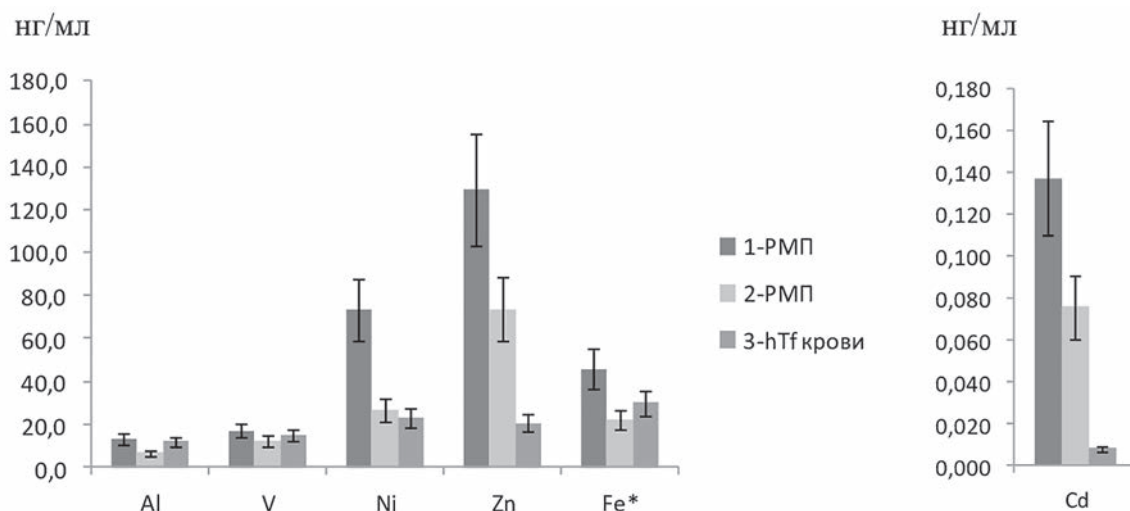
Для большинства исследованных образцов ожидаемо (как в случае Tf в крови больных раком яичников поздних стадий) концентрация



аро-Tf выше, чем holo-Tf, особенно в случае наиболее продвинутого мышечно-инвазивного РМП (образцы № 11, 12 и 13). В образце № 13 наблюдается деградация в элюате аро-Tf и полное отсутствие белка в элюате holo-Tf. Подобная экстремальная картина в случае образца № 11, где практически нет holo-Tf и очень много аро-Tf. Отметим, что в элюатах выявляются белковые продукты, движущиеся при электрофорезе быстрее Tf. Помимо потенциально возможной деградации Tf, эти продукты могут соответствовать и другим белкам, ассоциированным с Tf. Например, это могут быть мажорные белки экстраклеточных везикул, на поверхности которых находится Tf. Это, конечно же, только наше предположение и вопрос будущего специального изучения. В приведенных на рис. 4 результатах вызывает особые вопросы детекция почти одинаковых количеств обеих форм Tf в образцах № 8–10. Этот результат для нас оказался неожиданным. Для его объяснения мы выдвинули гипотезу: наблюдаемый «holo-Tf» может быть результатом формирования вторичных комплексов, образуемых аро-Tf в соединении с ионами, отличными от  $\text{Fe}^{3+}$ , но накапливающимися в моче ракового больного и способными при недостатке ионов  $\text{Fe}^{3+}$  связываться с аро-Tf, меняя его конформацию и делая доступными эпитопы, характерные именно для holo-Tf, которые узнаются holo-Tf-специфическим нанотелом aTf1.

Для проверки предположенной гипотезы мы провели масс-спектрометрический анализ с ионизацией в индуктивно-связанной плазме препаратов «holo-Tf», выделенных из мочи больных РМП (№ 8 и № 10), в которых

были выявлены сопоставимые количества аро- и holo-Tf. Метод МС-ИСП отличается очень высокой чувствительностью и способностью определять в одном образце сразу многие металлы. Препараты для анализа получали в результате иммуноаффинной хроматографии аликвот биологических жидкостей на колонках с иммобилизованным нанотелом (aTf1), узнающим holo-Tf. Препараты (элюаты с колонок) нормировали по количеству трансферрина (100 мкг) и передавали на анализ в одинаковых объемах (300 мкл). Для измерения раствор разбавляли в 10 раз 3%-ной азотной кислотой. В качестве контроля брали аналогично приготовленный и нормированный препарат «holo-Tf» из плазмы крови здорового донора. Первые полученные результаты МС-ИСП количественного определения ряда выбранных ионов металлов (Al, V, Cr,  $\text{Fe}^*$ , Co, Ni, Cu, Zn, Y, Cd), ассоциированных с Tf в моче указанных больных и в крови здорового донора, представлены на рис. 5 (указаны данные для выявляемых металлов с учетом вычитаемого фона используемых буферных растворов). Cr, Co, Cu, Y не были детектированы во всех пробах «holo-Tf». Представленные результаты о детектированных металлах подтверждают предположенную нами гипотезу. Препараты «holo-Tf» в этих образцах мочи оказались сильно обогащены цинком и никелем, по сравнению с препаратом «holo-Tf» из крови здорового донора, тогда как ионы алюминия (Al) и ванадия (V) определялись в примерно одинаковых концентрациях. Также в этих препаратах наблюдается относительное обогащение кадмием, но он присутствует в сильно меньших концентрациях (в правой части рис. 5).



**Рис. 5.** Результаты определения методом МС-ИСП концентраций металлов (в нг/мл), присутствующих в наибольших количествах в образцах мочи № 10 (1-РМП) и № 8 (2-РМП) и крови (hTf крови), нормированных на 100 мкг «holo-Tf». Представлены средние данные двух измерений с указанием доверительного интервала

Полученные данные указывают на то, что используемое нанотело aTf1, узнающее преимущественно железо-насыщенную форму трансферрина (holo-Tf), способно также связывать трансферрин в ассоциации с иными ионами металлов, отличными от железа. Эта способность потенциально может открыть новые возможности в исследованиях относительной представленности разных ионов металлов в ассоциации с трансферрином в биологических жидкостях человека в норме и патологии.

В проведенных измерениях для всех ионов металлов, кроме ионов железа, были получены надежные результаты с хорошим совпадением соответствующих данных калибровки. В случае ионов железа ( $\text{Fe}^{3+}$ ) было выявлено неполное совпадение измеряемого значения в образце с соответствующей калибровочной полосой, что могло немного исказить результат определения. Одним из объяснений этого может быть известный факт, что гидроксид железа  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , который может образовываться при высвобождении ионов железа от Tf при элюции в кислых условиях holo-Tf, связавшегося с иммобилизованным на сефарозе нанотелом, плохо растворим и, в отличие от гидроксидов других металлов, выпадает в осадок при значениях pH от 2 до 8 [15].

Полученные результаты вполне согласуются с данными других исследований. Так, известно, что железо-ненасыщенный apo-Tf, мажорный вариант трансферрина в крови (примерно 2 мг/мл), способен связывать, помимо ионов железа, и многие другие поступающие в кровь ионы металлов [16], такие, как  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ . Трансферрин является важным сывороточным транспортным агентом для большинства ионов двух- и трехвалентных металлов. Предполагается, что трансферрин играет важную роль в транспорте  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{VO}^{2+}$  ( $\text{V}^{4+}$ ),  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Ru}^{3+}$  и  $\text{Bi}^{3+}$  — всех ионов металлов, имеющих потенциальное терапевтическое значение. Трансферрин может играть физиологическую роль в транспорте марганца в виде трехвалентного иона. Однако этот белок может также играть роль в переносе в ткани потенциально токсичных ионов  $\text{Al}^{3+}$  и актинидов, включая  $\text{Pu}^{4+}$  [16].

Известно, что в норме в крови человека только примерно 30% сайтов потенциально-го связывания  $\text{Fe}^{3+}$  в Tf уже задействовано, и остается много сайтов в N-доле, C-доле или обеих долях молекул Tf, которые потенциально могут связать многие другие ионы металлов при дефиците ионов железа [17, 18]. Показаны разные возможные механизмы связывания других ионов с Tf: посредством тех же, что и

для  $\text{Fe}^{3+}$  металлсвязывающих сайтов; с помощью смешанного связывания, когда один из сайтов уже связан с  $\text{Fe}^{3+}$ ; путем образования связи с белковой поверхностью Tf, в котором обе доли уже связаны с ионом железа. Tf потенциально с разной эффективностью может доставлять связанные с ним ионы металлов, отличные от канонического  $\text{Fe}^{3+}$ , в клетки посредством эндоцитоза, опосредованного рецептором трансферрина [19].

С другой стороны, была выявлена явная ассоциация между уровнями тяжелых металлов в моче с повышенным риском уротелиальной карциномы (самого частотного варианта РМП) [20]. Chang et al. [20] измеряли мышьяк, кадмий, хром, содержание никеля и свинца в моче 205 человек с РМП (уротелиальной карциномой) и 406 здоровых людей. Используя масс-спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой, они обнаружили, что в образцах мочи пациентов с РМП были значительно повышены концентрации кадмия, хрома и никеля по сравнению с образцами от здоровых людей. Повышенное количество определенных металлов в моче (таких, как цинк) может быть следствием приема определенных витаминов или особой диеты.

Доставка особых ионов металлов в клетки организма может иметь как токсический эффект для клетки, так и потенциально может быть использована для разработки новых терапевтических подходов лечения рака. Охарактеризованные нами нанотела могут быть полезным инструментом в этих исследованиях и разработках.

В качестве заключения отметим, что в данной работе с помощью уникальных инструментов, какими являются ранее нами полученные и дополнительно охарактеризованные в этой работе нанотела, специфически связывающие строго определенную форму трансферрина (или holo-Tf, или apo-Tf), нам впервые удалось провести анализ представленности этих форм трансферрина в образцах мочи больных раком мочевого пузыря и получить принципиально новые результаты. Мы показали, что повышение концентрации общего Tf в образцах мочи ассоциировано со степенью прогресса и роста злокачественности РМП. В образцах здоровых доноров и на ранних стадиях РМП (G1) Tf детектируется в сильно меньших количествах лишь при дополнительном концентрировании. Для большинства исследованных образцов мочи больных РМП ожидаемо (как в случае Tf в крови больных раком яичников поздних стадий) концентрация apo-Tf выше, чем holo-Tf,

особенно в случае наиболее продвинутого мышечно-инвазивного РМП. Неожиданностью стало обнаружение почти одинаковых количеств обеих форм Tf в ряде образцов мочи больных РМП. Это, по-видимому, объясняется тем, что фракция «holo-Tf» в данном случае в значительной степени представлена «вторичными комплексами», образуемыми apo-Tf в соединении с ионами, отличными от  $\text{Fe}^{3+}$ , накапливающимися в моче некоторых раковых больных и способными связываться с apo-Tf, меняя его конформацию в направлении holo-Tf. Методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме мы получили этому подтверждение. Препарат «holo-Tf» в этих образцах мочи оказался сильно обогащен цинком и никелем. Полученные данные указывают на то, что используемое нанотело, узнающее преимущественно железо-насыщенную форму трансферрина (holo-Tf), способно также связывать трансферрин в ассоциации с иными ионами металлов, отличными от железа. Эта способность потенциально может открыть новые возможности в исследованиях относительной представленности разных ионов металлов в ассоциации с трансферрином в биологических жидкостях человека в норме и патологии.

**Вклад авторов.** С.В. Тиллиб — концепция и руководство работой; А.М. Сачко, О.С. Горяй-

нова, Т.И. Иванова, С.В. Тиллиб — наработка нанотел, создание иммуноаффинных сорбентов, проведение экспериментов по выделению разных форм трансферрина; И.Ю. Николаева, М.Е. Тарнопольская, А.Ю. Бычков — проведение анализов методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме; М.Я. Гаас, Н.В. Воробьев, А.Д. Каприн, П.В. Шегай — поставка образцов мочи от охарактеризованных больных; С.В. Тиллиб — написание статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00305).

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

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные с участием биологических жидкостей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике, Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого участника, включенного в исследование, получено информированное добровольное согласие. Работа одобрена Этическими комитетами ИБГ РАН (разрешение от 18.01.2021) и Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Torti, S. V., and Torti, F. M. (2020) Iron: the cancer connection, *Mol. Aspects Med.*, **75**, 100860, doi: 10.1016/j.mam.2020.100860.
2. Candelaria, P. V., Leoh, L. S., Penichet, M. L., and Daniels-Wells, T. R. (2021) Antibodies targeting the transferrin receptor 1 (TfR1) as direct anti-cancer agents, *Front. Immunol.*, **12**, 607692, doi: 10.3389/fimmu.2021.607692.
3. Yiannikourides, A., and Latunde-Dada, G. O. (2019) A short review of iron metabolism and pathophysiology of iron disorders, *Medicines (Basel)*, **6**, 85, doi: 10.3390/medicines6030085.
4. Ramírez-Carmona, W., Díaz-Fabregat, B., Yuri Yoshigae, A., Musa de Aquino, A., Scarano, W. R., de Souza Castilho, A. C., Avansini Marsicano, J., Leal do Prado, R., Pessan, J. P., and de Oliveira Mendes, L. (2022) Are serum ferritin levels a reliable cancer biomarker? A systematic review and meta-analysis, *Nutr. Cancer*, **74**, 1917-1926, doi: 10.1080/01635581.2021.1982996.
5. Szőke, D., and Panteghini, M. (2012) Diagnostic value of transferrin, *Clin. Chim. Acta*, **413**, 1184-1189, doi: 10.1016/j.cca.2012.04.021.
6. Ivanova, T. I., Klabukov, I. D., Krikunova, L. I., Poluektova, M. V., Sychenkova, N. I., Khorokhorina, V. A., Vorobyev, N. V., Gaas, M. Ya., Baranovskii, D. S., Goryainova, O. S., Sachko, A. M., Shegay, P. V., Kaprin, A. D., and Tillib, S. V. (2022) Prognostic value of serum transferrin analysis in patients with ovarian cancer and cancer-related functional iron deficiency: a Retrospective case—control study, *J. Clin. Med.*, **11**, 7377, doi: 10.3390/jcm11247377.
7. Elsayed, M. E., Sharif, M. U., and Stack, A. G. (2016) Transferrin saturation: a body iron biomarker, *Adv. Clin. Chem.*, **75**, 71-97, doi: 10.1016/bs.acc.2016.03.002.
8. Tillib, S. V., Goryainova, O. S., Sachko, A. M., and Ivanova, T. I. (2022) High-affinity single-domain antibodies for analyzing human apo- and holo-transferrin, *Acta Naturae*, **14**, 98-102, doi: 10.32607/actanaturae.11663.
9. Тиллиб С. В., Горяйнова О. С., Сачко А. М., Иванова Т. И., Гаас М. Я., Воробьев Н. В., Каприн А. Д., Шегай П. В. (2022) Однодоменные антитела для предобработки протеома мочи человека с целью анализа онкобиомаркеров, *Молекулярная биология*, **56**, 671-684.

10. Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., and Petering, D. H. (2014) Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions, *Metallomics*, **6**, 1068–1078, doi: 10.1039/c4mt00033a.
11. Wessel, D., and Fluegge, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal. Biochem.*, **138**, 141–143, doi: 10.1016/0003-2697(84)90782-6.
12. Wang, F., Chmil, C., Pierce, F., Ganapathy, K., Gump, B. B., MacKenzie, J. A., Metchref, Y., and Bendinskas, K. (2013) Immobilized metal affinity chromatography and human serum proteomics, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **934**, 26–33, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.06.032.
13. Hochstrasser, D. F., Patchornik, A., and Merrill, C. R. (1988) Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining, *Anal. Biochem.*, **173**, 412–423, doi: 10.1016/0003-2697(88)90208-4.
14. Luo, J., Solimini, N. L., and Elledge, S. J. (2009) Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction, *Cell*, **136**, 823–837, doi: 10.1016/j.cell.2009.02.024.
15. Zapién Serrano, L. Z., Ortiz Lara, N. O., Ríos Vera, R. R., and Cholico-González, D. (2021) Removal of Fe(III), Cd(II), and Zn(II) as hydroxides by precipitation–flotation system, *Sustainability*, **13**, 11913, doi: 10.3390/su132111913.
16. Vincent, J. B., and Love, S. (2012) The binding and transport of alternative metals by transferrin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 362–378, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.07.003.
17. Williams, J., and Moreton, K. (1980) The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin human serum, *Biochem. J.*, **185**, 483–488, doi: 10.1042/bj1850483.
18. Sun, H., Li, H., and Sadler, P. J. (1999) Transferrin as a metal ion mediator, *Chem. Rev.*, **99**, 2817–2842, doi: 10.1021/cr980430w.
19. Benjamín-Rivera, J. A., Cardona-Rivera, A. E., Vázquez-Maldonado, Á. L., Dones-Lassalle, C. Y., Pabón-Colon, H. L., Rodríguez-Rivera, H. M., Rodríguez, I., González-Espiet, J. C., Pazol, J., Pérez-Ríos, J. D., Catala-Torres, J. F., Carrasquillo Rivera, M., De Jesus-Soto, M. D., Cordero-Virella, N. A., Cruz-Maldonado, P. M., González-Pagan, P., Hernández-Ríos, R., Gaur, K., Loza-Rosas, S. A., and Tinoco, A. D. (2020) Exploring serum transferrin regulation of nonferric metal therapeutic function and toxicity, *Inorganics*, **8**, 48, doi: 10.3390/inorganics8090048.
20. Chang, C. H., Liu, C. S., Liu, H. J., Huang, C. P., Huang, C. Y., Hsu, H. T., Liou, S. H., and Chung, C. J. (2016) Association between levels of urinary heavy metals and increased risk of urothelial carcinoma, *Int. J. Urol.*, **23**, 233–239, doi: 10.1111/iju.13024.

## ANALYSIS OF TRANSFERRIN IN URINE IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER USING NANOBODIES

A. M. Sachko<sup>1</sup>, O. S. Goryainova<sup>1</sup>, T. I. Ivanova<sup>1,2</sup>, I. Yu. Nikolaeva<sup>3</sup>,  
M. E. Tarnopolskaia<sup>3</sup>, A. Yu. Bychkov<sup>3</sup>, M. Ya. Gaas<sup>4</sup>, N. V. Vorob'ev<sup>5,6</sup>,  
A. D. Kaprin<sup>4,7</sup>, P. V. Shegay<sup>4,7</sup>, and S. V. Tillib<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,  
119334 Moscow, Russia; e-mail: tillib@genebiology.ru

<sup>2</sup> Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Medical Research Radiological Centre  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 249036 Obninsk, Russia

<sup>3</sup> Faculty of Geology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 117198 Moscow, Russia

<sup>5</sup> Hertsen Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Radiological Centre  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 125284 Moscow, Russia

<sup>6</sup> Sechenov First Moscow State Medical University  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991 Moscow, Russia

<sup>7</sup> National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
125284 Moscow, Russia

It is known that the saturation ratio of transferrin (Tf) with iron in human blood is an important clinical parameter. Specific antibodies can be used to analyze subtle changes in the relative abundance of different forms of transferrin potentially associated with a pathological process. Recently, the authors of this study were able to obtain and characterize highly specific single-domain antibodies (nanobodies) that predominantly recognize the iron-saturated (holo-Tf) or iron-unsaturated (apo-Tf) form of transferrin.



In this work, under conditions closer to physiological than in previous experiments, we further demonstrated that these unique nanobodies have extremely high differential binding specificity for different forms of Tf in different human biological fluids. Using these nanobodies, we were able to analyze for the first time the relative abundance of transferrin forms in urine samples from patients with bladder cancer (BC). We have shown that an increase in the concentration of total Tf in urine samples normalized for creatinine is associated with the degree of progress and growth of malignancy of BC. In the samples of healthy donors and in the early stages of BC (G1), Tf is detected in much smaller amounts (compared to later stages) and only with additional concentration of the studied samples. For most of the studied urine samples from BC patients, it is expected (as previously shown in the case of Tf in the blood of terminal ovarian cancer patients) that the concentration of apo-Tf is clearly higher than holo-Tf, especially in the case of the most advanced muscle-invasive BC. It was a surprise for us that approximately equal amounts of apo-Tf and “holo-Tf” were found in the urine samples of some patients with BC. We hypothesized that the “holo-Tf” fraction in this case can be largely represented by “secondary complexes” formed by apo-Tf in combination with ions other than  $\text{Fe}^{3+}$ , which accumulate in the urine of some cancer patients and are able to bind to apo-Tf, changing its conformation towards holo-Tf. Using inductively coupled plasma ionization mass spectroscopy (ICP-MS), we obtained the first results confirming our hypothesis. The “holo-Tf” preparation in these urine samples was found to be highly enriched in zinc and nickel. Also in this preparation, a relative enrichment in cadmium is observed, but it is present in much lower concentrations. The data obtained indicate that the nanobody used, recognizing predominantly the iron-saturated form of transferrin (holo-Tf), is also capable of binding transferrin in association with other metal ions that are different from iron. This ability could potentially open up new possibilities in studies of the relative abundance of various metal ions in association with transferrin in human biological fluids in normal and pathological conditions.

**Keywords:** single-domain antibody, nanobody, apo- and holo-transferrin, affinity chromatography, bladder cancer, ICP-MS

**ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ  
КАЛЬЦИЙ-МАГНИЕВОЙ СИЛИКАТНОЙ  
КЕРАМИКИ ДИОПСИДА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ  
РЕКОМБИНАНТНОГО BMP-2  
И ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА  
В КАЧЕСТВЕ КАРКАСА: ЭКТОПИЧЕСКИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ  
ПРИ ВНУТРИМЫШЕЧНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ У МЫШЕЙ**

© 2023 А.С. Карягина<sup>1,2,3\*</sup>, П.А. Орлова<sup>1</sup>, А.В. Жулина<sup>1</sup>, М.С. Кривоzubов<sup>1</sup>,  
Т.М. Грунина<sup>1,3</sup>, Н.В. Струкова<sup>1</sup>, К.Е. Никитин<sup>1</sup>, В.Н. Манских<sup>1,2</sup>,  
Ф.С. Сенатов<sup>1,4</sup>, А.В. Громов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии  
и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия;  
электронная почта: akaryagina@gmail.com, alexander.v.gromov@gmail.com

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

<sup>3</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,  
127550 Москва, Россия

<sup>4</sup> Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»,  
119049 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.06.2023

После доработки 05.07.2023

Принята к публикации 06.07.2023

Высокая эффективность гибридных имплантатов на основе кальций-магниево-силикатной керамики диопсида в качестве носителя рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 (BMP-2) и ксеногенного деминерализованного костного матрикса (ДКМ) в качестве каркасного материала для регенерации костной ткани была продемонстрирована ранее на модели краниальных дефектов критического размера у мышей. С целью изучения возможности применения этих имплантатов для выращивания аутологичной костной ткани с использованием принципа *in vivo* биореактора в теле самого пациента проведено исследование эффективности вызываемого ими эктопического остеогенеза при внутримышечной имплантации мышам. При дозе BMP-2 в 7 мкг на имплантат через 1 неделю вокруг имплантатов наблюдалось плотное скопление клеток, вероятно, сателлитных клеток-предшественников скелетной мускулатуры, с участками интенсивного хондрогенеза, начальной стадии непрямого остеогенеза. Через 12 недель формировалась плотная костная капсула трабекулярного строения, покрытая надкостницей, со зрелым костным мозгом, расположенным в промежутках между трабекулами. Объем капсулы приблизительно в 8–10 раз превышал объем исходного имплантата. Признаки воспалительной и клеточной реакции на введение инородного тела в группе с BMP-2 практически отсутствовали. Данные микрокомпьютерной томографии показали значительно больший относительный объем костной ткани, количество трабекул и плотность костной ткани в группе с BMP-2 по сравнению с группой без BMP-2. С учетом того, что ДКМ может быть получен практически в неограниченных количествах, требуемого размера и формы, а используемый BMP-2, получаемый синтезом в клетках *E. coli*, относительно недорог, дальнейшая разработка модели *in vivo* биореактора на основе гибридных имплантатов из BMP-2, диопсида и ксеногенного ДКМ представляется перспективной.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** диопсид, кальций-магниево-силикатная керамика, имплантат, BMP-2, деминерализованный костный матрикс, эктопический остеогенез.

**DOI:** 10.31857/S0320972523080067, **EDN:** IJYN DL

Принятые сокращения: ГК — гиалуроновая кислота; ДКМ — деминерализованный костный матрикс; микроКТ — микрокомпьютерная томография; BMP-2 — bone morphogenetic protein-2, костный морфогенетический белок-2.

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Восстановление крупных костных дефектов, вызванных травмой, остеопорозом, удалением опухоли или остеомиелитом, является одной из сложнейших задач реконструктивной хирургии [1, 2]. Золотым стандартом лечения при этом является аутотрансплантация собственной костной ткани, забираемой обычно из подвздошной кости пациента, которая, однако, имеет много проблем, таких как боли в месте забора материала, а также ограниченность объёма аутотрансплантата [3, 4]. Возможной альтернативой при этом является выращивание аутологичных костных имплантатов с использованием так называемого принципа *in vivo* биореактора, заключающегося в том, что биореактором служит тело самого пациента [5]. При этом можно вырастить кость нужной формы и размера, например, в мышце спины или живота, используя подходящий каркас и остеоиндуктивные факторы, а затем трансплантировать её в нужное место. В настоящее время имеется более сотни публикаций с описанием эктопического наращивания кости в мелких (мыши, крысы, кролики) и крупных (бараны, свиньи, обезьяны, козы, собаки) лабораторных животных. Также опубликованы статьи, описывающие клинические случаи, в основном касающиеся восполнения крупных челюстных дефектов у людей, на основе этого подхода [6–13].

Для достижения успеха при разработке новой модели *in vivo* биореактора требуется подбор комбинации целого ряда факторов, способствующих формированию зрелой костной ткани в эктопическом сайте: существенным является выбор лабораторного животного, модели имплантации, каркасного материала, обеспечивающего требуемую форму кости, носителя индуктора остеогенеза и собственно индуктора остеогенеза.

Наиболее экономичными среди лабораторных животных с точки зрения закупочной цены и стоимости содержания являются мыши. Поэтому их использование представляется целесообразным для первоначальной отработки модели с целью последующего переноса на более крупных лабораторных животных и человека.

Чрезвычайно важным является выбор модели имплантации. В настоящее время наиболее часто используемыми являются модель подкожной имплантации, имплантации в мышечный карман (внутримышечная имплантация) и имплантации в почечную капсулу [14]. При этом модель внутримышечной имплантации имеет ряд преимуществ по сравнению с

двумя другими, в частности, она практически так же удобна в плане хирургической техники, как подкожная имплантация, значительно более проста по сравнению с имплантацией в почечную капсулу и при этом полностью переносима на крупных лабораторных животных и человека. По сравнению с подкожной внутримышечная имплантация, как правило, обеспечивает более выраженное и более раннее образование костной ткани [15], что может быть связано с лучшим кровоснабжением мышечной ткани, а также наличием в скелетных мышцах сателлитных клеток-предшественников, способных к остеогенной дифференцировке под действием соответствующих индукторов, например, костных морфогенетических белков (bone morphogenetic proteins, BMPs) [14]. Так, в исследовании, проведённом на собаках и свиньях, при внутримышечной имплантации образование костной ткани наблюдалось уже через 45 дней, в то время как при подкожной имплантации — только через 60 дней [16]. С помощью внутримышечной имплантации была успешно выращена костная ткань для замещения крупных челюстных дефектов у человека. Например, в 2004 г. опубликована работа, описывающая выращивание костной ткани в мышце пациента с использованием аутологичного костного мозга и BMP-7 [7]. Собственно, именно на модели внутримышечной имплантации была показана способность BMPs индуцировать эктопический остеогенез [17].

Существенным моментом при разработке модели *in vivo* биореактора является выбор каркасного материала, который должен служить матрицей для наращивания собственной кости. Желательно, чтобы такой материал был достаточно жёстким, но эластичным, приближенным по свойствам к костной ткани. Также материал должен быть биосовместимым и биорезорбируемым, обеспечивая постепенное замещение его новой костной тканью. Одним из материалов, удовлетворяющих требуемым параметрам, является высокоочищенный ксеногенный деминерализованный костный матрикс (ДКМ), получаемый из костей крупного рогатого скота [18]. ДКМ обладает высокой остеокондуктивностью, его можно получить в большом количестве, из него могут быть получены объёмные имплантаты требуемой формы, по механическим свойствам и пористости, включая микропористость, он максимально приближен к костной ткани человека. Кроме того, возможно получение низкоиммуногенного ДКМ, обладающего повышенной биосовместимостью и пониженной аллергенностью за счёт сниженного содержания неколлагеновых

белков [19, 20]. Ограниченная остеоиндуктивность ДКМ может быть преодолена за счёт его совместного применения с экзогенными индукторами остеогенеза, например, рекомбинантным костным морфогенетическим белком-2 (ВМР-2) [19, 21]. При введении в организм ВМР-2 обеспечивает привлечение из окружающих тканей и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, а также обладает ангиогенными свойствами, что важно для образования полноценной костной ткани с хорошим кровоснабжением [22]. ДКМ сам по себе может выступать в качестве носителя ВМР-2, однако его сорбционная ёмкость ограничена [23]. Для возможности введения больших и регулируемых доз ВМР-2, а также обеспечения более постепенного выхода белка на основе ДКМ в качестве каркасного материала разработаны гибридные имплантаты, в которых функцию носителя ВМР-2 выполняют взвешенные в гиалуроновой кислоте (ГК) частицы кальций-магниево-силикатной керамики диопсида, обладающей очень высокой сорбционной ёмкостью по отношению к ВМР-2, во много раз превышающую ёмкость гидроксилата. Такие имплантаты продемонстрировали высокую остеогенность на модели краниальных дефектов критического размера у мышей [23].

Целью данного исследования является разработка модели эктопического наращивания трабекулярной костной ткани на основе принципа *in vivo* биореактора при внутримышечной имплантации мыши гибридных имплантатов с ксеногенным ДКМ в качестве каркасного материала и кальций-магниево-силикатной керамикой диопсидом в качестве носителя рекомбинантного ВМР-2.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение порошка диопсида.** В работе использовали порошок диопсида ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ), синтезированный твердофазным методом по ранее опубликованной методике [24] с модификациями [23]. Кратко, в качестве источника кальция использовали яичную скорлупу, источника кремния — рисовую шелуху, получая на её основе с помощью прогрева диоксид кремния. Измельчённую яичную скорлупу, диоксид кремния и синтетический оксид магния («Русхим», Россия) смешивали в соотношении 1 : 2 : 1 в планетарной шаровой мельнице Fritsch Pulverisette 5 («Fritsch GmbH», Германия) и выдерживали при температуре 1100 °С в течение 6 ч. Полученный диопсид

соответствовал стандартной карточке ICDD № 01-075-1092 с небольшой примесью вторичной фазы — акерманита [23].

**Получение пористых каркасов для имплантатов из ДКМ.** Высокоочищенный ксеногенный ДКМ получали по ранее описанной методике из эпифизов бедренных костей крупного рогатого скота [25]. Имплантаты, представляющие собой диски диаметром 4 мм и толщиной 1 мм, изготавливали из костных пластин с помощью металлического пробойника. Для стерилизации диски ДКМ выдерживали в 96%-ном спирте в течение 1 ч, отмывали стерильным PBS и высушивали в ламинарном шкафу с ультрафиолетом в течение ночи.

**Насыщение порошка диопсида ВМР-2.** Рекомбинантный ВМР-2, полученный синтезом в клетках *Escherichia coli* и очищенный, как описано ранее [26], с удельной активностью 0,1 Ед./мкг иммобилизовывали на порошке диопсида, как описано ранее [23]. Кратко, 50 мг порошка диопсида выдерживали 30 мин в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 5,5) с 50 мМ NaCl, центрифугировали, раствор удаляли, осадок суспендировали в том же растворе, содержащем 500 или 1000 мкг ВМР-2, и инкубировали в течение 2 ч. Несвязавшийся белок удаляли после центрифугирования, осадок трижды промывали тем же буфером без белка.

**Подготовка образцов для имплантации.** Для приготовления 5%-ной (w/v) суспензии диопсида в ГК 50 мг порошка диопсида (с 10 или 20 мкг/мг ВМР-2 или без него) в 250 мкл стерильного физраствора добавляли к 750 мл 2%-ной ГК (~100 кДа, «Shanghai Macklin Biochemical Industry Co., Ltd.», Китай) в физрастворе и тщательно перемешивали. Непосредственно перед имплантацией простерилизованные диски ДКМ погружали в предварительно ещё раз перемешанную суспензию. Один диск впитывал примерно 7 мкл суспензии и содержал около 0,35 мг диопсида и 3,5 или 7 мкг ВМР-2.

**Имплантация.** Провели 2 эксперимента на самцах аутбредных мышей линии ICR (CD-1) возраста 38–47 дней. Первый — пилотный — проводился на 24 мышах, которых случайным образом разделили на две группы по 12 мышей. Первой группе имплантировали диски из ДКМ с суспензией частиц диопсида, не содержащих ВМР-2, второй группе — диски с суспензией частиц, содержащих около 3,5 мкг ВМР-2 на диск. Каждому животному вводили по 2 идентичных имплантата — в левое и правое бедро. Второй эксперимент проводили аналогично первому, но использовали 16 мышей,



разделённых на две группы по 8 мышей. В первой группе вводили имплантаты без белка, во второй количество ВМР-2 составляло 7 мкг на диск. В обоих случаях операцию проводили на термостатируемом хирургическом столе («Medax», Германия) при температуре 37 °С. Подготовив хирургическое поле, в каудальной части бедра производили кожный разрез, далее формировали карманы в ягодичных мышцах тупым методом, после чего в них закладывали имплантаты, ткани послойно ушивали атраumaticким шовным материалом Merfil № 4/0 и обрабатывали антибиотиком «Террамицин» («Pfizer Animal Health», США). В первом эксперименте эвтаназию углекислым газом проводили на 7, 24, 63 и 84 сутки трём мышам из каждой группы. Во втором – на 7 сутки двум мышам, на 84 – шести мышам из каждой группы. Гистологический анализ образцов, извлечённых из мышц после эвтаназии, проводили на сроке 1 и 12 недель с начала эксперимента; микрокомпьютерную томографию (микроКТ) – на сроке 12 недель.

**Гистологический анализ.** Образцы, включающие область имплантации и окружающие ткани, извлекали из бедренных мышц, фиксировали забуференным нейтральным формалином в течение 24 ч, декальцинировали в 14%-ном растворе ЭДТА, отмывали и проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. Срезы толщиной 3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, Сафранином О, гематоксилином

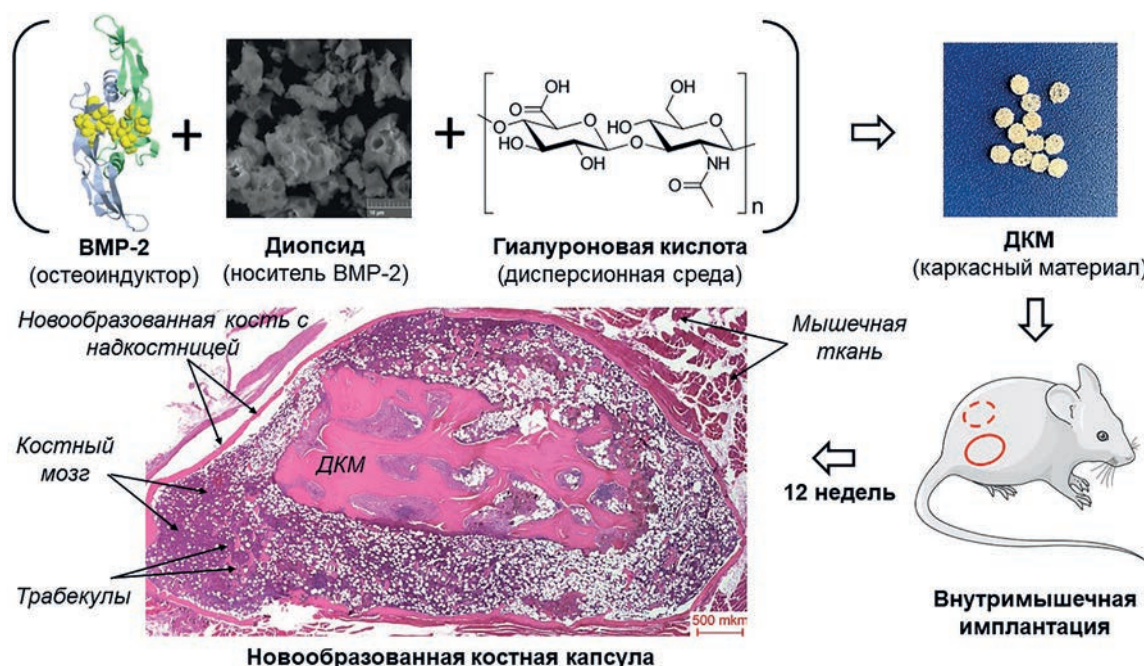
и быстрым зелёным FCF [27] и азаном по Гейденгайну [28].

**Микрокомпьютерная томография.** МикроКТ образцов проводили *ex vivo* на томографе SkyScan 1172 («Bruker», США) с помощью программ NRecon и CTAп с подбором параметров, позволяющих отличить минерализованную костную ткань от других тканей.

**Статистическая обработка** данных микроКТ проводилась с использованием пакета программ Statistica 12.0 («Statsoft», США). Проверку на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Для оценки достоверности отличий проводили анализ с применением критерия Манна–Уитни. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Дизайн эксперимента.** В пилотном эксперименте по внутримышечной имплантации мышам дисков из ДКМ, содержащих суспензию порошка диопсида в ГК, в опытной группе использовали ВМР-2 в количестве около 3,5 мкг на имплантат, как в ранее описанном исследовании по имплантации в краниальные дефекты мышей [23], в которых за 9 недель происходило практически полное заполнение пор имплантата новообразованной костной тканью с костным мозгом и ремоделирование матрикса ДКМ. На 1, 4, 9 и 12 неделях гистологический анализ выявил картину непрямого



**Рис. 1.** Дизайн эксперимента по внутримышечной имплантации мышам гибридных имплантатов из ДКМ и взвеси частиц диопсида с адсорбированным ВМР-2 в ГК

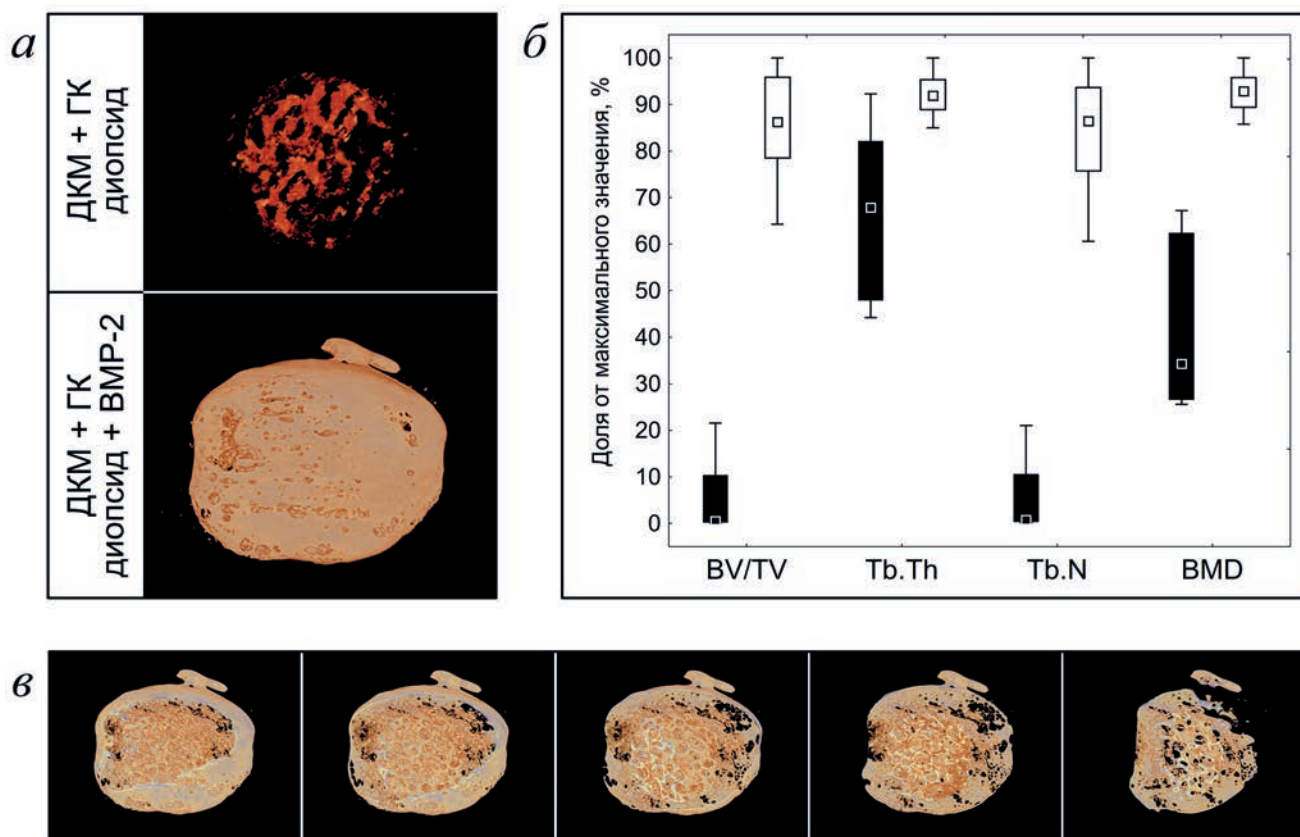
эктопического остеогенеза с формированием через 1 неделю хрящевой ткани, а на более поздних сроках – костной структуры, похожей по строению на трабекулярную кость, которая к 12 неделе у некоторых животных оказалась покрыта слоем костной ткани с надкостницей (данные не приводятся). По результатам этого эксперимента было решено общий дизайн основного эксперимента оставить неизменным (рис. 1), но увеличить в два раза количество BMP-2, гистологический анализ проводить на 1 и 12 неделе, микроКТ – на 12 неделе.

**Оценка результатов внутримышечной имплантации гибридных имплантатов с помощью микроКТ и гистологического анализа.** Данные по микроКТ образцов, полученных через 12 недель после проведения внутримышечной имплантации гибридных имплантатов из ДКМ, ГК и диопсида, содержащих и не содержащих BMP-2, представлены на рис. 2. Присутствие частиц диопсида без BMP-2 в ряде образцов индуцировало формирование объёмной сетки минерализации, соответствующей по форме макропорам диска из ДКМ (рис. 2, а). Однако по данным гистологического анализа

это не сопровождалось появлением новообразованной костной ткани (рис. 3, а, 4–6, рис. 4, а, 4–6).

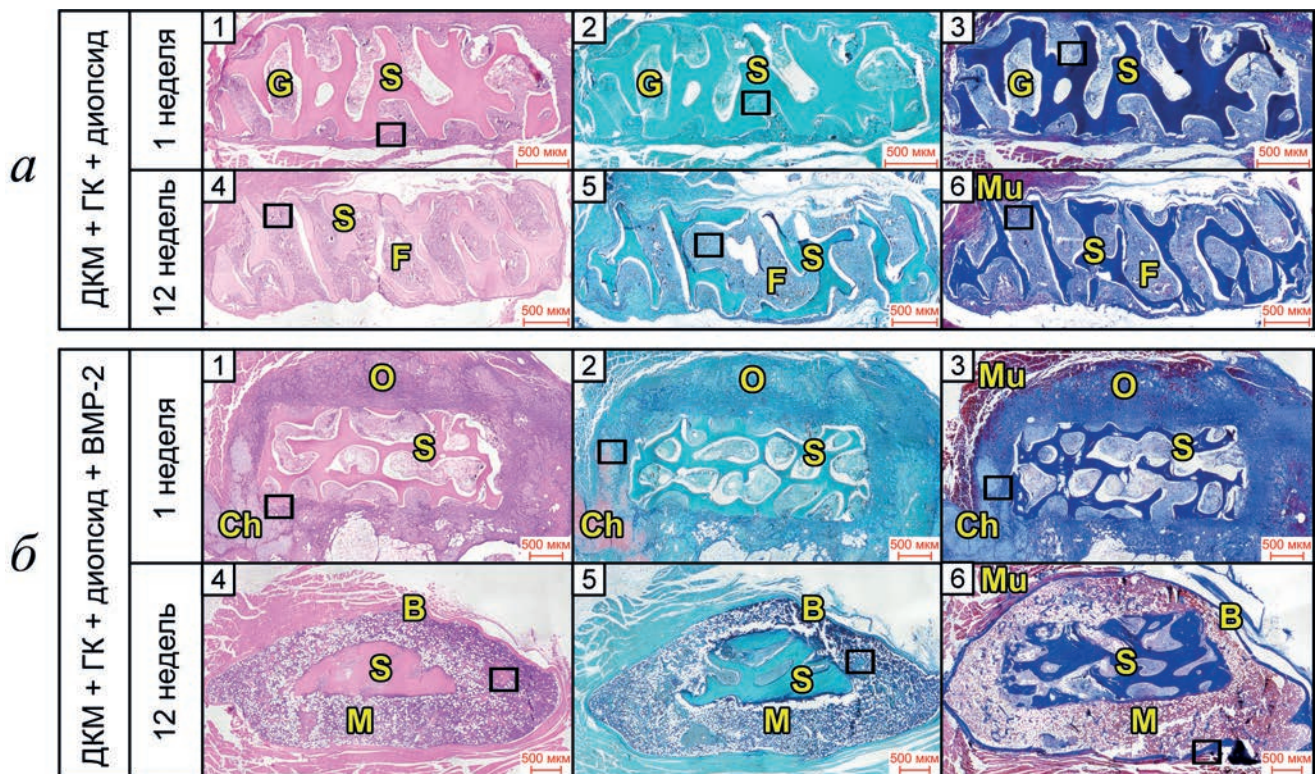
В присутствии BMP-2 через 12 недель по данным микроКТ во всех образцах наблюдалась крупная, сильно минерализованная костная капсула (рис. 2, а), значительно превышающая по объёму (в 8–10 раз) первоначальный имплантат, с выраженной трабекулярной структурой (рис. 2, в). Параметры BV/TV (относительный объём костной ткани), Tb.Th (толщина трабекул), Tb.N (количество трабекул) и BMD (плотность костной ткани) в группе с BMP-2 достоверно различаются (в большую сторону) с группой без BMP-2 ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, б).

Согласно гистологическому исследованию, в группе без BMP-2 через одну неделю после имплантации диск был окружён молодой грануляционной тканью (рис. 3, а, 1–3). Вокруг частиц диопсида обнаруживались скопления эпителиоидных клеток (рис. 4, а, 1–3). Через 12 недель диск был окружён и заполнен хорошо организованной фиброзной тканью (рис. 3, а, 4–6). Вокруг частиц диопсида



**Рис. 2.** Результаты микроКТ образцов, извлечённых через 12 недель после внутримышечной имплантации. а – Визуализация участков минерализации. б – Выраженность относительного объёма костной ткани (BV/TV), количества трабекул (Tb.N), толщины трабекул (Tb.Th) и плотности костной ткани (BMD) в группах без (чёрные прямоугольники) и с (незакрашенные прямоугольники) BMP-2. в – Последовательные поперечные срезы при 3D-визуализации результатов микроКТ костной капсулы из группы с BMP-2





**Рис. 3.** Гистологический анализ образцов, полученных в результате имплантации в бедренную мышцу мышей гибридных имплантатов из ДКМ, диопсида и ГК, не содержащих (*а*) и содержащих (*б*) ВМР-2. *а, б*: Слева — окраска гематоксилином и эозином, по центру — Сафранином О, гематоксилином и быстрым зелёным FCF, справа — азаном по Гейденгау. Увеличение 10×. Обозначения: В — новообразованная костная ткань, трабекулы, Ch — хондроциты, F — фиброз, G — грануляционная ткань, М — костный мозг, Му — мышечная ткань, О — остеопрогениторные клетки, S — скаффолд ДКМ. Чёрными прямоугольниками обозначены области, соответствующие областям, показанным при большем увеличении на рис. 4

наблюдалось присутствие гигантских многоядерных клеток инородных тел, а также коллагенизация и фибрирование гранулематозных узелков/очагов воспаления без признаков неоостеогенеза (рис. 4, *а*, 4–6).

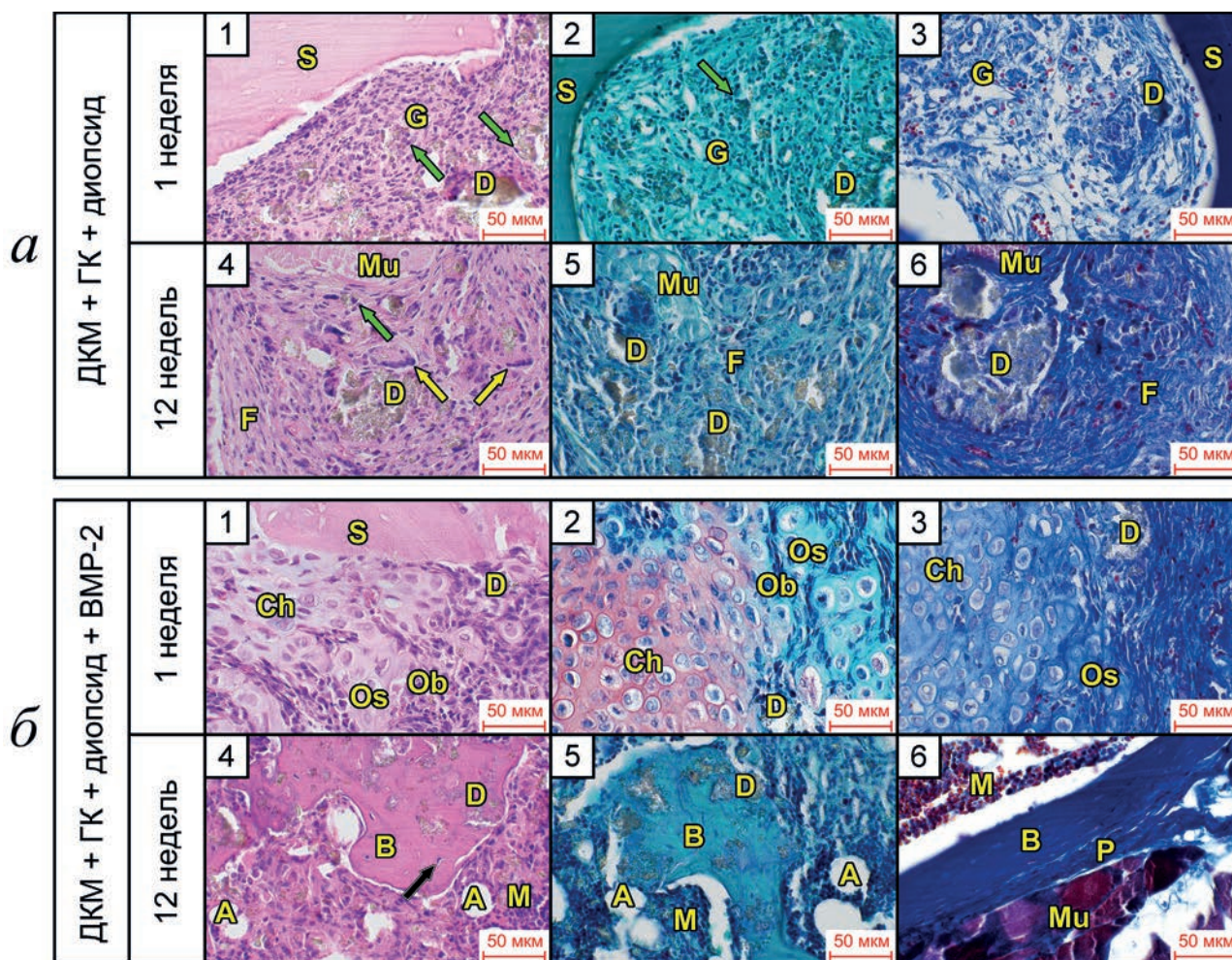
В группе с ВМР-2 начальные признаки остеогенеза появлялись уже через неделю после имплантации: вокруг имплантата наблюдались обширные зоны хондрогенеза (окрашиваемые Сафранином О в красный цвет) в окружении многочисленных остеопрогениторных клеток, вероятно, образовавшихся из пула нативных скелетных прогениторных клеток (рис. 3, *б*, 1–3). При большем увеличении наблюдаются резидуальные хондроидные клетки, замещающиеся на клетки с признаками остеоцитов, которые погружены в матрикс, не дающий положительной реакции на Сафранин О (рис. 4, *б*, 1–3). Через 12 недель имплантат окружён костной капсулой, значительно превышающей размеры имплантата, весь объём которой заполнен преимущественно костным мозгом с адипоцитами и тонкими костными трабекулами (рис. 3, *б*, 4–6). Наружный слой капсулы представлен плотной новообразованной костью, покрытой надкостницей, что

хорошо видно при окраске по Гейденгау, где синим цветом окрашиваются коллагенсодержащие структуры (рис. 3, *б*, 6; рис. 4, *б*, 6). На большом увеличении можно наблюдать включение частиц диопсида в новообразованную костную ткань (рис. 4, *б*, 4, 5), которую можно отличить от деминерализованной кости каркасного материала по присутствию остеоцитов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам микроКТ области имплантации выраженная минерализация тканей наблюдается как в случае образцов с ВМР-2, так и без него (рис. 2). В отсутствие ВМР-2 через 12 недель после имплантации минерализованные участки располагаются в открытых порах скаффолда ДКМ, образуя характерную сетку (рис. 2, *а*), однако это не сопровождается появлением новообразованной костной ткани — на гистологических срезах видно присутствие в порах имплантатов фиброзной ткани (рис. 4, *а*, 4–6). Наблюдаемые рентгеноконтрастные участки, по-видимому, соответствуют кальциевым депозитам на частицах





**Рис. 4.** Гистологический анализ образцов, полученных в результате имплантации в бедренную мышцу мышей гибридных имплантатов из ДКМ, диопсида и ГК, не содержащих (а) и содержащих (б) ВМР-2. а, б: Слева — окраска гематоксилином и эозином, по центру — Сафранином О, гематоксилином и быстрым зелёным FCF, справа — азаном по Гейденгайну. Увеличение 40×. Обозначения: А — адипоциты, В — новообразованная костная ткань, трабекулы, Ch — хондроциты, Os — клетки с признаками остеобластов, Ob — остеобласты, D — диопсид, F — фиброз, G — грануляционная ткань, М — костный мозг, Mu — мышечная ткань, Р — надкостница, S — скаффолд ДКМ. Чёрной стрелкой обозначены остеобласты в новообразованной костной ткани, зелёными стрелками — эпителиоидные клетки, жёлтыми стрелками — гигантские клетки инородных тел

диопсида, появляющимся в результате характерной для диопсида биоминерализации — образования поверхностного слоя апатита при инкубации в организме или в SBF (simulated body fluid, раствор, имитирующий внеклеточную жидкость организма) [29]. Таким образом, диопсид, обладая способностью к биоминерализации, тем не менее не способен сам по себе индуцировать остеогенез.

В присутствии ВМР-2 наблюдается формирование замкнутой костной капсулы, покрытой надкостницей, с развитой системой трабекул, построенных из новообразованной костной ткани, промежутки между которыми заполнены зрелым костным мозгом. Таким образом, разработанный нами имплантат при введении в мышцу приводит к образованию полностью сформированной аутогенной костной структуры, готовой к аутотрансплантации,

что свидетельствует об оптимальном подборе компонентов имплантата, в частности, носителя ВМР-2. Выбор носителя для ВМР-2 очень важен для успешного формирования эктопической костной ткани. Так, в случае использования в качестве носителя ВМР-2  $\beta$ -трикальцийфосфата наблюдалось образование эктопической кости при внутримышечной имплантации крысам [30], в то же время при использовании гидроксилапатита лишь дополнительное введение в имплантат коллагена привело к образованию костной ткани [17]. Выраженная способность диопсида к биоминерализации может приводить к усилению остеогенеза в окрестности частиц диопсида в присутствии остеоиндуктора вследствие создания высокой локальной концентрации ионов кальция в месте имплантации. Это может быть дополнительным фактором, обеспечивающим



выраженность эктопического остеогенеза в данном эксперименте, а также ортотопического остеогенеза в ранее проведённом эксперименте по имплантации ДКМ и диопсида с ВМР-2 в краниальные дефекты критического размера у мышей [23]. В пользу перспективности применения диопсида в качестве носителя ВМР-2 свидетельствует также то обстоятельство, что в отсутствие ВМР-2 в области имплантации наблюдается умеренно выраженная воспалительная и клеточная реакция на введение имплантата, не превышающая обычную реакцию на введение остеопластических материалов, содержащих ДКМ и частицы керамики. При этом такая реакция значительно снижена на фоне присутствия ВМР-2.

Нас интересовала не только возможность получения эктопической кости, но и характеристика ранних и поздних стадий остеогенеза, включая структуру и качество получаемой костной ткани. В связи с этим были проведены микроКТ и детальный гистологический анализ с тремя окрасками на разном увеличении, позволивший оценить на двух сроках как общую картину, наблюдающуюся при имплантации, так и явления, происходящие на клеточном уровне. Картина, наблюдаемая в присутствии ВМР-2, соответствует непрямому остеогенезу, проходящему с образованием на раннем сроке хрящевой ткани. Структуры, подобные образующейся на позднем сроке костной капсуле с трабекулярной структурой (подобие кортикальной и губчатой кости), достаточно редко наблюдаются в исследованиях по эктопическому остеогенезу. Возможно, это связано с меньшей остеогенностью используемых материалов, использованием более жёстких моделей эктопического остеогенеза, а также тем, что во многих случаях исследователей интересует сам факт возможности эктопического остеогенеза с использованием тех или иных материалов, и сроки эксперимента, как правило, относительно небольшие.

Интересно проследить судьбу ксеногенного костного матрикса, выступающего в качестве скаффолда в используемых имплантатах. Через 12 недель исходный скаффолд ДКМ всё ещё присутствует внутри капсулы, однако наблюдается ремоделирование его верхних слоёв с образованием новой костной ткани с лакунами, включающими остециты. Относительная толщина трабекул скаффолда ДКМ к 12 неделям существенно увеличивается, что хорошо заметно на рис. 3, б с общим видом образовавшихся костных капсул. Однако полной перестройки костного матрикса ДКМ в случае нашего эксперимента на сроке 12 недель не

происходит. При этом в случае введения аналогичного имплантата в краниальные дефекты критического размера у мышей уже через 9 недель с начала эксперимента и при вдвое меньшем количестве ВМР-2 наблюдалось практически полное ремоделирование ДКМ с формированием новообразованной костной ткани с включёнными в неё остеócитами [23]. Разная скорость ремоделирования может быть обусловлена различными причинами, в частности, вариациями в интенсивности и путях остеогенеза из-за разного происхождения остеопрогениторных клеток: в случае ортотопического остеогенеза это мезенхимальные стромальные стволовые клетки костного мозга материнской кости и периоста (надкостницы), в случае же эктопического остеогенеза в мышечном кармане — сателлитные клетки-предшественники скелетной мускулатуры [14]. Представляет интерес исследование судьбы такого имплантата на более поздних сроках. В перспективе можно предположить полную перестройку с замещением ксеногенного костного матрикса аутогенной костью за счёт подключения в качестве источника остеопрогениторных клеток периоста костной капсулы.

Рекомбинантный ВМР-2, используемый в эксперименте, был синтезирован в клетках *E. coli* [26]. Высокая остеогенная активность данного белка показана при совместном применении с различными природными и синтетическими материалами [21, 31–36]. Этот вариант ВМР-2 способен самопроизвольно сорбироваться на частицах диопсида в количестве более 150 мкг/мг, демонстрируя постоянный выход на протяжении нескольких дней [23], что делает данную комбинацию «остеоиндуктор — носитель» очень привлекательной для использования в экспериментах по регенерации костных дефектов. В данном исследовании мы выбрали дозу ВМР-2 в 7 мкг на имплантат, обеспечивающую эффективный эктопический остеогенез с образованием трабекулярной кости. Следует отметить, что обычно доза ВМР-2, используемая в экспериментах по эктопическому остеогенезу, в особенности на крупных животных, существенно выше [17, 35], кроме того, как правило, используется коммерческий ВМР-2, синтезируемый в клетках китайского хомячка, что заведомо будет определять очень высокую стоимость получения аутологичной кости на основе принципа *in vivo* биореактора и ограничит применимость такого подхода. Использование более дешёвого, но не менее активного ВМР-2, полученного синтезом в клетках *E. coli*, должно способствовать более широкому распространению данного метода.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе на модели внутримышечной имплантации у мышей проведён эксперимент по эктопическому остеогенезу, индуцируемому гибридными имплантатами, состоящими из губчатого ДКМ, заполненного суспензией частиц диоксида в ГК. Через 12 недель на месте имплантации образовывались округлые костные капсулы трабекулярной структуры, заполненные зрелым костным мозгом и покрытые костью с надкостницей, в несколько раз превышающие по объёму исходный имплантат. Гистологическое исследование на раннем сроке — 1 неделя после имплантации — подтвердило механизм непрямого остеогенеза с промежуточным образованием хрящевой ткани. Предлагаемый подход для эктопического наращивания кости с использованием в качестве носителя ВМР-2 частиц кальций-магниевого силикатной керамики диоксида является новым, преимуществом данного подхода является возможность очень высокой и регулируемой загрузки ВМР-2 в имплантат. Имплантаты на основе ДКМ и диоксида, насыщенного ВМР-2, могут быть использованы для разработки подходов по получению аутологичной костной ткани с использованием принципа *in vivo* биореактора для замещения крупных дефектов трабекулярных костей. Перспективной представляется также разработка других видов гибридных имплан-

татов на основе диоксида в качестве носителя ВМР-2 — например, включающих различные гидрогели и/или пористые скаффолды полимерной природы.

**Вклад авторов.** А.С. Карягина — концепция и руководство работой, написание статьи; П.А. Орлова, А.В. Жулина, М.С. Кривокубов, Т.М. Грунина, Н.В. Струкова — проведение экспериментов; П.А. Орлова, М.С. Кривокубов, А.В. Громов — написание фрагментов статьи, подготовка иллюстраций; А.С. Карягина, В.Н. Манских, Ф.С. Сенатов, А.В. Громов — обсуждение результатов, редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00216).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Раджану Чоулдхари и Инне Булыгиной за предоставление порошка диоксида, Марии Генераловой и Анне Рязановой за помощь в проведении имплантации. Синтез диоксида проводился на базе НИТУ МИСИС, ряд стадий выделения ВМР-2 — в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова и во ВНИИСБ.

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

**Соблюдение этических норм.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tan, W., Gao, C., Feng, P., Liu, Q., Liu, C., Wang, Z., Deng, Y., and Shuai, C. (2021) Dual-functional scaffolds of poly(L-lactic acid)/nanohydroxyapatite encapsulated with metformin: Simultaneous enhancement of bone repair and bone tumor inhibition, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **120**, 111592, doi: 10.1016/j.msec.2020.111592.
2. Xu, B., Zheng, P., Gao, F., Wang, W., Zhang, H., Zhang, X., Feng, X., and Liu, W. A. (2017) Mineralized high strength and tough hydrogel for skull bone regeneration, *Adv. Funct. Mater.*, **27**, 1604327, doi:10.1002/adfm.201604327.
3. Farokhi, M., Mottaghtalab, F., Shokrgozar, M. A., Ou, K. L., Mao, C., and Hosseinkhani, H. (2016) Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering, *J. Control. Release*, **225**, 152-169, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.0334.
4. Norbertczak, H. T., Fermor, H. L., Edwards, J. H., Rooney, P., Ingham, E., and Herbert, A. (2022) Decellularised human bone allograft from different anatomical sites as a basis for functionally stratified repair material for bone defects, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **125**, 104965, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104965.
5. Huang, R. L., Kobayashi, E., Liu, K., and Li, Q. (2016) Bone graft prefabrication following the *in vivo* bioreactor principle, *EBioMedicine*, **12**, 43-54, doi: 10.1016/j.ebiom.2016.09.016.
6. Orringer, J. S., Shaw, W. W., Borud, L. J., Freymiller, E. G., Wang, S. A., and Markowitz, B. L. (1999) Total mandibular and lower lip reconstruction with a prefabricated osteocutaneous free flap, *Plast. Reconstr. Surg.*, **104**, 793-797, doi: 10.1097/00006534-199909030-00028.
7. Warnke, P. H., Springer, I. N., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmöller, M., Russo, P. A., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E., and Terheyden, H. (2004) Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man, *Lancet*, **364**, 766-770, doi: 10.1016/S0140-6736(04)16935-3.

8. Warnke, P., Wiltfang, J., Springer, I., Acil, Y., Bolte, H., Kosmahl, M., Russo, P., Sherry, E., Lutzen, U., and Wolfart, S. (2006) Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible, *Biomaterials*, **27**, 3163-3167, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.050.
9. Heliotis, M., Lavery, K. M., Ripamonti, U., Tsiridis, E., and di Silvio, L. (2006) Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **35**, 265-269, doi: 10.1016/j.ijom.2005.07.013.
10. Cheng, M., Brey, E. M., Ulusal, B. G., and Wei, F. (2006) Mandible augmentation for osseointegrated implants using tissue engineering strategies, *Plast. Reconstr. Surg.*, **118**, 1e-4e, doi: 10.1097/01.prs.0000221120.11128.1a.
11. Mesimäki, K., Lindroos, B., Törnwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., Miettinen, S., and Suuronen, R. (2009) Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **38**, 201-209, doi: 10.1016/j.ijom.2009.01.001.
12. Kokemueller, H., Spalthoff, S., Nollf, M., Tavassol, F., Essig, H., Stuehmer, C., Bormann, K. H., Rücker, M., and Gellrich, N. C. (2010) Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts *in vivo* for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application, *Int. J. Oral Maxillofac Surg.*, **39**, 379-387, doi: 10.1016/j.ijom.2010.01.010.
13. Horch, R. E., Beier, J. P., Kneser, U., and Arkudas, A. (2014) Successful human long-term application of *in situ* bone tissue engineering, *J. Cell. Mol. Med.*, **18**, 1478-1485, doi: 10.1111/jcmm.12296.
14. Scott, M. A., Levi, B., Askarinam, A., Nguyen, A., Rackohn, T., Ting, K., Soo, C., and James, A. W. (2012) Brief review of models of ectopic bone formation, *Stem Cells Dev.*, **21**, 655-667, doi: 10.1089/scd.2011.0517.
15. Habibovic, P., and de Groot, K. (2007) Osteoinductive biomaterials — properties and relevance in bone repair, *J. Tissue Engin. Regenerat. Med.*, **1**, 25-32, doi: 10.1002/term.5.
16. Yang, Z., Yuan, H., Tong, W., Zou, P., Chen, W., and Zhang, X. (1996) Osteogenesis in extraskelally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals, *Biomaterials*, **17**, 2131-2137, doi: 10.1016/0142-9612(96)00044-0.
17. Takaoka, K., Nakahara, H., Yoshikawa, H., Masuhara, K., Tsuda, T., and Ono, K. (1988) Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein, *Clin. Orthopaed. Rel. Res.*, **234**, 250-254.
18. Zhang, H., Yang, L., Yang, X. G., Wang, F., Feng, J. T., Hua, K. C., Li, Q., and Hu, Y. C. (2019) Demineralized bone matrix carriers and their clinical applications: an overview, *Orthopaedic Surg.*, **11**, 725-737, doi: 10.1111/os.12509.
19. Bartov, M. S., Gromov, A. V., Poponova, M. S., Savina, D. M., Nikitin, K. E., Grunina, T. M., Manskikh, V. N., Gra, O. A., Lunin, V. G., Karyagina, A. S., and Gintsburg, A. L. (2016) Modern approaches to research of new osteogenic biomaterials on the model of regeneration of cranial critical-sized defects in rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **162**, 273-276, doi: 10.1007/s10517-017-3693-2.
20. Громов А. В., Никитин К. Е., Карпова Т. А., Зайцев В. В., Сидорова Е. И., Андреева Е. В., Бартов М. С., Мишина Д. М., Субботина М. Е., Шевлягина Н. В., Сергиенков М. А., Соболева Л. А., Котнова А. П., Шарапова Н. Е., Семихин А. С., Диденко Л. В., Карягина А. С., Лунин В. Г. (2012) Разработка методики получения остеопластического материала на основе деминерализованного костного матрикса с максимальным содержанием нативных факторов роста костной ткани, *Биотехнология*, **5**, 66-75.
21. Gromov, A. V., Bartov, M. S., Orlova, P. A., Manskikh, V. N., Krivozubov, M. S., Grunina, T. M., Manukhina, M. S., Strukova, N. V., Nikitin, K. E., Lunin, V. G., Karyagina, A. S., and Gintsburg, A. L. (2019) Combined effect of bone morphogenetic protein-2 and erythropoietin on regeneration of cranial bone defects in mice, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 408-412, doi: 10.1007/s10517-019-04538-5.
22. Gromov, A. V., Poponova, M. S., and Karyagina, A. S. (2020) Recombinant human bone growth factor BMP-2 produced in *Escherichia coli*, Part 1: from protein purification to experimental models for efficacy research, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, **35**, 22-31, doi: 10.3103/S0891416820010036.
23. Karyagina, A. S., Orlova, P. A., Poponova, M. S., Bulygina, I. N., Choudhary, R., Zhulina, A. V., Grunina, T. M., Nikitin, K. E., Strukova, N. V., Generalova, M. S., Ryazanova, A. V., Kovalyova, P. A., Zimina, A. I., Lukinova, E. M., Plakhotniuk, E. D., Kirsanova, M. A., Kolesnikov, E. A., Zakharova, E. V., Manskikh, V. N., Senatov, F. S., and Gromov, A. V. (2022) Hybrid implants based on calcium-magnesium silicate ceramics diopside as a carrier of recombinant BMP-2 and demineralized bone matrix as a scaffold: dynamics of reparative osteogenesis in a mouse craniotomy model, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1277-1291, doi: 10.1134/S0006297922110074.
24. Choudhary, R., Venkatraman, S. K., Bulygina, I., Senatov, F., Kaloshkin, S., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Knyazeva, M., Kukui, D., Walther, F., and Swamiappan, S. (2021) Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk, *Mater. Sci. Engin. C*, **118**, 111456, doi: 10.1016/j.msec.2020.111456.
25. Plantz, M. A., Minardi, S., Lyons, J. G., Greene, A. C., Ellenbogen, D. J., Hallman, M., Yamaguchi, J. T.,



- Jeong, S., Yun, C., Jakus, A. E., Blank, K. R., Havey, R. M., Muriuki, M., Patwardhan, A. G., Shah, R. N., Hsu, W. K., Stock, S. R., and Hsu, E. L. (2021) Osteoinductivity and biomechanical assessment of a 3D printed demineralized bone matrix-ceramic composite in a rat spine fusion model, *Acta Biomater.*, **127**, 146–158, doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.060.
26. Karyagina, A. S., Boksha, I. S., Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Poponova, M. S., Sergienko, O. V., Lyashchuk, A. M., Galushkina, Z. M., Soboleva, L. A., Osidak, E. O., Bartov, M. S., Gromov, A. V., and Lunin, V. G. (2017) Two variants of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) with additional protein domains: synthesis in an *Escherichia coli* heterologous expression system, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 613–624, doi: 10.1134/S0006297917050091.
  27. Bryan, J. H. D. (1954) Differential staining with a mixture of safranin and fast green FCF, *Stain Technol.*, **30**, 153–157.
  28. Heidenhain, M. (1905) *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik*, S. Hirzel, Leipzig, 22, pp. 339.
  29. Wu, C., and Chang, J. (2013) A review of bioactive silicate ceramics, *Biomed. Mater.*, **8**, 032001, doi: 10.1088/1748-6041/8/3/032001.
  30. Oda, S., Kinoshita, A., Higuchi, T., Shizuya, T., and Ishikawa, I. (1997) Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), *J. Med. Dent. Sci.*, **44**, 53–62.
  31. Zimina, A., Senatov, F., Choudhary, R., Kolesnikov, E., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Orlova, P., Strukova, N., Generalova, M., Manskikh, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (2020) Biocompatibility and physico-chemical properties of highly porous PLA/HA scaffolds for bone reconstruction, *Polymers*, **12**, 2938, doi: 10.3390/polym12122938.
  32. Senatov, F., Gulbanu, A., Orlova, P., Bartov, M., Grunina, T., Kolesnikov, E., Maksimkin, A., Kaloshkin, S., Poponova, M., Nikitin, K., Krivozubov, M., Strukova, N., Manskikh, V., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Scholz, R., Knyazeva, M., Walther, F., Lunin, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (2020) Biomimetic UHMWPE/HA scaffolds with rhBMP-2 and erythropoietin for reconstructive surgery, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **111**, 110750, doi: 10.1016/j.msec.2020.110750.
  33. Senatov, F., Maksimkin, A., Chubrik, A., Kolesnikov, E., Orlova, P., Krivozubov, M., Nikitin, K., Gromov, A., and Karyagina, A. (2021) Osseointegration evaluation of UHMWPE and PEEK-based scaffolds with BMP-2 using model of critical-size cranial defect in mice and push-out test, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **119**, 104477, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104477.
  34. Senatov, F., Zimina, A., Chubrik, A., Kolesnikov, E., Permyakova, E., Voronin, A., Poponova, M., Orlova, P., Grunina, T., Nikitin, K., Krivozubov, M., Strukova, N., Generalova, M., Ryazanova, A., Manskikh, V., Lunin, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (2022) Effect of recombinant BMP-2 and erythropoietin on osteogenic properties of biomimetic PLA/PCL/HA and PHB/HA scaffolds in critical-size cranial defects model, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **135**, 112680, doi: 10.1016/j.msec.2022.112680.
  35. Karpov, T. E., Peltek, O. O., Muslimov, A. R., Tarakanchikova, Y. V., Grunina, T. M., Poponova, M. S., Karyagina, A. S., Chernozem, R. V., Pariy, I. O., Mukhortova, Y. R., Zhukov, M. V., Surmeneva, M. A., Zyuzin, M. V., Timin, A. S., and Surmenev, R. A. (2020) Development of optimized strategies for growth factor incorporation onto electrospun fibrous scaffolds to promote prolonged release, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **12**, 5578–5592, doi: 10.1021/acsami.9b20697.
  36. Chubrik, A., Senatov, F., Kolesnikov, E., Orlova, P., Poponova, M., Grunina, T., Bartov, M., Nikitin, K., Krivozubov, M., Generalova, M., Manskikh, V., Lunin, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (2020) Highly porous PEEK and PEEK/HA scaffolds with *Escherichia coli*-derived recombinant BMP-2 and erythropoietin for enhanced osteogenesis and angiogenesis, *Polym. Test.*, **87**, 106518, doi: 10.1016/j.polymertesting.2020.

## HYBRID IMPLANTS BASED ON CALCIUM-MAGNESIUM SILICATE CERAMIC DIOPSIDE AS A CARRIER OF RECOMBINANT BMP-2 AND DEMINERALIZED BONE MATRIX AS A SCAFFOLD: ECTOPIC OSTEOGENESIS IN INTRAMUSCULAR IMPLANTATION IN MICE

A. S. Karyagina<sup>1,2,3\*</sup>, P. A. Orlova<sup>1</sup>, A. V. Zhulina<sup>1</sup>, M. S. Krivozubov<sup>1</sup>, T. M. Grunina<sup>1,3</sup>, N. V. Strukova<sup>1</sup>, K. E. Nikitin<sup>1</sup>, V. N. Manskikh<sup>1,2</sup>, F. S. Senatov<sup>1,4</sup>, and A. V. Gromov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology,  
Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia;  
e-mail: akaryagina@gmail.com, alexander.v.gromov@gmail.com



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

<sup>3</sup> *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *National University of Science and Technology "MISIS", 119049 Moscow, Russia*

High efficiency of hybrid implants based on calcium-magnesium silicate ceramic diopside as a carrier of recombinant BMP-2 and xenogenic demineralized bone matrix (DBM) as a scaffold for bone tissue regeneration was demonstrated previously on the model of critical size cranial defects in mice. In order to investigate the possibility of using these implants for growing autologous bone tissue using the *in vivo* bioreactor principle in the patient's own body, the effectiveness of the ectopic osteogenesis induced by them in intramuscular implantation in mice was studied. At 7 µg dose of BMP-2 per implant, after 1 week we observed a dense agglomeration of cells, probably skeletal muscle satellite precursor cells, with areas of intense chondrogenesis, the initial stage of indirect osteogenesis, around the implants. After 12 weeks, a dense bone capsule of trabecular structure was formed, covered with periosteum, with mature bone marrow located in the spaces between the trabeculae. The capsule volume was about 8-10 times the volume of the original implant. There were practically no signs of inflammation and foreign body reaction. Microcomputer tomography data showed a significant increase of the relative bone volume, number of trabeculae and bone tissue density in the group with BMP-2 in comparison with the group without BMP-2. Considering that DBM can be obtained in practically unlimited quantities, of the required size and shape, and the BMP-2 used, which is obtained by synthesis in *E. coli* cells, is relatively inexpensive, further development of the *in vivo* bioreactor model based on hybrid implants from BMP-2, diopside and xenogenic DBM seems promising.

**Keywords:** diopside, calcium-magnesium silicate ceramics, implant, BMP-2, demineralized bone matrix, ectopic osteogenesis

## ЦЕЛОСТНОСТЬ И БАРЬЕРНАЯ ФУНКЦИЯ МАКРОСОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ НЕ НАРУШАЮТСЯ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ *in vitro*

© 2023 А.Ю. Хапчаев\*, О.А. Антонова, О.А. Казакова, М.В. Самсонов, А.В. Воротников, В.П. Ширинский

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова»  
Минздрава России, Институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова,  
121552 Москва, Россия; электронная почта: AYKhapchaev@cardio.ru

Поступила в редакцию 13.01.2023

После доработки 08.07.2023

Принята к публикации 11.07.2023

Гипергликемия является отличительной чертой сахарного диабета 2-го типа (СД2), связанной с дисфункцией эндотелия сосудов и сердечно-сосудистыми осложнениями. Многие исследования *in vitro* обнаружили апоптоз эндотелиальных клеток как ранний результат экспериментальной гипергликемии и обозначили гибель клеток как ключевой фактор повреждения сосудов при СД2. Однако в условиях *in vivo* апоптоз не наблюдается вплоть до поздних стадий развития СД2. В данной работе мы исследовали долгосрочные (до 4 недель) эффекты высокой концентрации глюкозы (HG, 30 мМ) на эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC). HG не изменяла морфологию эндотелиального монослоя, уровень продукции АФК и NO и оказывала лишь незначительное влияние на маркеры апоптоза. Реакции эндотелиального барьера на различные воздействия не отличались от реакции клеток, культивируемых при физиологическом уровне глюкозы (LG, 5 мМ). Фокусируясь на ключевых регуляторах сократительной активности цитоскелета и эндотелиального барьера, мы не выявили различий в индуцированных гистамином изменениях внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и уровня фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина или фосфатазы легких цепей миозина. Полученные нами результаты показывают, что эндотелиальные клетки сосудов могут хорошо переносить относительно длительное воздействие HG, и нужны дальнейшие исследования для изучения механизмов развития сосудистых нарушений при прогрессирующем СД2.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** HUVEC, эндотелиальный барьер, гипергликемия, инсулин, АФК, NO, РЛЦ миозина, MYPT1.

**DOI:** 10.31857/S0320972523080079, **EDN:** IJZJNE

### ВВЕДЕНИЕ

Гипергликемия является основным признаком сахарного диабета 2-го типа (СД2), связанным с дисфункцией клеток эндотелия сосудов [1, 2] и сердечно-сосудистыми осложнениями [3–6]. Макрососудистые осложнения являются основной причиной заболеваемости и смертности при диабете [7]. Предполагается, что окислительный стресс является объединяющим механизмом эндотелиальной дис-

функции, вызванной гипергликемией [8–10]. Поскольку эндотелиальные клетки сосудов малодоступны *in vivo*, их изучают *in vitro* путем выделения и культивирования в монослой [11, 12]. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) являются наиболее распространенной моделью сосудистого эндотелия *in vitro* [13, 14]. Они часто используются при изучении влияния экспериментальной гипергликемии на функции эндотелия (см. обзор Vorotnikov et al. [15]). Многие авторы отмечают

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; РЛЦ – регуляторные легкие цепи миозина; СД2 – сахарный диабет 2-го типа; EBM – базальная среда для культивирования клеток эндотелия; EGM – среда для роста эндотелиальных клеток; HG – высокая концентрация глюкозы; HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека; LG – нормальная концентрация глюкозы; MLCK – киназа легкой цепи миозина; MYPT1 – миозин-связывающая субъединица-1 миозинфосфатазы; ROCK – RhoA-ассоциированная протеинкиназа; TER – трансэндотелиальное электрическое сопротивление.

\* Адресат для корреспонденции.

апоптоз и гибель клеток как ранний и общий ответ клеток на высокий уровень глюкозы во внешней среде (HG) [8, 16]. Однако в отсутствие сопутствующих патологий HG может длительно сохраняться у диабетиков без выраженного апоптоза эндотелиальных клеток [17–19]. Такое несоответствие требует изучения с использованием протоколов длительного культивирования эндотелиальных клеток *in vitro*.

До сих пор в большинстве эндотелиальных протоколов *in vitro* использовалась кратковременная (обычно от 1–2 до 7 дней) обработка клеток HG (см. обзор Vorotnikov et al. [15]) с идеей, что чрезмерно высокий уровень глюкозы (25–30 мМ) отражает результат длительного воздействия более низких концентраций глюкозы *in vivo*. Продолжительное (7–14 дней) культивирование HUVEC было использовано в лаборатории Ceriello [20, 21] для изучения более выраженных эффектов осцилляций глюкозы по сравнению с постоянной HG. Тем не менее даже в этом случае (через 14 дней) постоянная HG существенно не повышала уровня маркеров апоптоза. Применение краткосрочных протоколов при отсутствии морфологических наблюдений *in vitro* не позволяет оценить способность эндотелиального монослоя противостоять апоптотическому повреждению.

Физический барьер между кровью и прилегающими тканями является одной из основных функций эндотелия сосудов [22]. Различные патологические состояния (например, СД2) и стрессоры, такие как активные формы кислорода (АФК) или медиаторы воспаления (например, гистамин), могут нарушать целостность эндотелиального монослоя [23–25], что ведет к повышению проницаемости сосудов и развитию отека. Сокращение эндотелиальных клеток и образование межклеточных зазоров зависит от активности миозина II [26], которая регулируется фосфорилированием его регуляторных легких цепей (РЛЦ) с участием ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [27] или  $\text{Ca}^{2+}$ -независимых механизмов [28, 29]. Основными киназами РЛЦ являются  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая киназа легких цепей миозина (MLCK) и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимая RhoA-ассоциированная киназа (ROCK) [30, 31]. Они совместно противодействуют активности фосфатазы легких цепей миозина (MLCP) [32]. Благодаря своей регуляторной миозин-связывающей субъединице MYPT1, MLCP высоко специфична к миозину и является единственной известной фосфатазой миозина в эндотелиальных клетках [33, 34]. Тогда как роль MLCK, ROCK и MLCP в регуляции гиперпроницаемости эндотелия доказана [34–37], их реакции на HG не исследованы.

Предиабетическая резистентность к инсулину ведет к развитию гиперинсулинемии. Однако, в отличие от известных неблагоприятных эффектов HG на эндотелиальный барьер, инсулин оказывает вазопротекторное действие при воспалении [38] и ослабляет сердечно-сосудистые осложнения у диабетиков [39]. В эндотелиальных клетках микрососудов *in vitro* инсулин стабилизирует эндотелиальный барьер за счет инактивации сократительного аппарата клеток [40]. Эта работа, по-видимому, является единственным исследованием влияния инсулина на фосфорилирование миозина в эндотелиальных клетках.

В настоящем исследовании мы использовали долгосрочные протоколы культивирования HUVEC с постоянной HG для изучения изменений в морфологии монослоя HUVEC, маркеров воспаления и апоптоза, барьерных свойств, развития окислительного стресса, реакций на инсулин и другие стимулы, вызывающие транзиторную проницаемость, а также для оценки влияния HG на фосфорилирование миозина и фосфатазы миозина. В целом, мы не обнаружили существенного влияния экспериментальной гипергликемии на функциональные свойства монослоя HUVEC.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** Общие реагенты, желатин и человеческий инсулин («Sigma», США) использовали, как описано ранее [41, 42]. Стандартизованная базовая среда для поддержания эндотелиальных клеток (EBM) и среда для роста эндотелиальных клеток (EGM) были получены от «Cell Application» (США, #210-500); глутамин, пенициллин и стрептомицин — от «Gibco» (США); гистамин — от «Sigma»; Fluo-4 AM (#F14201) — от «Life Technologies» (США); DAF-FM-DA (4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуоресцеин диацетат) — от «Invitrogen» (США) и DCF-DA (2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат) — от «Sigma». Для вестерн-блоттинга использовали следующие антитела: фосфо-eNOS(Ser1177) (#612392) и eNOS (#N30020L14) — «BD Biosciences» (США); моно-фосфо-РЛЦ (Ser19) (#3675), ди-фосфо-РЛЦ (S19/T18) (#3674) и антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (#7074) — «Cell Signaling» (США); анти-MYPT1 (#sc-25618), фосфо-MYPT1(S695) (#sc-337531), фосфо-MYPT1(T696) (#sc-17556), фосфо-MYPT1(T853) (#sc-17432), анти-ROCK1 (#sc-5560) и анти-ROCK2 (#sc-5561) — «Santa

Cruz Biotechnology» (США); анти-винкулин («Abcam», США; #ab18058), анти-ГАФД (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа) («Merck», США; #MAB374), анти-РЛЦ («ProteinTech», США; #10324-1-AP), антитела кролика против иммуноглобулинов мыши («Sigma»; #A9044), фосфо-ROCK2(S1366) («Invitrogen»; #PA5-34895). Биотинилированные моноклональные антитела 10F3B2 против молекулы клеточной адгезии ICAM-1 [43], набор для определения аннексина Annexin-V:FITC («Bio-Rad», США; #ANNEX100F) и набор для определения активной каспазы-3 (Active Caspase-3 FITC Mab Apoptosis Kit I, «BD Biosciences»; #550480) использовали для проточной цитофлуориметрии. Для иммунохимии использовали препараты Alexa-fluor 488-конъюгированный фаллоидин («Invitrogen»; #A-12379), DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол; «Molecular Probes» (США); #D-1306), первичные антитела против VE-кадгерина («MyBioSource», США; #MBS176401) и конъюгированные с Alexa-fluor 594 вторичные антитела против иммуноглобулинов кролика («Invitrogen»; #R37119). Набор ингибиторов протеаз и фосфатаз «Halt Protease and phosphatase inhibitor cocktail» («Thermo Fisher Scientific», США) использовали при лизисе клеток, Clarity ECL («Bio-Rad») — для получения изображений после вестерн-блоттинга. HUVEC были получены от трех здоровых доноров (от каждого донора объединяли равное количество клеток), и во всех экспериментах использовали клетки третьего пассажа.

**Поддержание монослоев HUVEC.** HUVEC культивировали в покрытых 0,2%-ным желатином 24-луночных планшетах («SPL», Южная Корея) в среде роста EGM с добавлением 2 мМ глутамина, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, как описано ранее [42]. Среда роста заменяли через день. Фазово-контрастную микроскопию проводили сразу после смены среды с использованием инвертированного микроскопа Nikon Diaphot («Nikon», Япония), снабженного камерой Nikon D40 («Nikon»). Полученные изображения обрабатывали с помощью бесплатного программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

**Проницаемость монослоя HUVEC.** Для определения проницаемости монослоя HUVEC измеряли трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TER), как описано ранее [41, 42], с использованием прибора ECIS-z («Applied Biophysics», США). Клетки высевали в лунки планшетов 8W10E («Applied Biophysics»), предварительно покрытых 0,2%-ным желатином, по  $1,8 \times 10^5$  клеток на лунку в 400 мкл

среды EGM с добавлением 2 мМ глутамина, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Непрерывный мониторинг TER начинали сразу в многочастотном режиме, который переключали на 16 кГц через 10 дней, чтобы регистрировать быстрые реакции на гистамин. После формирования прочного монослоя (значение TER 15–16 кОм) в питательную среду дополнительно добавляли 25 мМ D-глюкозы до конечной концентрации 30 мМ (экспериментальная гипергликемия, HG) и/или 1 нМ инсулина (экспериментальная гиперинсулинемия); контрольные клетки культивировали в среде EGM (5 мМ D-глюкозы, LG). Значения TER регистрировали в течение трех недель. Среда заменяли через день, поддерживая указанные концентрации глюкозы и/или инсулина.

**Измерение продукции NO.** Клетки HUVEC высевали в 96-луночные микропланшеты с черными стенками и плоским дном (μclear black, Cellstar, TC, F-bottom; «Greiner Bio-One», Австрия), покрытые 0,2%-ным желатином, по  $0,5 \times 10^5$  клеток на лунку, в 100 мкл среды EGM с добавлением 2 мМ глутамина, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. После формирования монослоя клеткам создавали условия гипергликемии и/или гиперинсулинемии, как это описано выше. Для измерения уровня NO клетки инкубировали 30 мин в 100 мкл свежей среды EBM, содержащей 2 мМ DAF-FM-DA, 1 мМ пробенецид («Invitrogen») и 15 мМ HEPES. Затем среду заменяли на 100 мкл среды EBM, содержащей только 1 мМ пробенецида и 15 мМ HEPES. Флуоресценцию DAF измеряли на микроскопе AxioVert 200M, снабженном камерой High Speed AxioCam HSm cooled CCD («Zeiss», Германия). Базальную флуоресценцию DAF в нестимулированных клетках считали фоновой флуоресценцией. В соответствующие ячейки добавляли инсулин до конечной концентрации 10 нМ. Сигналы флуоресценции DAF были получены при 10-кратном увеличении и включали 200–400 клеток в поле зрения. Изображения получали каждые 10 мин в течение 40–60 мин при минимальной интенсивности освещения, используя время экспозиции 0,8 с, чтобы свести к минимуму эффекты обесцвечивания. Все значения флуоресценции нормализовали к средней фоновой флуоресценции, которую определяли перед добавлением инсулина, и к количеству клеток. Подтверждали линейный характер кинетики накопления флуоресценции DAF, и по ее линейным участкам рассчитывали значения тангенса, соответствующего скорости выделения NO [42].



**Измерение продукции АФК.** HUVEC культивировали в 96-луночных микропланшетах, как указано выше, с добавлением или без 25 мМ глюкозы и/или 1 нМ инсулина. Перед измерением АФК среду заменяли на ЕВМ на 1 ч, затем на ЕВМ, содержащую 10 мкМ DCF-DA, на 60 мин, затем на ЕВМ на 30 мин, после чего клетки помещали на 30 мин в раствор Хэнка, содержащий 15 мМ HEPES. Интенсивность флуоресценции DCF измеряли на планшетном ридере Victor X3 («Perkin Elmer», США). Параллельно определяли фоновую флуоресценцию в клетках, не обработанных DCF-DA; эти значения вычитали из значений флуоресценции клеток, обработанных DCF-DA. Результаты выражали как разницу флуоресценции DCF в клетках, подвергнутых воздействию HG и/или инсулина, и в контрольных клетках, нормализованную к таковой в контрольных клетках [42].

**Определение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ .** HUVEC культивировали в 8-луночных камерах («Ibidi», Германия), предварительно покрытых 0,2%-ным желатином, как описано выше. В среду добавляли Fluo-4 AM на 20 мин до конечной концентрации 1 мкМ, затем добавляли 10 мМ HEPES. Флуоресценцию Fluo-4 измеряли, как указано выше, при минимальной интенсивности освещения на микроскопе AxioVert 200M, оснащенный высокоскоростной охлаждаемой камерой и встроенным термостатом, отрегулированным до 37 °C. Изображения получали с 10-секундными интервалами. Через 2 мин после начала записи к клеткам вносили 10 мкМ гистамина. Полученные данные обрабатывали с помощью модуля Physiology программного обеспечения AxioVision 4.8.2 («Zeiss») и с помощью бесплатного программного обеспечения ImageJ.

**Иммунофлуоресценция и проточная цитофлуориметрия.** HUVEC культивировали в покрытых желатином 8-луночных камерах («Ibidi») в условиях LG или HG в течение 10 дней при смене среды роста клеток через день. Клетки фиксировали в 3,7%-ном формальдегиде в фосфатном солевом растворе (PBS) в течение 5 мин и обрабатывали 0,1%-ным Triton X-100 в PBS в течение 5 мин. Фиксированные клетки блокировали в 1%-ном БСА в течение 1 ч и инкубировали сначала с первичными антителами кролика против VE-кадгерина, затем со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa-fluor 594 (для окраски VE-кадгерина), и с фаллоидином, конъюгированным с Alexa-fluor 488 (для окраски F-актина); для визуализации клеточных ядер использовали DAPI. Флуоресценцию регистрировали на микроскопе Leica Stellaris 5 при 40-кратном

увеличении, изображения обрабатывали с помощью бесплатного программного обеспечения LAS X 3.7.6.25997 («Leica Microsystems CMS GmbH», Германия), GIMP 2.10.34 и ImageJ.

Проточный цитофлуориметр FACSCanto II («Becton Dickinson», США) использовали для определения экспозиции на поверхности клеток провоспалительного маркера (ICAM-1), или раннего маркера апоптоза (фосфатидилсерин) [44, 45], или внутриклеточного специфического маркера апоптоза (активированной каспазы-3) [46]. Через 2 дня после последней замены среды в каждой пробе анализировали не менее 3000 клеток. Для этого собирали клеточную среду с открепившимися клетками и осаждали клетки путем низкоскоростного центрифугирования. Прикрепленные клетки снимали раствором трипсин/ЭДТА (0,02%/0,05%). Для каждой лунки эти две клеточные фракции объединяли и делили на три части: 1) для определения ICAM-1, 2) для определения фосфатидилсерина (путем связывания аннексина V) и окрашивания пропидий йодидом, 3) для определения активированной каспазы-3. Последующие процедуры выполняли в соответствии с инструкциями производителя и как это было описано ранее [47].

**Вестерн-блоттинг.** Клетки HUVEC выращивали до достижения монослоя в чашках диаметром 35 мм, предварительно покрытых 0,2%-ным желатином в среде EGM, как описано выше, в условиях LG или HG, без или с добавлением инсулина. Клетки стимулировали гистамином (10 мкМ) в течение разного времени, после чего клеточную среду удаляли, клетки быстро промывали ледяным PBS и лизировали в 2-кратном буфере Лэммли для образцов, содержащем также набор ингибиторов протеаз и коктейль с ингибиторами фосфатаз. Лизаты клеток 10 раз пропускали через иглу шприца 30G для разрушения ДНК, нагревали при 56 °C в течение 30 мин и центрифугировали при 16 000 g (4 °C, 10 мин). Вестерн-блоттинг проводили, как описано ранее [41, 42], с использованием прибора Criterion («Bio-Rad») при 0,4 А·ч для переноса белков на поливинилиденфторидные мембраны («Millipore», США). Мембраны инкубировали с сайт-специфическими или независимыми от фосфорилирования антителами, а затем со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой. Разные формы РЛЦ визуализировали последовательно на одной и той же мембране после стрипирования антител, как описано ранее [48]. Изображения получали, обрабатывали и анализировали с помощью реагентов Clarity ECL, прибора Fusion-SL 3500WL («Vilber Lourmat»,

Франция) и программы ImageJ; уровни содержания общего белка в образцах нормализовали по винкулину и ГАФД. Для сравнения разных наборов образцов в гели загружали эталонные образцы.

**Статистическая обработка результатов.** Полученные данные анализировали с использованием двустороннего U-критерия Манна–Уитни с уровнем значимости 0,05. Для проведения множественных сравнений применяли критерий Крускала–Уоллиса, а затем – апостериорный критерий Данна с использованием поправки Бонферрони. Данные представлены в виде диаграмм «ящик с усами» (box-and-whisker) или среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ), как указано в подписях к рисункам. Эксперименты проводили не менее чем в двух повторах и повторяли  $n$  раз, как указано в подписях к рисункам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы долгосрочные протоколы культивирования HUVEC без посева клеток и с заменой питательной среды через день. Для сравнения с результатами других исследований, измерения NO и АФК, маркеров апоптоза и уровня фосфорилирования белков проводили через 5 дней после воздействия HG на клетки. Остальные эксперименты проводили, используя длительные протоколы (три и более недели), для мониторинга состояния клеточного монослоя, эндотелиального барьера и кальциевых ответов.

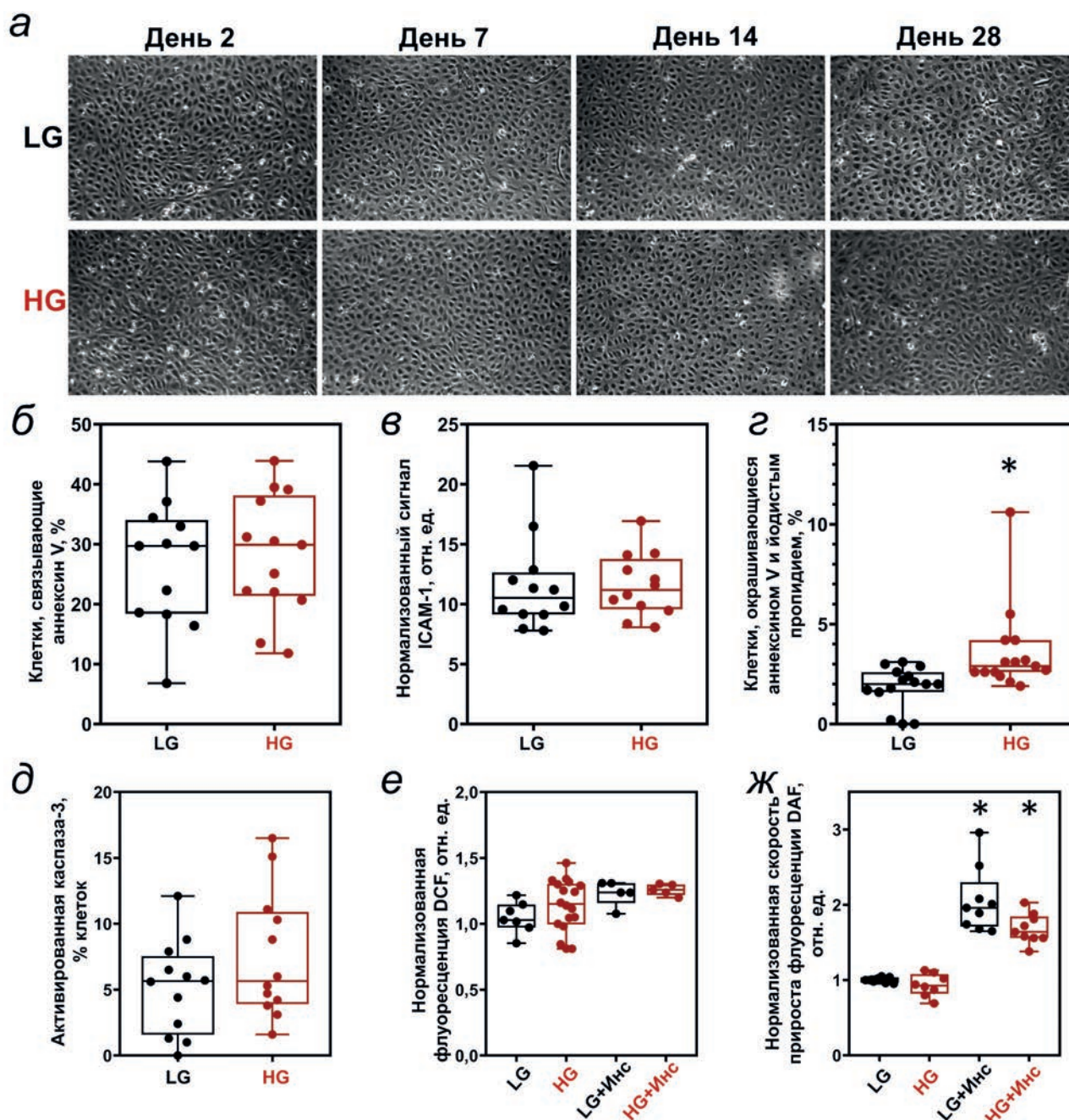
**HG не влияет на морфологию монослоя HUVEC и продукцию АФК и NO.** Световая микроскопия показала, что эндотелиальный монослой сохранял классический вид «булыжной мостовой», который не изменялся при воздействии HG в течение 4 недель (рис. 1, *а*). Мы не обнаружили существенных изменений в экспозиции провоспалительного фосфатидилсерина (рис. 1, *б*) или молекулы клеточной адгезии ICAM-1 (рис. 1, *в*) на поверхности клеток через 5 дней воздействия HG. Значимое различие по сравнению с контрольными клетками (хотя всего лишь  $3,00 \pm 0,99\%$  против  $2,08 \pm 0,78\%$ ) было обнаружено для дважды положительных по аннексину V и йодиду пропидия клеток (рис. 1, *г*), что указывает на инициацию апоптоза в этих клетках [44]. Хотя количество клеток, положительных по активированной каспазе-3, истинному маркеру апоптоза [46], было заметно выше в условиях HG (рис. 1, *д*), в среднем оно не превышало 6% от всей клеточной популяции, и эти различия не достигали статисти-

ческой значимости. Уровень АФК, измеренный на 5-й день воздействия HG, также был выше, но статистически не отличался от такового в контрольных клетках, культивированных в LG (рис. 1, *е*). Наконец, ни базальная, ни стимулированная инсулином продукция NO не изменялись под действием HG (рис. 1, *ж*). В целом, эти результаты показывают, что длительная экспериментальная гипергликемия не нарушает целостность монослоя HUVEC, а также не увеличивает продукцию АФК или NO в течение срока воздействия HG, обычно используемого в других работах. Далее мы исследовали барьерные свойства монослоя HUVEC и его реакции на различные стрессоры.

**HG не влияет на эндотелиальный барьер HUVEC.** Эндотелиальный барьер регистрировали непрерывно по трансэндотелиальному электрическому сопротивлению (TER). На рис. 2, *а* и *б* показаны репрезентативные записи TER, полученные в течение первых 10 дней после посева клеток и последующих 10 дней соответственно. Через 2 дня барьер полностью укрепился и значения TER стабилизировались на уровне 16–18 кОм. После этого инициировали экспериментальную гипергликемию и/или гиперинсулинемию. В отдельных экспериментах, показанных на рис. 2, *а*, HG умеренно снижала уровень TER примерно на 10%, но затем TER постепенно восстановился до значений, наблюдаемых до инициации HG и в LG. В других экспериментах (не показано) начальное падение уровня TER не было очевидным.

Во всех культурах HUVEC наблюдалось резкое падение значений TER после каждой смены среды, после чего уровень TER восстанавливался до исходных значений в течение последующих нескольких часов. Эти изменения, вызванные свежей средой, были более выражены в клетках, находящихся в условиях HG, но на 10-й день их амплитуда сравнялась с таковой в контрольных клетках. После этого номинальные значения TER клеток в условиях HG демонстрировали тенденцию к превышению показателей контрольных (LG) клеток при сохранении схожей динамики (рис. 2, *б*). В течение этого периода мы исследовали реакции TER на различные стрессоры, такие как напряжение сдвига, вызванное повторным пипетированием среды, стимуляцию гистамином (10 мкМ) (рис. 2, *б*), или  $\alpha$ -тромбином (100 нМ) (рис. 2, *д*), или клеточным голоданием (среду не меняли 3 дня) (рис. 2, *е*). После каждого воздействия проводили замену среды на свежую для удаления остаточных эффектов стрессорного агента. Очевидно, что HG существенно не изменяла ответы TER на напряжение сдвига,



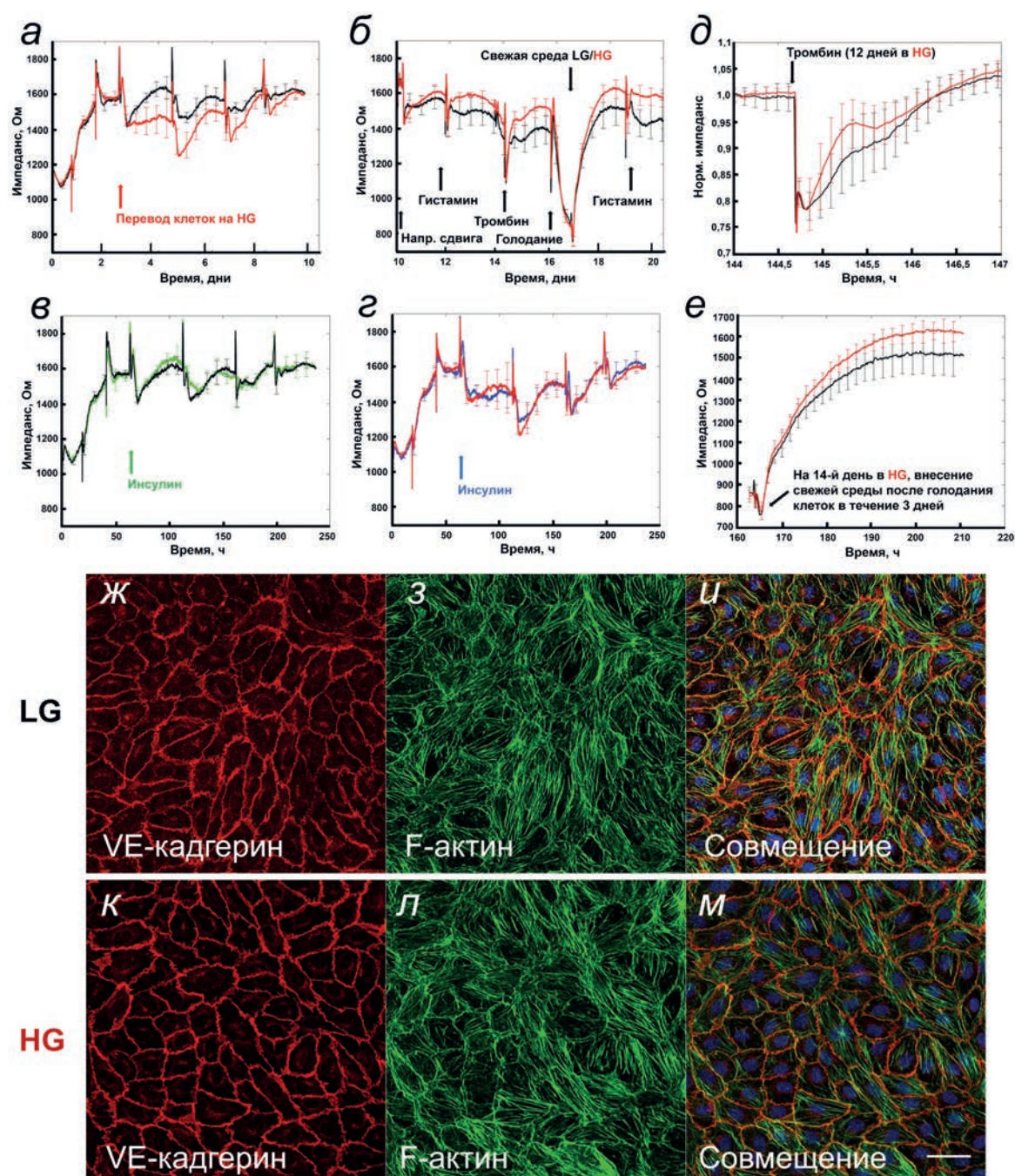


**Рис. 1.** Влияние экспериментальной гипергликемии на морфологию монослоя HUVEC (*a*), провоспалительные маркеры (*б* и *в*), маркеры апоптоза (*г* и *д*), продукцию АФК (*е*) и NO (*ж*). Клетки культивировали в обычной среде EGM (LG) или EGM с добавлением 25 мМ глюкозы (HG) в течение 4 недель (*a*) или 5 дней (*б–ж*), как указано. *a* – Репрезентативные фазово-контрастные изображения клеточных монослоев, полученные после замены клеточной среды. Провоспалительное состояние клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии через 2 дня после последней замены культуральной среды: *б* – по экспозиции фосфатидилсерина (связывание аннексина V); *в* – по экспрессии молекул адгезии ICAM-1 на внешней поверхности плазматической мембраны. Апоптоз HUVEC измеряли по доле клеток, дважды положительных по аннексину V и йодистому пропидию (PI) (*г*) или положительных по активированной каспазе-3 (*д*). Данные представлены в виде диаграмм, показывающих межквартильный диапазон (*б–ж*) и выраженных в процентах клеток, положительных по соответствующему маркеру (*б, г, д*), или в виде сигнала флуоресценции, нормализованного относительно сигнала в контрольных (LG) образцах (*в, е, ж*). Инсулин (1 нМ) присутствовал в течение всего периода (*е*) или был внесен однократно на 30 мин (*ж*), где это указано (+ Ins). \*  $p = 0,0056$  (*г*),  $p = 0,00012$  (*ж*, LG + Ins),  $p = 0,0015$  (*ж*, HG + Ins) по сравнению с соответствующими контролями,  $n = 4–5$

гистамин или  $\alpha$ -тромбин, восстановление после голодания, т.е. ответы были сходными по длительности и амплитуде. Экспериментальная гиперинсулинемия также не повлияла на реак-

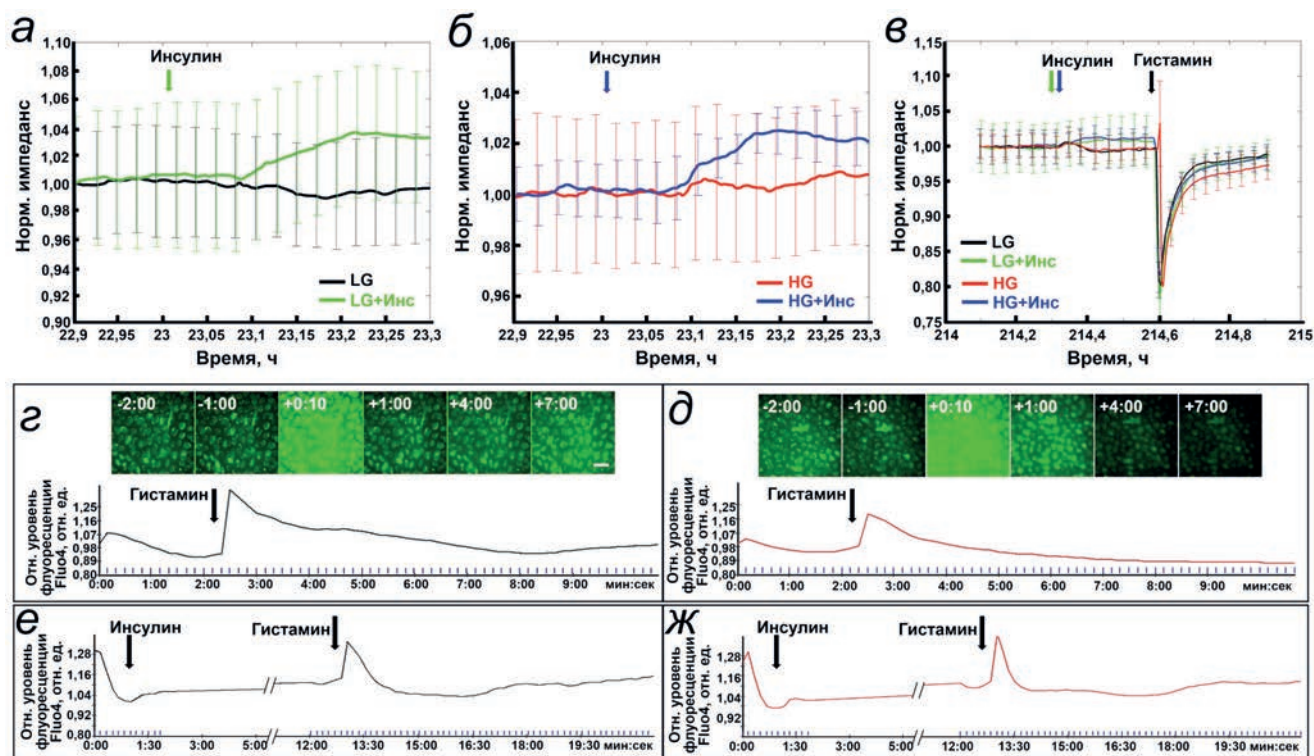
ции TER ни контрольных клеток (рис. 2, *в*), ни клеток в условиях HG (рис. 2, *г*). Окрашивание VE-кадгерина (рис. 2, *ж* и *к*) и актинового цитоскелета (рис. 2, *з* и *л*) в клетках, находившихся





**Рис. 2.** Длительная экспериментальная гипергликемия и/или гиперинсулинемия существенно не влияют на базовое электрическое сопротивление эндотелиального барьера HUVEC и его реакции на стресс. Трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TER) монослоя HUVEC регистрировали непрерывно при частоте 16 кГц в условиях низких (LG, 5 мМ) или высоких концентраций глюкозы (HG, 30 мМ) и/или инсулина (1 нМ). Смену среды проводили через день или сразу после получения реакции на стрессовый стимул. *а* – Записи TER в условиях HG (красная кривая) и LG (черная кривая) за первые 10 дней после посева клеток; HG инициировали через 62 ч после посева (красная стрелка). *б* – Записи TER для последующих 10 дней, как продолжение записи на панели (*а*). Стрелками отмечены реакции на указанные стрессоры. *в* и *г* – Записи TER за первые 10 дней после посева клеток в присутствии 1 нМ инсулина (момент добавления отмечен стрелкой на 62 ч) для имитации гиперинсулинемии в LG (*в*), зеленая кривая, или в HG (*г*), красная кривая. *д* и *е* – Клетки культивировали в условиях LG (черная кривая) или HG (красная кривая) и измеряли ответы TER на воздействие 100 нМ  $\alpha$ -тромбина (*д*) или как восстановление после голодания (*е*) в моменты времени, отмеченные соответствующими стрелками на панели (*б*). Чтобы упростить сравнение, на панели (*д*) приведены нормализованные значения TER, где фактические значения TER составляли ~14 кОм как для условий LG, так и для HG. Каждая кривая представляет собой среднее электрическое сопротивление монослоя с планками погрешностей, указывающими стандартные отклонения на основе 8 (*а*, *б*, *д*, *е*) или 4 (*в*, *г*) измерений в параллельных лунках. *ж–м* – Флуоресцентные изображения HUVEC, культивированных в течение 10 дней в условиях LG (*ж–и*) или HG (*к–м*) и окрашенных антителами к VE-кадгерину (панели *ж* и *к*; красный) или фаллоидином на F-актин (*з* и *л*; зеленый), а также DAPI для визуализации ядер клеток (*и* и *м*; синий). Объединенные изображения представлены на панелях *и* и *м*. Шкала – 50 мкм





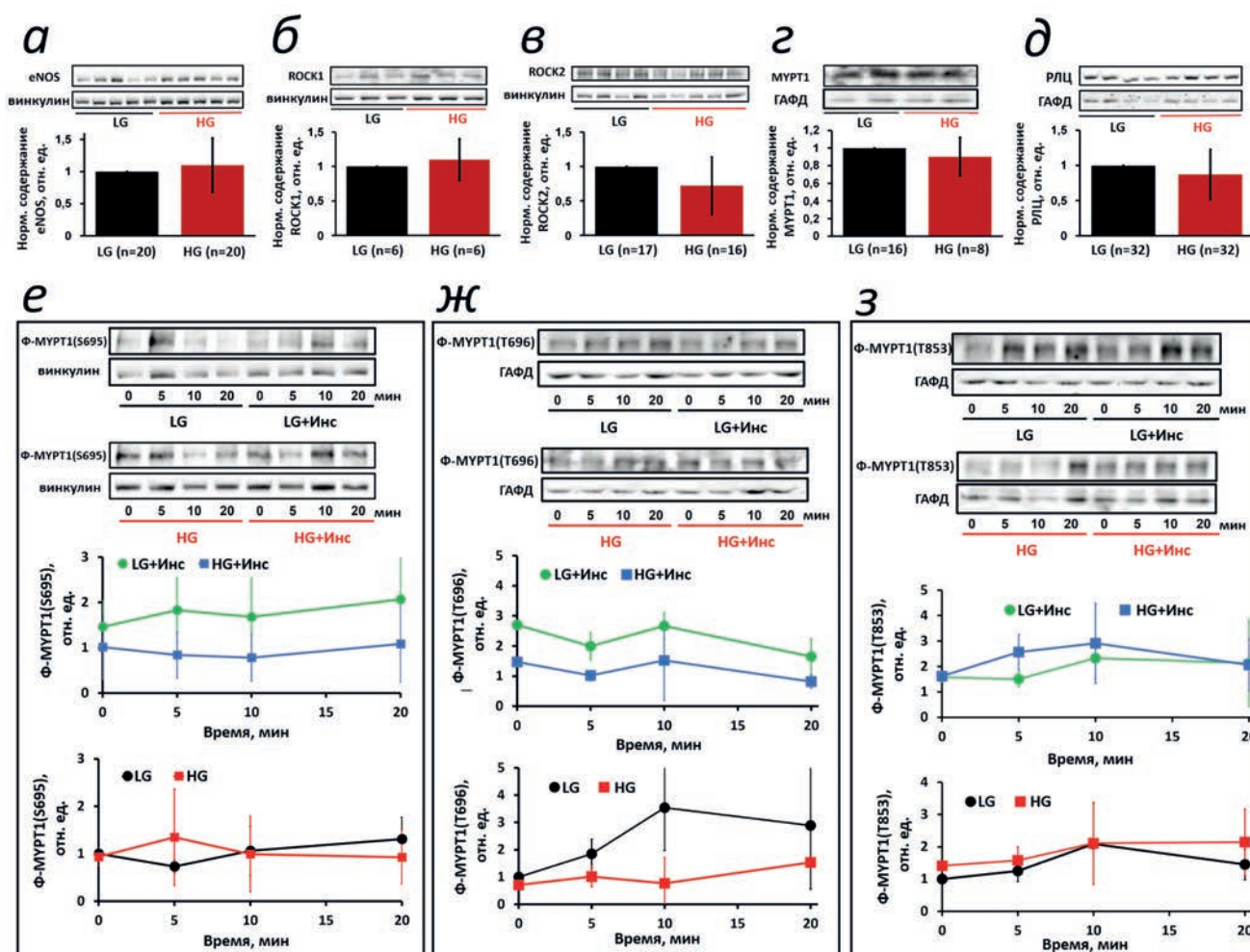
**Рис. 3.** HG и инсулин не влияют на транзиторные реакции  $[Ca^{2+}]_{in}$  и эндотелиальный барьер HUVEC в ответ на гистамин. *а–в* – Клетки культивировали в состоянии монослоя в условиях LG (*а*) или HG (*б*) и стимулировали на 11-й день 10 нМ инсулина, демонстрируя отсутствие различий между LG и HG. После такой же однократной стимуляции клеток инсулином на 20-й день проводили последующую стимуляцию гистамином (10 мкМ), которая вызывала одинаковые транзиторные ответы TER (*в*). Показаны репрезентативные нормализованные записи TER; его фактические значения составляли ~14–15 кОм для всех кривых. Каждая кривая представляет среднее электрическое сопротивление монослоя с планками погрешностей, указывающими значения стандартной ошибки среднего (SEM) для четырех параллельных измерений. *г–ж* – HUVEC культивировали в состоянии монослоя в условиях LG (*г* и *е*) или HG (*д* и *ж*) в течение 10 дней, инкубировали с Fluo-4 AM и стимулировали гистамином (10 мкМ) в момент времени 0:00 (мин:сек) или инсулином (1 нМ), как указано стрелками. На верхних панелях (*г* и *д*) показаны репрезентативные необработанные изображения флуоресценции Fluo-4 в одном поле зрения в указанные моменты времени. Кривые в нижней части панелей показывают динамику флуоресценции Fluo-4

в условиях LG или HG в течение 10 дней, также не показало повреждающего эффекта HG на межклеточные контакты. В целом, эти результаты не выявили существенного влияния длительной HG на целостность барьера и функцию монослоя HUVEC *in vitro*.

**Инсулин не влияет на изменения внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$  и эндотелиальный барьер HUVEC в ответ на действие гистамина.** Тогда как длительная экспериментальная гиперинсулинемия не влияла на эндотелиальный барьер HUVEC (рис. 2, *в* и *г*), мы проверили гипотезу о том, влияет ли инсулин на мобилизацию внутриклеточного  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_{in}$ ) и проницаемость монослоя HUVEC в ответ на гистамин. Однократная стимуляция инсулином вызывала небольшие изменения TER, показывающие, что клетки реагировали на инсулин (рис. 3, *а–в*). Однако инсулин не изменял транзиторной реакции TER на гистамин, независимо от того подвергались ли клетки воздействию HG или нет (рис. 3. *в*). Соответственно,

ни инсулин, ни HG не влияли на повышение  $[Ca^{2+}]_{in}$ , вызванное гистамином. Типичный профиль  $[Ca^{2+}]_{in}$ , регистрируемый с помощью зеленого флуоресцентного кальциевого зонда Fluo-4 (рис. 3, *г* и *е*), оставался неизменным для всех клеток независимо от HG или инсулина (рис. 3, *е* и *ж*). Примечательно, что спонтанные колебания  $[Ca^{2+}]_{in}$  происходили случайным образом в отдельных нестимулированных клетках. Гистамин увеличивал флуоресценцию Fluo-4 одновременно во всех клетках в течение 10–20 с, после чего интенсивность флуоресценции возвращалась к исходному уровню. В целом, эти результаты показывают, что длительная HG не влияет на всплески  $[Ca^{2+}]_{in}$  и проницаемость барьера HUVEC в ответ на гистамин.

**HG не изменяет содержания и уровня фосфорилирования цитоскелетных мишеней.** Кроме быстрого  $Ca^{2+}$ -зависимого воздействия на TER, гистамин вызывает в эндотелиальных клетках более длительные сигнальные реакции, которые могут влиять на барьерную функцию клеток [28].



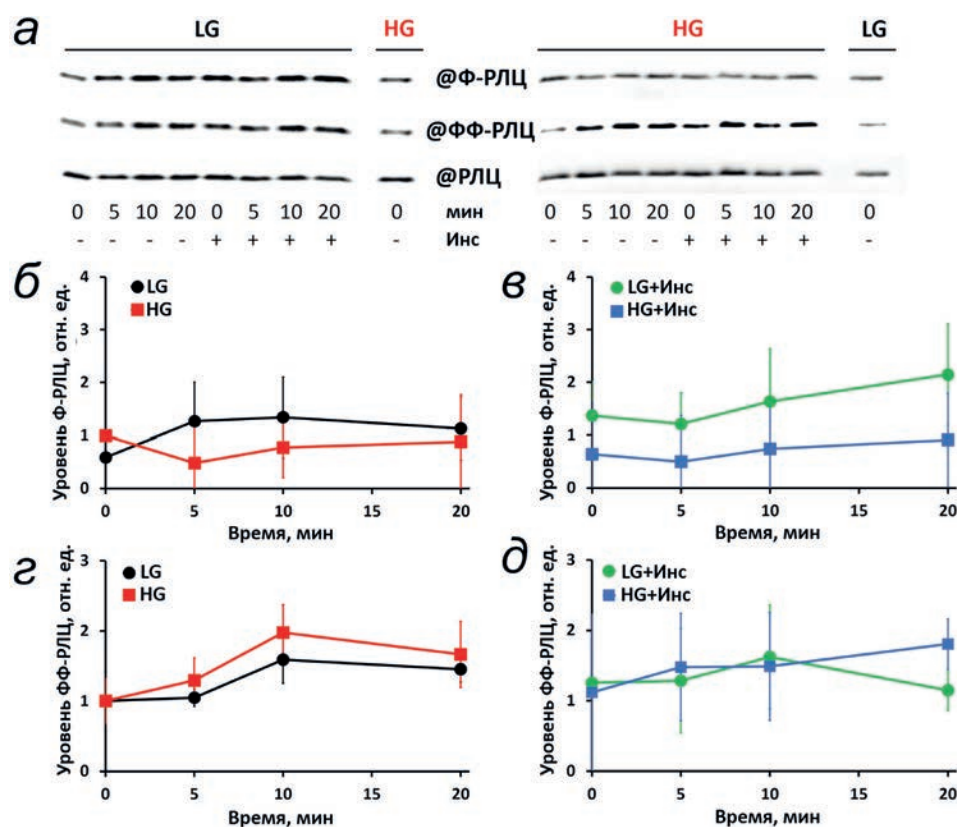
**Рис. 4.** HG и инсулин не влияют на содержание регуляторных белков и гистамин-зависимое фосфорилирование MYRPT1 в HUVEC. Клетки культивировали в течение 5 дней в присутствии 5 mM (LG) или 30 mM (HG) глюкозы и стимулировали 10 мкМ гистамина без или с предварительной стимуляцией 10 нМ инсулина в течение 10 мин (+Инс). *а–д* – Содержание белка анализировали с помощью вестерн-блоттинга в лизатах клеток, культивированных в условиях LG (черные столбцы) или HG (красные столбцы). Полученные значения нормализовали относительно винкулина (для eNOS, ROCK1/2) или ГАФД (для MYRPT1, РЛЦ), а затем – относительно содержания соответствующего белка в контрольных клетках (условия LG). Под каждым столбцом указано число независимых измерений, типичные изображения мембран иммуноблота показаны над соответствующими столбцами. *е–з* – Динамика фосфорилирования белков в ответ на добавление гистамина в момент времени 0 мин. Все значения нормализованы относительно базового уровня фосфорилирования Ser695 (*е*), Thr696 (*ж*) или Thr853 (*з*) в условиях LG без добавки инсулина. Все данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение по результатам по крайней мере двух независимых экспериментов, каждый из которых был проведен в трех повторах

Мы обнаружили, что через 5 дней пребывания HUVEC в условиях HG содержание обеих изоформ ROCK (ROCK1 и ROCK2), eNOS, MYRPT1 и РЛЦ в клетках не изменилось (рис. 4, *а–д*). Далее, мы проверили влияние HG на гистамин-зависимое фосфорилирование РЛЦ и MYRPT1 до или после предварительной стимуляции клеток инсулином. Фосфорилирование MYRPT1 по сайтам, регулирующим фосфатазную активность (Ser695, Thr696 и Thr853), было одинаковым на базовом уровне и незначительно изменялось после стимуляции HUVEC гистамином как в условиях LG, так и HG. Предварительная стимуляция инсулином вызывала умеренное, но незначительное повышение уровней фос-

форилирования Ser695 и Thr696 (рис. 4, *е* и *ж*) и не изменяла уровень фосфорилирования Thr853 (рис. 4, *з*).

Экспериментальная гипергликемия не оказывала существенного влияния ни на базовый, ни на стимулированный гистамином уровень фосфорилирования РЛЦ (рис. 5). Поскольку динамика монофосфорилирования РЛЦ (Ф-РЛЦ) (рис. 5, *б* и *в*) в основном отражает активность  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой MLCK [32], фактическое отсутствие реакции фосфорилирования в минутном диапазоне согласуется с быстрыми изменениями  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  в секундном диапазоне ( $\sim 30$  с) в ответ на гистамин (рис. 3). Хотя просматривается тенденция к снижению уровня Ф-РЛЦ в клетках,





**Рис. 5.** HG и инсулин не влияют на индуцированное гистамином фосфорилирование РЛЦ в HUVEC. Клетки подвергали стимуляции, как описано на рис. 4, и анализировали с помощью вестерн-блоттинга на монофосфорилирование (Ф-РЛЦ), дифосфорилирование (ФФ-РЛЦ) и содержание регуляторных легких цепей миозина (РЛЦ). Окрашивание мембран проводили последовательно после stripping предыдущих антител. а – Типичные изображения мембран, показывающие динамику монофосфорилирования РЛЦ по Ser19 (Ф-РЛЦ, верхние панели), дифосфорилирования РЛЦ по Ser19/Thr18 (ФФ-РЛЦ, средние панели) и содержания РЛЦ (нижние панели) в клетках, культивированных в условиях LG или HG, как указано. б–д – Графики, отражающие динамику Ф-РЛЦ (б и в) или ФФ-РЛЦ (г и д) в клетках без (б и г) и после (в и д) предварительной стимуляции 10 нМ инсулина. Данные представлены как нормализованные средние значения  $\pm$  стандартное отклонение по результатам по крайней мере четырех независимых экспериментов, каждый из которых был выполнен в двух повторах

культивированных в HG и предварительно стимулированных инсулином, это различие не было статистически значимым (рис. 5, в). Динамика дифосфорилирования РЛЦ (ФФ-РЛЦ) показала ~2-кратное увеличение через 10 мин после стимуляции гистамином (рис. 5, г), но ни HG, ни присутствие инсулина на изменения не влияли (рис. 5, д). Увеличение уровня ФФ-РЛЦ может отражать активацию RhoA гистамином [28], что согласуется с основным вкладом ROCK в дифосфорилирование РЛЦ [32].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы обнаружили, что целостность и внешний вид монослоя HUVEC не изменяются при длительном воздействии HG на клетки. Это позволяет предположить, что нормальные функции клеток также сохраняются, что хорошо согласуется с сохранением барьерных свойств монослоя HUVEC. За исключением тенденции

к увеличению маркеров апоптоза через 5 дней в HG, ни повышения накопления АФК, ни изменения скорости продукции NO не наблюдалось. Экспериментальная гиперинсулинемия не влияла на эндотелиальный барьер как в HG, так и в LG. Эти результаты находятся в кажущемся противоречии со многими сообщениями о том, что HG быстро повышает продукцию АФК и NO в HUVEC и других эндотелиальных клетках, вызывая окислительный стресс и апоптоз (см. обзор [15] и ссылки в нем). При этом различия в апоптозе между клетками, культивированными в HG и LG, были статистически достоверными, но небольшими, оставаясь в пределах нескольких процентов (2–10% при измерении разными методами): 3,5% [49], 10% [50], 5% [51], 6–8% [52], 5% [53], 2,5% [7] и 2% даже после длительного воздействия HG на HUVEC в течение 2 недель [21]. В целом, полученные нами значения находятся в том же диапазоне. Воспалительная реакция, о которой можно судить по экспозиции ICAM-1,

не развивалась. Усиление апоптотической реакции клеток на HG (по результатам двойного окрашивания аннексином V и йодидом пропидия) было достоверным, но также оставалось в пределах нескольких процентов. Более того, истинный маркер апоптоза, активированная каспаза-3, показывал лишь тенденцию к повышению без статистически достоверных различий. Эти результаты свидетельствуют, что если HG и усиливает апоптоз, то его доля от общей популяции клеток низка и постоянна, а целостность эндотелиального монослоя поддерживается за счет пролиферации и распластывания соседних клеток. Этот феномен не мог быть замечен в предыдущих работах, поскольку в них использовались краткосрочные протоколы воздействия HG. С этим выводом согласуется отсутствие существенных изменений эндотелиального барьера HUVEC в условиях HG (рис. 2). Вопрос о том, могут ли колебания HG [20, 21] снижать устойчивость клеток и давать качественно иной результат, представляется важным и требует повторного исследования.

Отсутствие повреждающих эффектов HG на HUVEC дополнительно подтверждается отсутствием различий в реакциях эндотелиального барьера на стрессовые воздействия, в межклеточных контактах и актиновом цитоскелете. В частности, HG не изменяла реакции TER в ответ на гистамин,  $\alpha$ -тромбин или инсулин. Известно, что ответы на гистамин слабые и зависят от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [27, 29]. Ни инсулин, ни HG не влияли на повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ , вызванное гистамином. Тем не менее остается возможным, что HG может влиять на отсроченные реакции эндотелия на стимулы, задействующие  $\text{Ca}^{2+}$ -независимые механизмы в дополнение к классическим  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым.

Индуктированное гистамином фосфорилирование белков цитоскелета согласуется с реакцией эндотелиального барьера на этот агонист. Сократимость цитоскелета, регулируемая  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми и независимыми механизмами, обеспечивает тонкую настройку реакций эндотелиального барьера на внешние сигналы [28, 29]. Она зависит от фосфорилирования РЛЦ миозина [26], регулируемого киназами РЛЦ и фосфатазой [30, 34–37]. Ни содержание этих ключевых регуляторов, ни их фосфорилирование, ни фосфорилирование самих РЛЦ в ответ на гистамин существенно не изменялись под действием HG. Возможность того, что эти пути могут активироваться инсулином и изменять реакции на гистамин, скорее всего, можно исключить, поскольку предварительная стимуляция клеток инсулином практически не влияла на реакцию TER. Стимуляция инсу-

лином показала только тенденцию к увеличению фосфорилирования MYPT1 по остаткам Ser695 и Thr696. Если для Ser695 известно, что его фосфорилирование опосредовано eNOS и cGMP-зависимой протеинкиназой [54], то за фосфорилирование Thr696, скорее всего, отвечает ROCK, активируемая RhoA [28]. Однако фосфорилирование этих остатков оказывает противоположное воздействие на активность фосфатазы [54], что согласуется с отсутствием изменений общего уровня фосфорилирования РЛЦ.

В целом, наши результаты указывают, что сосудистый эндотелий устойчив к длительному воздействию HG. Отсутствие ранних ответов на HG в виде повышения уровня АФК и изменения продукции NO, которые часто наблюдались в предыдущих исследованиях, моделирующих гипергликемию *in vitro* [15], не означает, что они не могут развиваться на более поздних стадиях СД2. Вполне вероятно, что повреждающие эффекты гипергликемии у больных СД2 развиваются на фоне дислипидемии, которая обычно предшествует гипергликемии. Полученные нами ранее данные подтверждают это предположение [42]. Кроме хорошо известного окислительного стресса [8–10], эффекты HG, вероятно, включают гликирование и гликозилирование белков [55, 56]. Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования для выяснения молекулярных механизмов сосудистых повреждений при развитии СД2.

**Вклад авторов.** Концептуализация и методология — А.Ю. Хапчаев, А.В. Воротников, В.П. Ширинский; проведение исследований — А.Ю. Хапчаев, О.А. Антонова, М.В. Самсонов, О.А. Казакова, А.В. Воротников; обработка полученных результатов — А.Ю. Хапчаев, А.В. Воротников; написание манускрипта — А.Ю. Хапчаев, А.В. Воротников; руководство — А.Ю. Хапчаев, А.В. Воротников, В.П. Ширинский; получение финансирования — А.Ю. Хапчаев, В.П. Ширинский.

**Финансирование.** Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 19-15-00361) в части экспериментов по жизнеспособности HUVEC и долгосрочных экспериментов ECIS и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-015-00565) в проведении других экспериментах.

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

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



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G. (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications, *Diabetes Care*, **19**, 257-267, doi: 10.2337/diacare.19.3.257.
2. Goligorsky, M. S. (2017) Vascular endothelium in diabetes, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **312**, F266-F275, doi: 10.1152/ajprenal.00473.2016.
3. Bakker, W., Eringa, E. C., Sipkema, P., and van Hinsbergh, V. W. (2009) Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity, *Cell Tissue Res.*, **335**, 165-189, doi: 10.1007/s00441-008-0685-6.
4. Del Turco, S., Gaggini, M., Daniele, G., Basta, G., Folli, F., Sicari, R., and Gastaldelli, A. (2013) Insulin resistance and endothelial dysfunction: a mutual relationship in cardiometabolic risk, *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 2420-2431, doi: 10.2174/1381612811319130010.
5. Jansson, P. A. (2007) Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes, *J. Intern. Med.*, **262**, 173-183, doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01830.x.
6. Knapp, M., Tu, X., and Wu, R. (2019) Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy, *Acta Pharmacol. Sin.*, **40**, 1-8, doi: 10.1038/s41401-018-0042-6.
7. Varma, S., Lal, B. K., Zheng, R., Breslin, J. W., Saito, S., Pappas, P. J., Hobson, R. W., 2nd, and Durán, W. N. (2005) Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, H1744-H1751, doi: 10.1152/ajpheart.01088.2004.
8. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., and Grodsky, G. M. (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes, *Endocr. Rev.*, **23**, 599-622, doi: 10.1210/er.2001-0039.
9. Green, K., Brand, M. D., and Murphy, M. P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes, *Diabetes*, **53**, S110-S118, doi: 10.2337/diabetes.53.2007.s110.
10. Shah, M. S., Brownlee, M. (2016) Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes, *Circ. Res.*, **118**, 1808-1829, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306923.
11. Jiménez, N., Krouwer, V. J., and Post, J. A. (2013) A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium *in vitro*, *Cytotechnology*, **65**, 1-14, doi: 10.1007/s10616-012-9459-9.
12. Navone, S. E., Marfia, G., Invernici, G., Cristini, S., Nava, S., Balbi, S., Sangiorgi, S., Ciusani, E., Bosutti, A., Alessandri, G., Slevin, M., and Parati, E. A. (2013) Isolation and expansion of human and mouse brain microvascular endothelial cells, *Nat. Protoc.*, **8**, 1680-1693, doi: 10.1038/nprot.2013.107.
13. Hauser, S., Jung, F., and Pietzsch, J. (2017) Human endothelial cell models in biomaterial research, *Trends Biotechnol.*, **35**, 265-277, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007.
14. Medina-Leyte, D. J., Domínguez-Pérez, M., Mercado, I., Villarreal-Molina, M. T., and Jacobo-Albavera, L. (2020) Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: a review, *Appl. Sci.*, **10**, 938, doi: 10.3390/app10030938.
15. Vorotnikov, A. V., Khapchaev, A. Yu., Nickashin, A. V., and Shirinsky, V. P. (2022) *In vitro* modeling of diabetes impact on vascular endothelium: Are essentials engaged to tune metabolism? *Biomedicines*, **10**, 3181, doi: 10.3390/biomedicines10123181.
16. Van den Oever, I. A., Raterman, H. G., Nurmohamed, M. T., and Simsek, S. (2010) Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus, *Mediators Inflamm.*, **2010**, 792393, doi: 10.1155/2010/792393.
17. Gill, S. E., Rohan, M., and Mehta, S. (2015) Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury *in vivo*, *Respir. Res.*, **16**, 109, doi: 10.1186/s12931-015-0266-7.
18. Mallat, Z., and Tedgui, A. (2000) Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance, *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 947-962, doi: 10.1038/sj.bjp.0703407.
19. Winn, R. K., and Harlan, J. M. (2005) The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases, *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 1815-1824, doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01378.x.
20. Quagliaro, L., Piconi, L., Assaloni, R., Martinelli, L., Motz, E., and Ceriello, A. (2003) Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation, *Diabetes*, **52**, 2795-2804, doi: 10.2337/diabetes.52.11.2795.
21. Risso, A., Mercuri, F., Quagliaro, L., Damante, G., and Ceriello, A. (2001) Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **281**, E924-E930, doi: 10.1152/ajpendo.2001.281.5.E924.
22. Komarova, Y., and Malik, A. B. (2010) Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways, *Annu. Rev. Physiol.*, **72**, 463-493, doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135833.
23. Cahill, P. A., and Redmond, E. M. (2016) Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health, *Atherosclerosis*, **248**, 97-109, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
24. Di, A., Mehta, D., and Malik, A. B. (2016) ROS-activated calcium signaling mechanisms regulating endothelial barrier function, *Cell Calcium*, **60**, 163-171, doi: 10.1016/j.ceca.2016.02.002.
25. Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., and Nishigaki, I. (2013) The vascular endothelium and human diseases, *Int. J. Biol. Sci.*, **9**, 1057-1069, doi: 10.7150/ijbs.7502.

26. Goeckeler, Z. M., Bridgman, P. C., and Wysolmerski, R. B. (2008) Nonmuscle myosin II is responsible for maintaining endothelial cell basal tone and stress fiber integrity, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **295**, C994-C1006, doi: 10.1152/ajpcell.00318.2008.
27. Dalal, P. J., Muller, W. A., and Sullivan, D. P. (2020) Endothelial cell calcium signaling during barrier function and inflammation, *Am. J. Pathol.*, **190**, 535-542, doi: 10.1016/j.ajpath.2019.11.004.
28. Kugelmann, D., Rotkopf, L. T., Radeva, M. Y., Garcia-Ponce, A., Walter, E., and Waschke, J. (2018) Histamine causes endothelial barrier disruption via Ca<sup>2+</sup>-mediated RhoA activation and tension at adherens junctions, *Sci. Rep.*, **8**, 13229, doi: 10.1038/s41598-018-31408-3.
29. Van Nieuw Amerongen, G. P., Draijer, R., Vermeer, M. A., and van Hinsbergh, V. W. (1998) Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA, *Circ. Res.*, **83**, 1115-1123, doi: 10.1161/01.res.83.11.1115.
30. Khapchaev, A. Y., and Shirinsky, V. P. (2016) Myosin light chain kinase MYLK1: anatomy, interactions, functions, and regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1676-1697, doi: 10.1134/S000629791613006X.
31. Shimokawa, H., Sunamura, S., and Satoh, K. (2016) RhoA/Rho-kinase in the cardiovascular system, *Circ. Res.*, **118**, 352-366, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306532.
32. Kazakova, O. A., Khapchaev, A. Y., and Shirinsky, V. P. (2020) MLCK and ROCK mutualism in endothelial barrier dysfunction, *Biochimie*, **168**, 83-91, doi: 10.1016/j.biochi.2019.10.010.
33. Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F., and Hartshorne, D. J. (2004) Myosin phosphatase: structure, regulation and function, *Mol. Cell. Biochem.*, **259**, 197-209, doi: 10.1023/b:mcbi.0000021373.14288.00.
34. Kim, K. M., Csontos, C., Czikora, I., Fulton, D., Umapathy, N. S., Olah, G., and Verin, A. D. (2012) Molecular characterization of myosin phosphatase in endothelium, *J. Cell. Physiol.*, **227**, 1701-1708, doi: 10.1002/jcp.22894.
35. Beckers, C. M., Knezevic, N., Valent, E. T., Tauseef, M., Krishnan, R., Rajendran, K., Hardin, C. C., Aman, J., van Bezu, J., Sweetnam, P., van Hinsbergh, V. W., Mehta, D., and van Nieuw Amerongen, G. P. (2015) ROCK2 primes the endothelium for vascular hyperpermeability responses by raising baseline junctional tension, *Vascul. Pharmacol.*, **70**, 45-54, doi: 10.1016/j.vph.2015.03.017.
36. Birukova, A. A., Smurova, K., Birukov, K. G., Kaibuchi, K., Garcia, J. G., and Verin, A. D. (2004) Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction, *Microvasc. Res.*, **67**, 64-77, doi: 10.1016/j.mvr.2003.09.007.
37. Wainwright, M. S., Rossi, J., Schavocky, J., Crawford, S., Steinhorn, D., Velentza, A. V., Zasadzki, M., Shirinsky, V., Jia, Y., Haiech, J., Van Eldik, L. J., and Watterson, D. M. (2003) Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and *in vivo* inhibitor treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6233-6238, doi: 10.1073/pnas.1031595100.
38. Langouche, L., Vanhorebeek, I., Vlasselaers, D., Vander Perre, S., Wouters, P. J., Skogstrand, K., Hansen, T. K., and Van den Berghe, G. (2005) Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients, *J. Clin. Invest.*, **115**, 2277-2286, doi: 10.1172/JCI25385.
39. Nathan, D. M., Cleary, P. A., Backlund, J. Y., Genuth, S. M., Lachin, J. M., Orchard, T. J., Raskin, P., Zinman, B., and Diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications (DCCT/EDIC) study research group (2005) Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes, *N. Engl. J. Med.*, **353**, 2643-2653, doi: 10.1056/NEJMoa052187.
40. Gunduz, D., Thom, J., Hussain, I., Lopez, D., Hartel, F. V., Erdogan, A., Grebe, M., Sedding, D., Piper, H. M., Tillmanns, H., Noll, T., and Aslam, M. (2010) Insulin stabilizes microvascular endothelial barrier function via phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-mediated Rac1 activation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30**, 1237-1245, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.203901.
41. Samsonov, M. V., Podkuychenko, N. V., Lankin, V. Z., Vorotnikov, A. V., and Shirinsky, V. P. (2021) Malondialdehyde but not methylglyoxal impairs insulin signaling, NO production, and endothelial barrier, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series A Memb. Cell Biol.*, **15**, 195-200, doi: 10.1134/S1990747821030089.
42. Samsonov, M. V., Podkuychenko, N. V., Khapchaev, A. Y., Efremov, E. E., Yanushevskaya, E. V., Vlasik, T. N., Lankin, V. Z., Stafeyev, I. S., Skulachev, M. V., Shestakova, M. V., Vorotnikov, A. V., and Shirinsky, V. P. (2022) AICAR protects vascular endothelial cells from oxidative injury induced by the long-term palmitate excess, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 211, doi: 10.3390/ijms23010211.
43. Printseva, O., Peclo, M. M., and Gown, A. M. (1992) Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody 10F3, *Am. J. Pathol.*, **140**, 889-896.
44. Segawa, K., and Nagata, S. (2015) An apoptotic "eat me" signal: phosphatidylserine exposure, *Trends Cell Biol.*, **25**, 639-650, doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.003.
45. Bui, T. M., Wiesolek, H. L., and Sumagin, R. (2020) ICAM-1: a master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis, *J. Leukoc. Biol.*, **108**, 787-799, doi: 10.1002/JLB.2MR0220-549R.
46. Porter, A. G., and Janicke, R. U. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death Differ.*, **6**, 99-104, doi: 10.1038/sj.cdd.4400476.

47. Antonova, O. A., Loktionova, S. A., Romanov, Y. A., Shustova, O. N., Khachikyan, M. V., and Mazurov, A. V. (2009) Activation and damage of endothelial cells upon hypoxia/reoxygenation. Effect of extracellular pH, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 605-612, doi: 10.1134/s0006297909060030.
48. Kazakova, O. A., Khapchaev, A. Y., Ragimov, A. A., Salimov, E. L., and Shirinsky, V. P. (2019) Western blotting-based quantitative measurement of myosin II regulatory light chain phosphorylation in small amounts of non-muscle cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 11-19, doi: 10.1134/S0006297919010024.
49. Baumgartner-Parzer, S. M., Wagner, L., Pettermann, M., Grillari, J., Gessl, A., and Waldhausl, W. (1995) High-glucose – triggered apoptosis in cultured endothelial cells, *Diabetes*, **44**, 1323-1327, doi: 10.2337/diab.44.11.1323.
50. Fan, W., Han, D., Sun, Z., Ma, S., Gao, L., Chen, J., Li, X., Li, X., Fan, M., Li, C., Huc, D., Wang, Y., and Cao, F. (2017) Endothelial deletion of mTORC1 protects against hindlimb ischemia in diabetic mice via activation of autophagy, attenuation of oxidative stress and alleviation of inflammation, *Free Radic. Biol. Med.*, **108**, 725-740, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.001.
51. Ido, Y., Carling, D., and Ruderman, N. (2002) Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation, *Diabetes*, **51**, 159-167, doi: 10.2337/diabetes.51.1.159.
52. Sheu, M. L., Ho, F. M., Yang, R. S., Chao, K. F., Lin, W. W., Lin-Shiau, S. Y., and Liu, S. H. (2005) High glucose induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 539-545, doi: 10.1161/01.ATV.0000155462.24263.e4.
53. Pal, P. B., Sonowal, H., Shukla, K., Srivastava, S. K., and Ramana, K. V. (2019) Aldose reductase regulates hyperglycemia-induced HUVEC death via SIRT1/AMPK- $\alpha$ 1/mTOR pathway, *J. Mol. Endocrinol.*, **63**, 11-25, doi: 10.1530/JME-19-0080.
54. Kiss, A., Erdődi, F., and Lontay, B. (2019) Myosin phosphatase: unexpected functions of a long-known enzyme, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1866**, 2-15, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.023.
55. Federici, M., Menghini, R., Mauriello, A., Hribal, M. L., Ferrelli, F., Lauro, D., Sbraccia, P., Spagnoli, L. G., Sesti, G., and Lauro, R. (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells, *Circulation*, **106**, 466-472, doi: 10.1161/01.cir.0000023043.02648.51.
56. Lenin, R., Nagy, P. G., Jha, K. A., and Gangaraju, R. (2019) GRP78 translocation to the cell surface and O-GlcNAcylation of VE-Cadherin contribute to ER stress-mediated endothelial permeability, *Sci. Rep.*, **9**, 10783, doi: 10.1038/s41598-019-47246-w.

## LONG-TERM EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA DOES NOT IMPAIR MACROVASCULAR ENDOTHELIAL BARRIER INTEGRITY AND FUNCTION *in vitro*

A. Y. Khapchaev\*, O. A. Antonova, O. A. Kazakova, M. V. Samsonov,  
A. V. Vorotnikov, and V. P. Shirinsky

*Institute of Experimental Cardiology, E. I. Chazov National Medical Research Center for Cardiology,  
121552 Moscow, Russia; e-mail: AYKhapchaev@cardio.ru*

Hyperglycemia is a hallmark of type 2 diabetes implicated in vascular endothelial dysfunction and cardiovascular complications. Many *in vitro* studies identified endothelial apoptosis as an early outcome of experimentally modeled hyperglycemia emphasizing cell demise as a significant factor of vascular injury. However, endothelial apoptosis has not been observed *in vivo* until the late stages of type 2 diabetes. Here, we studied the long-term (up to 4 weeks) effects of high glucose (HG, 30 mM) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. HG did not alter HUVEC monolayer morphology, ROS levels, NO production, and exerted minor effects on the HUVEC apoptosis markers. The barrier responses to various clues were indistinguishable from those by cells cultured in physiological glucose (5 mM). Tackling the key regulators of cytoskeletal contractility and endothelial barrier revealed no differences in the histamine-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  responses, nor in phosphorylation of myosin regulatory light chain or myosin light chain phosphatase. Altogether, these findings suggest that vascular endothelial cells may well tolerate HG for relatively long exposures and warrant further studies to explore mechanisms involved in vascular damage in advanced type 2 diabetes.

**Keywords:** HUVEC, endothelial barrier, hyperglycemia, insulin, ROS, NO, myosin RLC, MYPT1

## РЕГУЛЯЦИЯ ДНК-ПРАЙМАЗЫ-ПОЛИМЕРАЗЫ PrimPol ЧЕЛОВЕКА

### Обзор

© 2023 Е.О. Болдинова<sup>1,2\*</sup>, А.В. Макарова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»,  
123182 Москва, Россия; электронная почта: lizaboldinova@yandex.ru

<sup>2</sup> Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.12.2022

После доработки 27.06.2023

Принята к публикации 28.06.2023

Передача генетической информации зависит от успешного завершения репликации ДНК. В геномной ДНК ежедневно образуются повреждения, которые создают препятствия для работы ДНК-полимераз и могут приводить к блокировке репликации, образованию разрывов ДНК, нарушению клеточного цикла и апоптозу. Кроме механизмов репарации ДНК, в клетке эволюционно сформировалось множество механизмов толерантности к повреждениям ДНК, одним из которых является реинициация синтеза ДНК на повреждённых участках лидирующей цепи с помощью ДНК-праймазы-полимеразы PrimPol. PrimPol человека была впервые описана в 2013 г. Свойства и функции PrimPol в последние годы активно исследуются, однако о регуляции работы PrimPol и связи нарушения функции фермента с заболеваниями известно очень мало. Настоящий обзор посвящён анализу механизмов регуляции PrimPol человека в контексте репликации ДНК. Подробно рассмотрено взаимодействие PrimPol с другими белками и предпринята попытка составления возможного пути регуляции активности PrimPol человека. В работе также затронут вопрос связи дисфункции PrimPol с заболеваниями человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** праймаза-полимераза PrimPol, реинициация синтеза ДНК, репликация, повреждения ДНК.

DOI: 10.31857/S0320972523080080, EDN: IJZUAF

### ВВЕДЕНИЕ

Праймаза-полимераза PrimPol относится к суперсемейству архей-эукариотических праймаз (АЭП), широко представленных у эукариот, архей и ряда вирусов [1]. PrimPol человека является уникальным ферментом, способным синтезировать ДНК *de novo*, то есть без использования праймера [2–4]. Основной функцией PrimPol в клетке считается участие в реинициации синтеза ДНК на повреждённых участках генома, когда из-за столкновения с повреждением происходит остановка репликативной ДНК-полимеразы (ДНКП) и задерж-

ка продвижения репликативной вилки [5–7]. PrimPol эффективно включает нуклеотиды на против ряда повреждений ДНК, являясь транслезионной (от англ. «translesion» – через повреждение) ДНКП [2, 4, 8–14]. PrimPol включается в работу во время репликации ДНК под действием генотоксического стресса и быстро накапливается на повреждённом участке хроматина [6, 7, 15, 16]. Было показано, что реинициация синтеза ДНК с помощью PrimPol важна для «прохождения» крупных бенз[а]пиреновых аддуктов [17], межцепочечных и внутрицепочечных сшивок ДНК [16, 18], G-квадруплексов [19]. Изучение свойств PrimPol

Принятые сокращения: ДНКП – ДНК-полимераза; оцДНК – одноцепочечная ДНК; ATR – Ataxia Telangiectasia and Rad3-related, серин/треониновая протеинкиназа; CHK1 – Checkpoint Kinase 1, чекпойнт-киназа 1; CMG – комплекс ДНК-хеликазы Cdc45–MCM–GINS; PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen, ядерный антиген пролиферирующих клеток; PolDIP2 – Polymerase δ-Interacting Protein 2, белок 2, взаимодействующий с полимеразой δ; RPA – Replication Protein A, репликативный белок А; USP36 – Ubiquitin-Specific-processing Protease 36; WRNIP1 – Werner helicase-Interacting Protein 1, белок 1, взаимодействующий с хеликазой Вернера.

\* Адресат для корреспонденции.



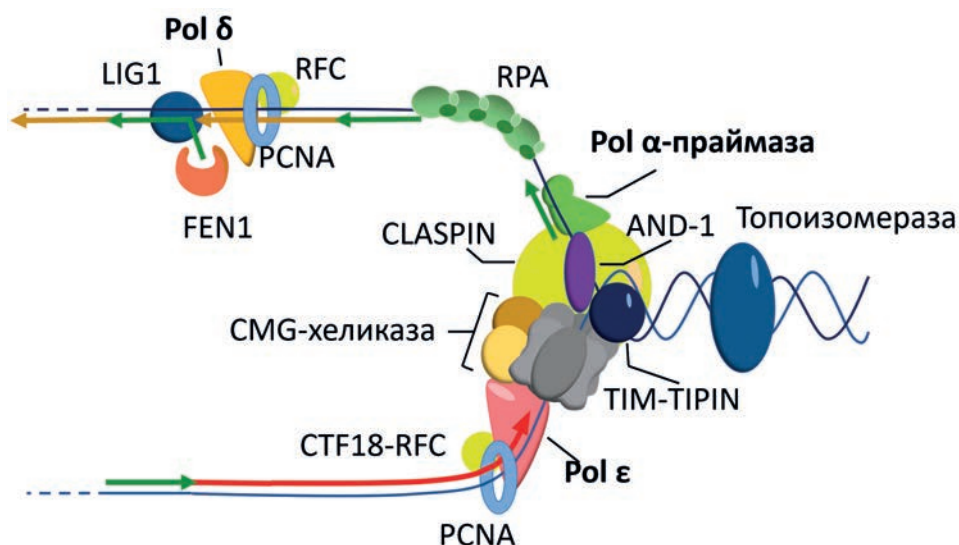
является актуальным, поскольку нарушение её функций связано с развитием офтальмологических заболеваний [20–22], усилением митохондриальной токсичности противовирусных препаратов [23] и повышением устойчивости клеток к препаратам химиотерапии [16, 24]. Кроме того, уникальные свойства PrimPol делают её интересным объектом для биотехнологического применения, например, для совершенствования секвенирования древней ДНК [25, 26]. В настоящем обзоре обсуждается регуляция активности PrimPol в контексте процесса репликации и генотоксического и репликативного стресса, что является дополнением более ранних обзоров, затрагивающих эту тему [27, 28]. В работе приведены сведения обо всех известных на данный момент взаимодействиях PrimPol человека с белками-партнёрами и предпринята попытка анализа путей регуляции работы PrimPol на основе имеющихся данных. В обзоре также рассмотрен возможный вклад нарушения функций PrimPol в развитие заболеваний человека.

## РЕПЛИКАЦИЯ ДНК И ОСНОВНЫЕ УЧАСТНИКИ РЕПЛИСОМЫ

Регуляция работы PrimPol происходит в контексте процесса репликации ДНК и основных механизмов контроля за целостностью генома. Репликация ДНК происходит в фазе синтеза (S-фаза) клеточного цикла с помощью мультибелкового комплекса – реплисома. У эукариот в реплисому входят основные репликативные белки, отвечающие за расплетание дуплекса ДНК, точное копирование

и сохранение целостности ДНК: топоизомераза I, комплекс ДНК-хеликазы Cdc45–MCM–GINS (CMG), комплекс Pol  $\alpha$ –праймаза, ДНКП Pol  $\epsilon$  и Pol  $\delta$ , ядерный антиген пролиферирующих клеток (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA), репликативный фактор C (Replication Factor C, RFC), репликативный белок A (Replication Protein A, RPA), вспомогательные белки AND-1 (Acidic Nucleoplasmic DNA-binding protein), CLASPIN, TIM–TIPIN (TIMELESS–TIMELESS Interacting Protein) и многие другие [29–35] (рис. 1).

Все фазы репликации в клетке строго регулируются для того, чтобы обеспечить полное и точное копирование генома один раз за клеточный цикл. Сборке активной реплисома предшествует распознавание точек начала репликации в фазе G1 клеточного цикла комплексом ORC (Origin Recognition Complex) [36], который затем вместе с белками-загрузчиками служит платформой для связывания репликативной хеликазы MCM (MiniChromosome Maintenance) [37]. Вначале хеликаза MCM образует неактивный двойной комплекс вокруг обеих цепей ДНК – так называемый пререпликативный комплекс, остающийся неактивным до конца фазы G1. Активация хеликазы происходит при вступлении клетки в S-фазу за счёт взаимодействия MCM с белками комплекса GINS (сокращение от *go-ichi-ni-san* – названий субъединиц белков Sld5, Psf1, Psf2, Psf3) и Cdc45 (Cell Division Cycle 45) с образованием активных комплексов CMG (Cdc45–MCM2–7–GINS) – хеликаз [38], располагающихся на комплементарных цепях ДНК [39]. Активированные CMG-хеликазы начинают двигаться вдоль лидирующих цепей ДНК



**Рис. 1.** Основные белки реплисома эукариот. Матричная ДНК обозначена голубыми и тёмно-синими линиями, РНК-ДНК-праймеры – зелёными линиями, вновь синтезированная ДНК – красными и жёлтыми линиями

в противоположных направлениях от точки начала репликации, оставляя участки одноцепочечной ДНК (оцДНК), на которых происходит сборка оставшихся компонентов реплисомы. С оцДНК связывается белок RPA — гетеротример, состоящий из трёх субъединиц, RPA70, RPA32 и RPA14, несущих ДНК-связывающие ОВ-домены (oligosaccharide/oligonucleotide binding domain) [40, 41]. ОВ-Домены субъединиц RPA обладают разным сродством к ДНК и, в зависимости от длины доступной к связыванию оцДНК, могут образовывать комплексы с разной конформацией, динамично переходящие один в другой. Наиболее компактный комплекс RPA с оцДНК, имеющий «глобулярную» конформацию, связывает ДНК длиной 8–10 нуклеотидов, при этом в связывании участвует только субъединица RPA70. На более протяжённых участках оцДНК RPA образует более «растянутый» комплекс, экранирующий участок ДНК длиной 30 нуклеотидов, а в связывании принимают участие ОВ-домены RPA70 и RPA32. Субъединица RPA14 непосредственно в связывании ДНК не участвует, однако она необходима для поддержания «полярности» расположения субъединиц RPA на ДНК (подробный обзор механизмов связывания SSB-белков с ДНК в работе Pestryakov et al. [42]). Молекулы RPA защищают оцДНК от действия эндонуклеаз и предотвращают гибридизацию цепей ДНК и формирование нежелательных вторичных структур. Также RPA образует контакты с белками, участвующими в репликации, репарации и ответе клеток на повреждение ДНК (обзоры Bhat et al. и Zou et al. [43, 44]).

Непосредственно копирование генома в реплисоте выполняют высокоточные репликативные ДНКП Pol  $\delta$  и Pol  $\epsilon$ , относящиеся к В-семейству. Pol  $\epsilon$  и Pol  $\delta$  осуществляют основной синтез ДНК. Эти ферменты обладают высокой процессивностью, точностью и корректирующей 3'→5'-экзонуклеазной активностью, но неспособны эффективно самостоятельно инициировать синтез ДНК [45]. Репликация ДНК начинается с синтеза коротких РНК-ДНК-праймеров четырёхсубъединичным комплексом Pol  $\alpha$ -праймазы. Праймаза синтезирует короткий (9 нуклеотидов) РНК-праймер, а затем субстрат передаётся ДНКП Pol  $\alpha$ , которая удлиняет его до 35 нуклеотидов [46]. Образовавшийся РНК-ДНК-гибрид может быть далее использован репликативными ДНКП. Поскольку все ДНКП осуществляют синтез ДНК с присоединением нуклеотидов к 3'-концу праймера, то на одной цепи синтез идёт непрерывно (лидирующая цепь), а на

другой (отстающая цепь) по мере расплетания ДНК происходит синтез новых праймеров Pol  $\alpha$ -праймазой и их удлинение Pol  $\delta$  с образованием фрагментов Оказаки. На лидирующей цепи синтез ДНК осуществляет Pol  $\epsilon$ , образуя тесные контакты с CMG-хеликазой. Два белка двигаются по ДНК координированно [47]. Pol  $\delta$  в основном синтезирует ДНК на отстающей цепи, однако может участвовать и в удвоении лидирующей цепи (до 20% синтеза лидирующей цепи), в том числе в условиях репликативного стресса [48–51].

Прерывистый характер синтеза ДНК на отстающей цепи создаёт необходимость соединения фрагментов Оказаки в единую цепь и удаления РНК-праймеров (обзор Sun et al. [52]). ДНКП Pol  $\delta$  в процессе удлинения праймера, созданного Pol  $\alpha$ -праймазой, встречает предыдущий фрагмент Оказаки и благодаря активности по вытеснению цепи некоторое время продолжает синтез ДНК, вытесняя из дуплекса 5'-РНК-участок фрагмента Оказаки. В результате образуется выступающий «лоскут», флэп-фрагмент РНК-ДНК (обзор Stodola et al. [53]), который удаляется флэп-эндонуклеазой FEN1 (Flap structure-specific EndoNuclease 1) [54, 55]. Затем два фрагмента ДНК соединяются ДНК-лигазой LIG 1 [56, 57].

Значительную роль в регуляции связывания ДНК и активности ДНКП в процессе репликации играет белок-«зажим» PCNA (обзор Gonzalez-Magana et al. [58]). PCNA — гомотримерный белок, образующий кольцо вокруг ДНК с помощью белков-«загрузчиков» RFC и STF18–RFC [59, 60]. PCNA стимулирует процессивный синтез Pol  $\epsilon$  и Pol  $\delta$  [60, 61], а также играет роль каркаса, на котором собираются белки, участвующие в созревании фрагментов Оказаки [57, 62, 63]. Различные посттрансляционные модификации PCNA запускают механизмы толерантности клеток к повреждениям ДНК в условиях генотоксического стресса (обзор Gonzalez-Magana et al. [58]).

В репликации ДНК участвует множество вспомогательных белковых факторов, регулирующих скорость движения репликативной вилки и работу отдельных компонентов реплисомы. Среди них важное значение имеют белки AND-1, CLASPIN и комплекс TIMELESS–TIPIN [60]. Все три белка тесно взаимодействуют с CMG-хеликазой, образуя комплекс продвижения реплисомы (replisome progression complex, RPC) [29, 30]. Самый важный из них, CLASPIN, является интегральным компонентом RPC-комплекса, и его удаление приводит к значительному замедлению репликативной вилки, однако точный механизм

его действия ещё неизвестен [60, 64]. Кроме того, CLASPIN нужен для привлечения к реплисому регуляторных протеинкиназ, участвующих в инициации репликации и ответе клетки на повреждение ДНК [65].

### РЕГУЛЯЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ В УСЛОВИЯХ РЕПЛИКАТИВНОГО СТРЕССА

Регуляция клеточного цикла происходит под контролем циклин-зависимых киназ (CDK, cyclin-dependent kinases), белков-активаторов CDK — циклинов, и ингибиторов CDK. Эти сериновые/треониновые протеинкиназы фосфорилируют ключевые белки, стимулирующие переход к репликации и митозу при условии того, что клетка успешно прошла точки контроля — «чекпойнты» на границах фаз. Подробное рассмотрение клеточного цикла и его регуляции CDK-киназами представлено в обзорах Bertoli et al., Hume et al. и Malumbres et al. [66–68]. Одна из задач клетки при прохождении чекпойнта — убедиться в целостности генома. Различные повреждения ДНК активируют общие сигнальные пути, цель которых — удержать CDK-киназы в неактивном состоянии до тех пор, пока повреждение не будет устранено [69]. В ответ на повреждение ДНК может происходить задержка перехода к S-фазе (G1/S-чекпойнт), замедление процесса репликации (чекпойнты S-фазы) и запрет перехода к митозу (G2/M-чекпойнт). Чекпойнт-индуцированные сигнальные пути можно разделить на механизмы, зависящие от киназы CHK1 (CHeckpoint Kinase 1), и механизмы, находящиеся под контролем транскрипционного фактора p53. Оба типа сигнальных путей имеют некоторые общие этапы и участников, но действуют в разные периоды клеточного цикла: p53-зависимые пути работают преимущественно в G1-фазе цикла, а CHK1-киназа наиболее активна в S- и G2-фазах. С подробным разбором сигнальных путей, индуцированных повреждениями ДНК, можно ознакомиться в обзорах Williams et al., Barnum et al. и Patil et al. [70–72].

Повреждения ДНК, с которыми реплисома сталкивается в процессе репликации, зачастую вызывают остановку репликативных ДНКП и их рассинхронизацию с CMG-хеликазой, которая продолжает движение по ДНК [73–75]. Образующиеся в результате рассинхронизации реплисома длинные участки оцДНК, с которыми связан белок RPA, служат сигналом повреждения ДНК, который воспринимается молекулами-сенсорами [76]. Одними из основ-

ных сенсорных белков, регулирующих клеточный ответ на генотоксический стресс, являются протеинкиназы ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related), ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) и DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) [77]. В данном обзоре мы сосредоточим своё внимание на ATR, поскольку далее она будет фигурировать в регуляции PrimPol. В физиологических условиях ATR находится в неактивном состоянии. Активация и привлечение ATR к ДНК происходят за счёт взаимодействия с RPA, белками-активаторами ATRIP (ATR-Interacting Protein), TOPBP1 (TOPoisomerase II Binding Protein), ETAA1 (Ewing Tumour-Associated Antigen 1) и белками-медиаторами (CLASPIN), которые, в свою очередь, привлекаются к ДНК комплексом 9-1-1 (RAD9–HUS1–RAD1) — альтернативным белком-«зажимом» (см. обзор Saldivar et al. [78]). Система регуляции ATR реагирует на различные типы генотоксического стресса, включая повреждения ДНК, вызванные УФ-излучением, алкилирующими агентами, веществами, образующими сшивки ДНК, и блоки репликации, вызванные ингибиторами ДНКП и топоизомераз, а также снижением концентрации dNTP [79].

В зависимости от типа повреждения ДНК ATR фосфорилирует различные белки, что, в свою очередь, приводит к инициации разных путей толерантности к повреждениям ДНК: к аресту репликации (фосфорилирование CHK1-киназы), стимулированию или ингибированию реверсии репликативной вилки (фосфорилирование SMARCA1 (SWI/SNF-related, Matrix associated, Actin-dependent Regulator of Chromatin, subfamily A-like 1)), запуску гомологичной рекомбинации (фосфорилирование RPA, PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2), XRCC3 (X-ray repair cross complementing group 3)) или активации транслезионного синтеза (фосфорилирование REV1 и транслезионных ДНКП) [78]. Все перечисленные выше механизмы достаточно хорошо описаны [80–83]. Обнаружение PrimPol позволило выделить ещё один механизм толерантности к повреждениям ДНК — реинициацию репликации за счёт синтеза ДНК-праймеров *de novo* после остановки реплисома. Однако о регуляции данного механизма ещё почти ничего не известно.

### БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РОЛЬ PrimPol В КЛЕТКЕ

В 2005 г. L.M. Iyer et al. в ходе биоинформатического анализа обнаружили у человека новый белок, относящийся к суперсемейству



археозукариотических праймаз, первоначально названный Eukprim2 [1]. В 2013 г. появились первые результаты исследования нового белка, показавшие, что фермент является одновременно ДНК-праймазой и ДНКП, что дало основания переименовать фермент в PrimPol (Primase/Polymerase) [2–4].

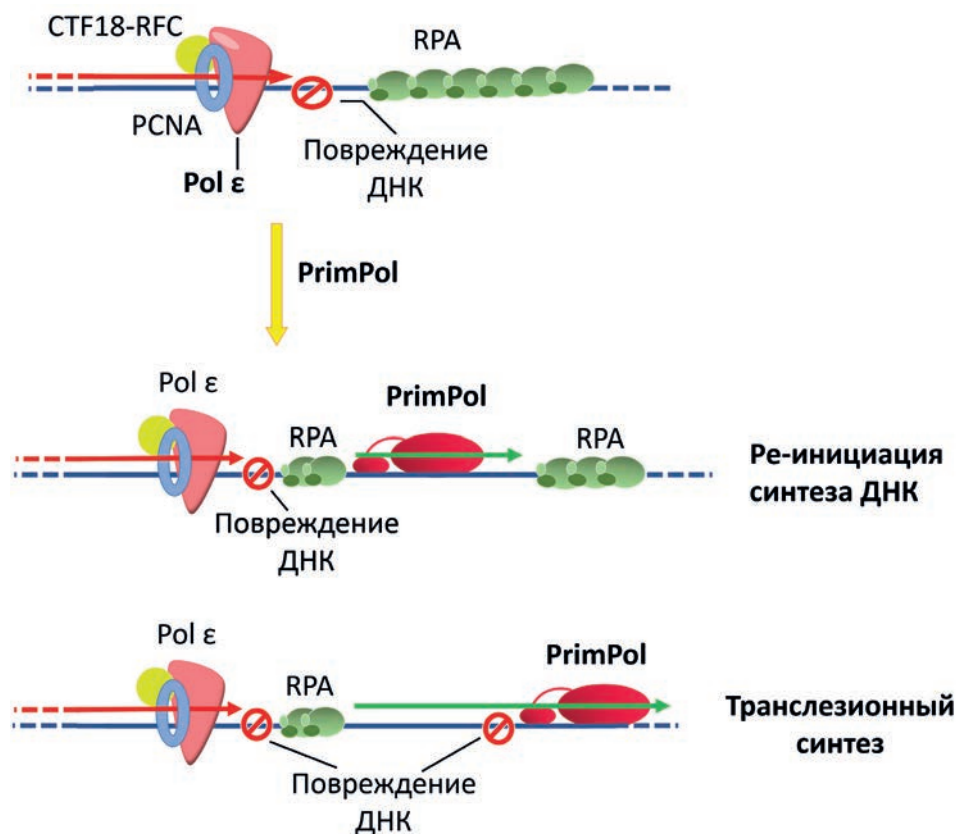
Праймаза-полимераза PrimPol человека кодируется геном *PRIMPOL*, расположенным на 4 хромосоме в локусе 4q35.1 [1]. PrimPol представляет собой белок с молекулярной массой 65 кДа, состоящий из 560 аминокислотных остатков [3]. N-Концевой каталитический домен содержит консервативные аминокислотные мотивы I, II и III, несущие остатки, необходимые для ДНК-полимеразной и ДНК-праймазной активностей [1, 2, 4, 9, 84, 85]. C-Концевой домен PrimPol содержит консервативный мотив цинкового пальца (ZnF) C-H-C-C (Cys419, His426, Cys446, Cys451), аналогичный праймазному домену UL52 вирусов герпеса и координирующий ионы  $Zn^{2+}$  [2, 4, 9, 86]. В C-концевом домене располагается также участок связывания с RPA (RPA-binding domain, RBD) [3, 15].

В клетках человека PrimPol распределена между цитозолем (47%), ядром (19%) и матриксом митохондрий (34%) [2]. Пик экспрессии мРНК PrimPol приходится на фазы G1–S

клеточного цикла, но количество белка в разных фазах цикла остаётся постоянным [86].

PrimPol обладает праймазной активностью, которая стимулируется ионами  $Mn^{2+}$ . В отличие от эукариотических праймаз, PrimPol человека синтезирует *de novo* как РНК, так и ДНК-праймеры. При этом эффективность синтеза ДНК-праймеров *in vitro* значительно выше, чем эффективность синтеза РНК-праймеров [4–6]. Тем не менее в качестве инициаторного нуклеотида при синтезе нуклеиновых кислот *de novo* PrimPol преимущественно использует рибонуклеотид трифосфат – АТФ. Эффективность образования динуклеотида с АТФ в 2 раза выше, чем с dATP [87]. PrimPol обладает способностью к дискриминации NTP, включая рибонуклеотиды в 11–150 раз менее эффективно, чем дезоксирибонуклеотиды [24, 88]. Однако, учитывая, что в клетке концентрация NTP существенно превышает концентрацию dNTP [89, 90], можно предположить, что *in vivo* при синтезе ДНК-праймеров PrimPol включает NTP чаще. Механизм праймазной активности PrimPol обсуждается в обзоре Blanco et al. [91].

Основной функцией PrimPol считается реинициация синтеза ДНК и возобновление движения репликативной вилки в случае остановки



**Рис. 2.** Функции PrimPol в репликации повреждённой ДНК. Матричная ДНК обозначена тёмно-синей линией, праймеры – зелёной линией, основной синтез ДНК – красной линией, повреждение ДНК – красный перечёркнутый круг



реплисомы на повреждённом участке ДНК или на участке, содержащем вторичные структуры [5, 17–19, 92] (рис. 2). ДНК-праймеры, которые синтезирует PrimPol на повреждённых участках ДНК, не требуют удаления и могут быть использованы репликативными ДНКП для продолжения синтеза [2–4]. Кроме того, PrimPol эффективно включает нуклеотиды напротив ряда распространённых повреждений ДНК, таких как 8-оксогуанин (8-охо-G) [2, 4, 8, 10, 11], *O*<sup>6</sup>-метилгуанин (*O*<sup>6</sup>-me-G), 5-формилурацил (5-foU) [8], *N*<sup>2</sup>-этилгуанин (*N*<sup>2</sup>-Et-G) [14] и внутрицепочечная цисплатиновая сшивка [13] (рис. 2). Также PrimPol способна проходить апуриновые/апириимидиновые сайты (АП-сайты) и (6-4)-тиминовые димеры посредством механизма «проскакивания» повреждений ДНК [2, 8, 12, 86]. Помимо ДНК-праймазной и ДНК-полимеразной активностей, у PrimPol были описаны терминальная трансферазная [9, 12] и обратная транскриптазная активности [26], а также способность к вытеснению цепи ДНК [93].

Исследования на культуре клеток человека показали, что PrimPol играет важную роль в поддержании стабильности генома. Подавление экспрессии гена *PRIMPOL* в условиях отсутствия генотоксического стресса приводит к снижению скорости пролиферации клеток по сравнению с диким типом [7, 86], снижению количества и скорости движения репликативных вилок [3, 4, 7, 9], нарушению клеточного цикла [4–7], нарушениям репликации митохондриальной ДНК [2, 12], накоплению хромосомных aberrаций и образованию микроядер [4, 7, 86].

Подавление функции PrimPol приводит к ещё более серьёзным последствиям в клетках, подвергшихся действию ДНК-повреждающих агентов. Клетки человека, нокаутные по гену *PRIMPOL*, проявляют повышенную чувствительность и геномную нестабильность по сравнению с клетками дикого типа при действии ДНК-повреждающих агентов: УФ-излучения [4–7, 86, 94], гидроксимочевина [3, 24, 86], цисплатина [5, 7, 16], метилметансульфоната [5], бензопирена [17]. Однако дисфункция PrimPol не является летальной у мышей [2], что объясняется компенсацией нарушения функции PrimPol другими механизмами толерантности к повреждениям ДНК и репарации.

#### ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ PrimPol

PrimPol накапливается в ядре в повреждённых участках ДНК и местах остановки репли-

кативной вилки *in vivo* [3, 4, 86]. Активность PrimPol и её доступ к ДНК должны строго регулироваться, чтобы вовремя обеспечить реплисому новыми праймерами при остановке репликации, но не допустить излишнего синтеза праймеров и образования одноцепочечных брешей в ДНК.

Регуляция активности PrimPol, как и других белков, участвующих в ответе клетки на повреждение ДНК, происходит с помощью фосфорилирования сериновой/треониновой протеинкиназой CHK1. CHK1 напрямую фосфорилирует остаток Ser255 PrimPol *in vitro* и в культуре клеток человека, стимулируя синтез праймеров PrimPol. Остаток Ser255 располагается в неструктурированной петле PrimPol, которая в отсутствие фосфорилирования ингибирует праймазную активность PrimPol. Фосфорилирование CHK1 происходит независимо от того, какой тип репликативного стресса испытывает клетка [95].

За негативную регуляцию PrimPol отвечает другая протеинкиназа — PLK1 (Polo-like kinase 1), которая фосфорилирует консервативный остаток PrimPol Ser538, располагающийся в С-концевой области между двумя мотивами связывания белка RPA. Предполагается, что фосфорилирование Ser538 приводит к снижению эффективности взаимодействия PrimPol с RPA; однако напрямую этого показано не было, и механизм ингибирования ещё неизвестен. Фосфорилирование протеинкиназой PLK1 происходит в конце S-фазы, что приводит к снижению эффективности привлечения PrimPol к ДНК после S-фазы. В условиях репликативного стресса наблюдается запаздывание или полное отсутствие PLK1-зависимого фосфорилирования PrimPol, что позволяет сохранить PrimPol в активном состоянии и даёт клетке время на устранение блоков репликации [96].

Убиквитинирование и деубиквитинирование белков регулирует процесс их деградации протеасомой, что позволяет регулировать количество молекул белка в клетке [97]. Одним из белков, предположительно контролирующего количество PrimPol, является деубиквитиназа USP36 (Ubiquitin-Specific-processing Protease 36), которая специфично удаляет полиубиквитиновые метки с PrimPol в позиции Lys29. PrimPol и USP36 колокализуются в области репликативных вилок в ответ на обработку клеток гидроксимочевинной. Взаимодействие PrimPol с USP36 также показано с помощью иммунопреципитации. Сверхэкспрессия USP36 в клетках приводит к повышению стабильности и количества молекул PrimPol, а подавление

экспрессии USP36 — к сокращению времени жизни PrimPol в клетке [98]. Предполагается, что при возникновении блока репликации происходит активация USP36 и привлечение PrimPol и USP36 к повреждённому участку ДНК. Деубиквитинирование стимулирует активность PrimPol и позволяет ей включиться в работу по восстановлению движения репликативной вилки [98].

Другой белок — белок 1, взаимодействующий с хеликазой Вернера (Werner helicase-Interacting Protein 1, WRNIP1) — вероятно, принимает участие в обратном процессе — деградации PrimPol с помощью протеасомы. WRNIP1 — это многофункциональный репликативный фактор, взаимодействующий с PCNA, RAD18 и Pol  $\delta$ , и, предположительно, играющий роль в переключении ДНКП в процессе транслезионного синтеза [99]. В структуре WRNIP1 присутствует убиквитин-связывающий домен цинкового пальца (ubiquitin-binding zinc-finger domain, UBZ), позволяющий взаимодействовать с убиквитинированным PCNA и, вероятно, PrimPol. Показано, что при сверхэкспрессии гена *WRNIP1* в культуре клеток человека HEK293 усиливается протеасомная деградация PrimPol, которая подавляется ингибиторами протеасомы. В клетках, нокаутных по гену *WRNIP1*, количество молекул PrimPol, наоборот, повышается. Оба белка колокализируются в области репликативных вилок, а их взаимодействие подтверждается экспериментами по коиммунопреципитации [99]. Предполагается, что взаимодействие убиквитинированной PrimPol с WRNIP1 повышает доступность фермента для протеасомы.

### РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ PrimPol БЕЛКАМИ-ПАРТНЁРАМИ

В регуляции активности ДНКП в клетке, в том числе доступе ДНКП к репликативной вилке, принимают участие многие регуляторные белковые факторы. Основным белком-партнёром, регулирующим работу ДНКП при репликации и транслезионном синтезе, является PCNA. Столкновение репликативной вилки с повреждением ДНК инициирует реакцию моноубиквитинирования PCNA, которая стимулирует процесс переключения ДНКП и сборку транслесомы. Однако PrimPol не взаимодействует напрямую с PCNA, что говорит об отличии механизма регуляции работы PrimPol от такового для ДНКП [100].

Ключевую роль в регуляции PrimPol играют белки, связывающиеся с оцДНК: ядерный

белок RPA и митохондриальный белок SSB (mtSSB, mitochondrial single strand binding protein). При столкновении репликативной вилки с повреждением происходит диссоциация комплекса ДНКП с хеликазой с образованием протяжённого участка оцДНК, покрытого RPA [73–75].

Методом масс-спектрометрии было показано, что PrimPol совыделяется из клеток человека вместе с RPA и mtSSB [3]. Взаимодействие PrimPol с RPA было продемонстрировано и в экспериментах по коиммунопреципитации [3, 15]. PrimPol взаимодействует с субъединицей RPA70 [15]. RPA играет важную роль в привлечении PrimPol к сайтам повреждений геномной ДНК после облучения клеток УФ-светом. Делеция С-концевого участка PrimPol, содержащего мотивы RBM-A и RBM-B (RPA Binding Motif), отвечающие за связывание RPA, препятствует миграции PrimPol к повреждениям ДНК *in vivo* и повышает чувствительность к ДНК-повреждающим агентам [3, 15]. Кроме того, RPA стимулирует ДНК-полимеразную, ДНК-праймазную активности PrimPol и активность по вытеснению цепи *in vitro* [15, 93, 101]. Также RPA стимулирует транслезионную активность PrimPol напротив повреждений ДНК, таких как, например,  $N^2$ -Et-G [14].

Стимуляция PrimPol наблюдается только при низких концентрациях RPA (не насыщающих ДНК-матрицу или эквимоларных ей) на коротких (50–55 нуклеотидов) и длинных (оцДНК фага M13) ДНК-субстратах [14, 93, 101], а избыток RPA над ДНК-матрицей ингибирует активность PrimPol на всех типах ДНК-субстратов [10, 15, 100, 101]. Вероятно, при высокой концентрации RPA полностью экранирует ДНК, лишая PrimPol места посадки. Интересно отметить, что при молярном избытке по отношению к ДНК RPA образует преимущественно «короткие» комплексы с ДНК, связывающие участки длиной 8–10 нуклеотидов при участии только высокоаффинной субъединицы RPA70. Меньшая концентрация RPA и большая длина ДНК-субстрата позволяет RPA образовать «вытянутый» комплекс на участке ДНК длиной 30 нуклеотидов при участии RPA70 и RPA32 [42], что, возможно, благоприятствует образованию контактов с PrimPol.

Было показано, что делеция отрицательно заряженного С-концевого RBM нарушает стимуляцию активности PrimPol белком RPA, но это в значительной степени стимулирует ДНК-полимеразную активность и связывание PrimPol с ДНК в отсутствие RPA [102]. Полученные результаты позволили предположить,

что фермент PrimPol сам по себе находится в «выключенном» состоянии и становится полностью функциональным при взаимодействии с RPA. Возможный механизм активации PrimPol с помощью RPA предположительно включает повышение сродства PrimPol к ДНК за счёт структурной перестройки C-концевого домена. В частности, RPA может препятствовать блокировке взаимодействия PrimPol с матричной ДНК или 5'-концевым трифосфатом, опосредованной C-концевым доменом. Нейтрализация отрицательного заряда RBM при взаимодействии с RPA также может вносить вклад в повышение сродства PrimPol к ДНК.

Наряду с SSB-белками в качестве белка-партнёра PrimPol был определён белок PolDIP2 (Polymerase  $\delta$ -Interacting Protein 2). PolDIP2 — это многофункциональный белок, участвующий во множестве клеточных процессов, в том числе организации веретена деления и сегрегации хромосом, процессинге премРНК, клеточной миграции и адгезии, а также регуляции активности ДНКП (подробно изложено в обзоре Gagarinskaya et al. [103]). PolDIP2 стимулирует активность Pol  $\delta$  *in vitro*, а также увеличивает процессивность и точность транслезионного синтеза Pol  $\lambda$  и Pol  $\eta$  [104, 105].

Взаимодействие PrimPol и PolDIP2 было подтверждено методом масс-спектрометрии и образованием «сшивок» между белками [106]. Показано, что PolDIP2 связывается с каталитическим доменом PrimPol в области субдомена ModN и в области неструктуриро-

ванной петли между субдоменами ModN и ModC [107]. Взаимодействие с PolDIP2 повышает сродство PrimPol к ДНК и dNTP, а также стабилизирует связывание PrimPol с 3'-концом праймера [106, 107]. В результате этого повышается процессивность и эффективность синтеза ДНК PrimPol [14, 93, 106, 107]. Взаимодействие PrimPol с PolDIP2 повышает эффективность и точность включения нуклеотидов PrimPol напротив 8-охо-G [106] и стимулирует включение нуклеотидов PrimPol напротив внутрицепочечной цисплатиновой сшивки [13] и повреждения  $N^2$ -Et-G [14]. Похожий эффект наблюдается у Pol  $\lambda$  и Pol  $\eta$  в присутствии PCNA, RPA и PolDIP2 [104]. Однако PolDIP2 не оказывает влияния на транслезионную активность PrimPol на ДНК с циклобутановыми пиримидиновыми димерами (ЦПД), АП-сайтами и объёмными  $N^2$ -аддуктами гуанина [14, 106].

Важно отметить, что подавление экспрессии гена *POLDIP2* в культуре клеток приводит к снижению скорости репликации после облучения клеток УФ-светом в той же степени, что и в клетках, нокаутных по гену *PRIMPOL*, а одновременное подавление экспрессии *PRIMPOL* и *POLDIP2* не приводит к большему снижению скорости репликации, что свидетельствует об участии PrimPol и PolDIP2 в одном пути ответа на повреждения ДНК [106]. PolDIP2, вероятно, участвует в регуляции механизмов толерантности к повреждениям ДНК, настраивая баланс между процессами транслезионного синтеза

Установленные взаимодействия PrimPol с белками-партнёрами

| Белок-партнёр | Влияние на PrimPol                                                                                                                                           | Ссылки             |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| CHK1-киназа   | фосфорилирует Ser255 PrimPol, стимулирует праймазную активность                                                                                              | [95]               |
| PLK1-киназа   | фосфорилирует Ser538 PrimPol, подавляет привлечение PrimPol к ДНК                                                                                            | [96]               |
| ATR-киназа    | повышает экспрессию <i>PRIMPOL</i> на транскрипционном уровне, стимулирует CHK1-киназу                                                                       | [16, 95]           |
| USP36         | снимает убиквитиновые метки с PrimPol, повышает количество стабильных молекул PrimPol в клетке                                                               | [98]               |
| WRNIP1        | стимулирует протеасомную деградацию PrimPol                                                                                                                  | [99]               |
| RPA           | стимулирует ДНК-праймазную, ДНК-полимеразную активности PrimPol и активность по вытеснению цепи, способствует привлечению PrimPol к участкам повреждения ДНК | [15, 93, 100, 101] |
| PolDIP2       | повышает сродство PrimPol к ДНК и нуклеотидным субстратам, стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol и активность по вытеснению цепи                   | [94, 106, 107]     |
| TWINKLE       | стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol на повреждённых и неповреждённых ДНК-матрицах                                                                | [10]               |



и переключения матриц, но точная роль PolDIP2 в этом механизме не определена [108].

В митохондриях в регуляции активности PrimPol может участвовать ДНК-хеликаза TWINKLE (продукт гена *TWINK*). Показано, что TWINKLE стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol на повреждённых и неповреждённых ДНК-матрицах [10].

Было показано, что PrimPol может участвовать в прохождении «сшивок» между цепями ДНК [18] и, по-видимому, образует контакты с белками, участвующими в распознавании и репарации этих «сшивок». Методом иммунопреципитации и масс-спектрометрии были идентифицированы белки, потенциально взаимодействующие с PrimPol: белок HERC2 (HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2), участвующий в разрешении G-квадруплексов; белки MHF1 (входящий в состав FANCM-комплекса) и RUNX1 (Runt-related transcription factor 1), а также белки BLM (Bloom syndrome protein), RMI1 (RecQ-Mediated genome Instability protein) и RMI2 (входящие в состав BTR-комплекса (BLM — топоизомераза IIIα — RMI)), вовлечённые в репарацию межцепочечных ДНК-сшивок [18]. Тем не менее механизмы и роль данных взаимодействий ещё не исследованы.

Данные по регуляции активности PrimPol основными белками суммированы в таблице.

#### РЕГУЛЯЦИЯ МЕХАНИЗМА РЕИНИЦИАЦИИ СИНТЕЗА ДНК PrimPol

Множество данных о белок-белковых взаимодействиях и посттрансляционных модификациях PrimPol пока представляет собой разрозненную мозаику, которую ещё только предстоит собрать в общую картину регуляции реинициации синтеза ДНК (рис. 3). Предполагается, что PrimPol реализует механизм реинициации синтеза ДНК на лидирующей цепи, где столкновение реплисома с повреждением ДНК может приводить к остановке Pol  $\epsilon$  и рассинхронизации реплисома. Участие PrimPol в реинициации ДНК на лидирующей цепи подтверждено экспериментально [19, 95]. На отстающей цепи остановка репликативной ДНКП Pol  $\delta$  не играет критической роли, поскольку комплекс Pol  $\alpha$ –праймаза регулярно синтезирует новые праймеры, которые легко могут быть использованы для преодоления повреждённого участка ДНК. Вероятно, конкуренции между PrimPol и комплексом Pol  $\alpha$ –праймаза при реинициации синтеза на разных цепях не возникает: PrimPol демонстрирует

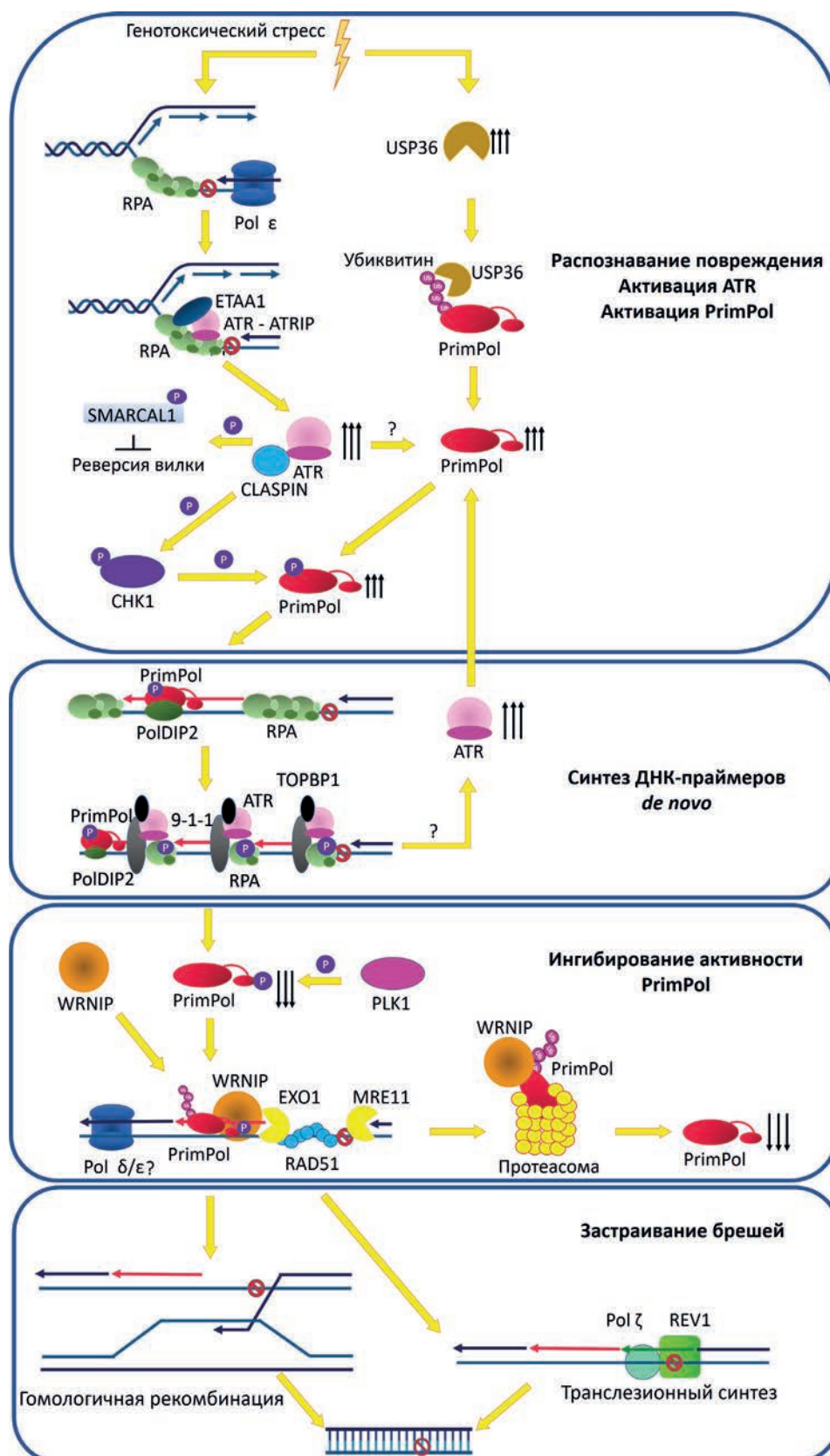
высокоэффективную праймазную активность на лидирующей, но не на отстающей цепи [95], а активность комплекса Pol  $\alpha$ –праймаза на лидирующей цепи значительно снижена по сравнению с отстающей цепью [109].

В настоящий момент достоверно неизвестно, с помощью какого сигнального пути происходит регуляция активности PrimPol и распознавание повреждённого участка ДНК. Фосфорилирование PrimPol чекпойнт-протеинкиназой CHK1 [95] позволяет предположить, что механизм реинициации синтеза ДНК PrimPol входит в каскад механизмов, регулируемых сигнальной ATR-киназой и эффекторной CHK1-киназой. Привлечение PrimPol к повреждённой ДНК [15, 100] и активация ATR [110] происходят за счёт взаимодействия с белком RPA, связывающимся с протяжённым участком оцДНК. Было показано, что ATR влияет на экспрессию *PRIMPOL* на транскрипционном уровне: при обработке культуры клеток цисплатином ATR способствует повышению уровня мРНК *PRIMPOL* в клетке [16]. Возможно, ATR влияет на PrimPol и опосредованно через консервативный путь ATR-CLASPIN-зависимой активации CHK1-киназы [65], которая фосфорилирует PrimPol и стимулирует её активность [95]. Тем не менее ни ATR, ни CHK1-киназа не оказывают прямого влияния на локализацию PrimPol в клетке и связывание с хроматином [86].

Между PrimPol и ATR возможна и обратная положительная регуляция. Показано, что синтез новых праймеров после остановки репликативной ДНКП стимулирует активацию ATR [111]. Предполагается, что праймеры, синтезированные в результате реинициации репликации PrimPol, предоставляют 5'-концевые сайты для посадки комплекса 9-1-1 — функционального аналога PCNA, с которым взаимодействуют белки-активаторы ATR [78]. Следовательно, чем больше количество молекул PrimPol и выше их активность, тем больше праймеров она создаёт и тем сильнее активируется ATR. Однако эта гипотеза требует экспериментальной проверки.

ATR может играть роль и в переключении между процессами реинициации синтеза ДНК PrimPol и другими механизмами толерантности к повреждениям ДНК. В нескольких работах проводилось исследование роли PrimPol в обеспечении ответа на генотоксический стресс в культурах клеток, нокаутных по генам белков, отвечающих за процесс реверсии репликативной вилки [4, 16, 112]. В клетках с нокаутом *BRCA1*, защищающим ревертированные репликативные вилки от нуклеаз,





**Рис. 3.** Возможные пути регуляции активности праймазы-полимеразы PrimPol человека при репликации на повреждённой ДНК в ядре. Красный перечёркнутый круг — повреждение ДНК; чёрные стрелки вверх/вниз — повышение/снижение активности белка; фиолетовый круг «P» — фосфорилирование белка; розовый круг «Ub» — убиквитинирование белка; голубые/синие стрелки — синтез ДНК репликативными ДНКП; красные стрелки — синтез ДНК *de novo* PrimPol; зелёная стрелка — транслезионный синтез REV1/Pol  $\zeta$ ; знак вопроса — неподтверждённые/неизвестные взаимодействия

однократная обработка цисплатином приводит к инициации реверсии репликативной вилки с последующей нуклеазной деградацией ДНК. Однако многократная обработка цисплатином запускает ATR-зависимую стимуляцию реинициации синтеза ДНК PrimPol и восстановление репликации. При этом при подавлении экспрессии *PRIMPOL* в клетках *BRCA1*<sup>-/-</sup> снова реализуется процесс реверсии репликативной вилки, и не защищённая от нуклеаз ДНК деградирует [16]. Таким образом, реинициация синтеза ДНК с помощью PrimPol и процесс реверсии репликативной вилки представляют собой конкурирующие механизмы, дополняющие друг друга. Действительно, подавление экспрессии белков, участвующих в реверсии репликативной вилки (опухолёвого супрессора BRCA2, рекомбиназы RAD51, транслоказы SMARCA1, хеликазоподобного транскрипционного фактора HLTf (Helicase-like transcription factor)), повышает активность PrimPol [16, 112–114]. А в клетках *PRIMPOL*<sup>-/-</sup>, наоборот, наблюдается повышение активности RAD51 — одного из основных участников процесса реверсии вилки, а также снижение количества одноцепочечных брешей, генерируемых PrimPol [4]. ATR, вероятно, играет значительную роль в регуляции данного баланса, фосфорилируя белок SMARCA1, что приводит к ингибированию процесса реверсии репликативной вилки [115].

Также недавние исследования показали, что белок PARP1 (Poly-(ADP-ribose)-polymerase 1), участвующий в регуляции репликации и репарации, вносит вклад в регуляцию баланса между реинициацией синтеза и реверсией вилки. PARP1 стабилизирует репликативные вилки в ревертированном состоянии за счёт ингибирования хеликазы RECQ1 (ATP-dependent DNA helicase Q1) [116]. Подавление активности PARP1 за счёт убиквитинирования белком MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) способствует ускоренному разрешению ревертированных репликативных вилок и стимуляции репликации за счёт реинициации синтеза ДНК с помощью PrimPol [117]. И наоборот, стимуляция PARP1-зависимого ингибирования RECQ1 белком CARM1 (Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1) способствует преимущественному использованию механизма реверсии вилки и подавлению реинициации синтеза ДНК PrimPol и транслезионного синтеза [118].

Реинициация синтеза ДНК подразумевает, что ДНК-праймеры, синтезированные PrimPol *de novo*, будут использованы репликативной Pol  $\epsilon$  или Pol  $\delta$  для продолжения высокоэффек-

тивного и точного синтеза ДНК. Поскольку PrimPol функционирует преимущественно на лидирующей цепи, то можно предположить, что удлинение новосинтезированных праймеров будет осуществлять Pol  $\epsilon$  — основная ДНКП лидирующей цепи. Однако привлечение Pol  $\epsilon$  в репликативную вилку — сложно регулируемый процесс. Pol  $\delta$ , осуществляющая синтез отстающей цепи, может корректировать ошибки Pol  $\epsilon$  на лидирующей цепи и участвовать в репликации лидирующей цепи в условиях репликативного стресса при перезапуске репликативной вилки [48–51]. Вопрос того, какая из ДНКП продолжает синтез от праймеров, синтезированных PrimPol, остаётся открытым и требует дополнительных исследований.

Успешная реинициация синтеза ДНК PrimPol позволяет репликативной вилке двигаться дальше, оставляя одноцепочечную брешь между местом остановки репликативной ДНКП на повреждённом участке и новым праймером. Застраивание образовавшейся бреши может происходить с помощью гомологичной рекомбинации и транслезионного синтеза. Было показано, что белок RAD51, играющий ключевую роль в механизме гомологичной рекомбинации, может участвовать в процессинге одноцепочечных брешей, генерируемых PrimPol при синтезе ДНК-праймеров *de novo*. При обработке клеток человека ДНК-повреждающими агентами RAD51 привлекается к одноцепочечным брешам, генерируемым PrimPol, запуская гомологичную рекомбинацию и восстановление целостности ДНК [17]. Размер брешей, образованных PrimPol, в среднем составляет около 14 нуклеотидов [5] и требует процессинга нуклеазами MRE11 (Double-strand break repair protein MRE11) и EXO1 (Exonuclease 1) [17]. Стабилизацию RAD51 на оцДНК и предотвращение чрезмерного обрезания ДНК нуклеазами, возможно, выполняет белок WRNIP1 [119], для которого также показано и взаимодействие с PrimPol [99]. Можно предположить, что WRNIP1 при регуляции активности PrimPol играет двойную роль, контролируя процессинг оцДНК брешей, генерируемых PrimPol, и регулируя количество молекул PrimPol. Заполнение оцДНК брешей, образованных PrimPol, может происходить за счёт транслезионного синтеза специализированными ДНКП, например, REV1 и Pol  $\zeta$  [120].

Итак, рассмотрим возможные пути регуляции активности праймазы-полимеразы PrimPol человека при репликации на повреждённой ДНК в ядре (рис. 3).

Под действием генотоксического стресса происходит рассинхронизация реплицомы и накопление одноцепочечных фрагментов ДНК [73, 74], связанных с белком RPA, который служит сигналом для активации сигнальной системы ATR-киназы белками-активаторами и медиаторами (9-1-1, ATRIP, ETAA1, TOPBP1, CLASPIN) [76, 78, 110]. Для осуществления механизма реинициации синтеза ДНК необходимо отключить альтернативный механизм реверсии репликативной вилки посредством фосфорилирования белка SMARCA1 ATR-киназой [115], подавления активности RARP1 [117] или других путей. Далее происходит увеличение количества стабильных молекул PrimPol в клетке за счёт повышения экспрессии PrimPol под действием ATR-киназы [16] и за счёт снижения протеолиза молекул PrimPol благодаря снятию с них убиквитиновых меток деубиквитиной USP36 [98]. Активация сигнального пути ATR-киназы подразумевает CLASPIN-опосредованное фосфорилирование чекпойнт-киназы CHK1 [65]. CHK1 фосфорилирует PrimPol по консервативному остатку Ser255 в неструктурированной петле каталитического центра белка, что способствует повышению активности PrimPol [95]. Активированная PrimPol с высокой эффективностью связывается с белком RPA [95], запуская синтез праймеров *de novo* [3, 15, 86]. Белок PolDIP2 может повышать сродство PrimPol к ДНК и нуклеотидным субстратам и стимулировать её активность, однако точная роль PolDIP2 в регуляции инициации синтеза ДНК PrimPol *de novo* неясна [14, 93, 101, 106, 107]. Возможно, образование новых ДНК-праймеров стимулирует дальнейшую активацию ATR-киназы за счёт связывания с праймерами активирующего комплекса 9-1-1–TOPBP1 [111], в результате чего может реализовываться цикл с положительной обратной связью между PrimPol и ATR. Праймеры, синтезированные PrimPol, используют для дальнейшего синтеза одна из репликативных ДНКП [48–50]. После успешного восстановления движения репликативной вилки PrimPol необходимо удалить. Фосфорилирование протеинкиназой PLK1 остатка PrimPol Ser538, располагающегося в С-концевой области между двумя мотивами связывания белка RPA, приводит, предположительно, к нарушению взаимодействия с RPA и ДНК [96]. Белок WRNIP взаимодействует с убиквитинированной PrimPol и стимулирует её разрушение протеасомой [99], при этом WRNIP также может играть роль в стабилизации одноцепочечной бреши, оставленной PrimPol, и в стабилизации белка RAD51 [119]. На заключительном этапе

одноцепочечные бреши, возникшие в результате работы PrimPol, застраиваются в ходе гомологичной рекомбинации [17] или транслезионного синтеза [120].

### НАРУШЕНИЯ В СТРУКТУРЕ PrimPol И ИХ СВЯЗЬ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛОВЕКА

Исследования показали, что мыши, дефектные по PrimPol, жизнеспособны, однако клетки, в которых подавлена её экспрессия, испытывают репликативный стресс, демонстрируют генетическую нестабильность и нарушения митохондриальной репликации [2]. Предположительно отсутствие PrimPol может быть компенсировано *in vivo* альтернативными механизмами: репликацией повреждённой ДНК и участков ДНК с неканоническими структурами при участии других ДНКП и хеликаз, механизмами переключения матриц и гомологичной рекомбинации, а также пробуждением «спящих» точек начала репликации. Было показано, что клетки лимфоцитов курицы DT40 с недостатком только PrimPol или Pol η/Pol ζ жизнеспособны и пролиферируют с нормальной скоростью. Однако клетки с одновременным дефицитом PrimPol и Pol η/Pol ζ медленно пролиферируют и быстро погибают при культивировании. Эти данные позволяют предположить, что механизмы толерантности к повреждениям, в которых участвуют PrimPol и Pol η/Pol ζ, не перекрываются и компенсируют друг друга [5].

Мутации *PRIMPOL* предположительно могут вносить вклад в развитие некоторых заболеваний у человека, таких как наследственные митохондриальные патологии (например, мышечные дистрофии и офтальмологические болезни) и злокачественные опухоли. Секвенирование экзона пациентов с наследственной миопией высокой степени, проведённое Zhao F. et al., выявило связь между развитием заболевания и миссенс-мутацией (NM\_152683.2: c.265T>G) гена *PRIMPOL*, которая приводит к аминокислотной замене Y89D. Данная мутация была обнаружена в одном случае семейного заболевания и у четырёх спорадических пациентов с миопией высокой степени [20]. Аминокислотная замена Y89D вызывает значительные конформационные изменения в полимеразном домене PrimPol человека и существенно снижает её активность [20]. Мутантный белок PrimPol (Y89D) обладает сниженным сродством к dNTP и ДНК-матрице и процессивностью. Кроме того, вариант PrimPol



с заменой Y89D неспособен синтезировать РНК-праймеры, но сохраняет способность к синтезу ДНК-праймеров [21]. Данные, полученные *in vitro*, коррелируют с данными исследований *in vivo*. Аминокислотная замена Y89D в PrimPol приводит к повышению чувствительности клеток к УФ-излучению, сравнимому с эффектом отсутствия PrimPol [21]. Однако секвенирование генома, проведённое Li L. et al., не показало чёткой связи между аминокислотной заменой Y89D в PrimPol и развитием болезни. Согласно данным Li L. et al. вариант PrimPol (Y89D) был обнаружен как у пациентов с миопией, так и у пациентов с другими заболеваниями органов зрения, а также у здоровых людей [121]. Позже был исследован ещё один случай семейного наследования данной мутации, возникшей *de novo* у мужчины, страдающего миопией высокой степени. Родители мужчины были носителями гена *PRIMPOL* дикого типа и обладали абсолютным зрением, в то время как его сын унаследовал мутацию и проявлял признаки нарушения общего развития и зрения [122]. Также данная мутация была обнаружена у пациентов с прогрессирующей наружной офтальмоплегией, возникающей в результате мутаций митохондриальной ДНК [22]. Таким образом, нельзя исключать, что нарушение функционирования PrimPol с заменой Y89D приводит к патологии. Требуется дополнительные исследования.

Замена Y100H PrimPol была обнаружена в образцах рака лёгкого. Данная замена приводит к потере PrimPol способности дискриминировать рибо- и дезоксирибонуклеотиды, что выражается в повышении эффективности включения рибонуклеотидов. Она может способствовать выживаемости раковых клеток на ранних стадиях онкогенеза, когда снижается пул доступных dNTP [24].

Две другие аминокислотные замены, F522V и I554T, располагающиеся в мотиве, отвечающем за связывание PrimPol с RPA, также были обнаружены у онкологических пациентов. Данные замены значительно снижали способность PrimPol связывать RPA *in vitro* [15], хотя связь с онкологическими заболеваниями для данных замен пока не была доказана.

Анализ данных по экспрессии генов человека в рамках проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas) показал, что нарушение экспрессии *PRIMPOL* потенциально может быть ассоциировано с развитием некоторых онкологических заболеваний [123]. В частности, большое число делеций в гене *PRIMPOL* было обнаружено у пациенток с инвазивными лобулярными (дольковыми) и про-

токовыми карциномами груди. В недавней работе был проведён анализ баз данных COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) и GDC (Genomic Data Commons) [124]. В результате было обнаружено множество соматических мутаций в гене *PRIMPOL*, затрагивающих активный центр фермента (R76H, Y100H, K165N), участки связывания с регуляторными белками PolDIP2 и RPA (G201D, H214Y, F522V и др.) и мотив ZnF (R417L, R417W, H426N, H426R). Однако на сегодняшний день подробно исследованы каталитические свойства только нескольких вариантов PrimPol из множества обнаруженных [15, 24].

Нарушение функции PrimPol может быть связано и со случаями непереносимости препаратов антиретровирусной терапии. В частности, замена D114N, затрагивающая активный центр PrimPol, была обнаружена у ВИЧ-положительных пациентов, страдающих от митохондриальной токсичности в результате приёма препарата тенофовир. Данная аминокислотная замена подавляет праймазную и ДНК-полимеразную активности PrimPol, в результате чего снижается защита от побочного действия тенофовира, ингибирующего митохондриальную репликацию [23].

Продолжение исследований функций и свойств PrimPol человека может иметь важное медицинское значение и необходимо для понимания механизмов развития заболеваний, связанных с нарушением стабильности генома и клеточного ответа на факторы, повреждающие ДНК.

## НЕРЕШЁННЫЕ ВОПРОСЫ

Представленная на рис. 3 схема регуляции PrimPol является попыткой объединения всех имеющихся на данный момент сведений в один механизм, но всё же не даёт полного понимания происходящего. Многие предполагаемые взаимосвязи не доказаны экспериментально. Остаётся множество открытых вопросов, для ответа на которые необходимы дальнейшие исследования. Например: какую роль в регуляции механизма реинициации синтеза PrimPol играет белок PolDIP2? Каков молекулярный механизм стимуляции активности PrimPol RPA? Какая из репликативных ДНКП, Pol  $\epsilon$  или Pol  $\delta$ , в клетке продолжает синтез ДНК с праймеров, созданных PrimPol? Каким образом происходит регуляция работы PrimPol в митохондриях, и какую роль играет взаимодействие PrimPol с хеликазой TWINKLE? Таким образом, анализ механизма регуляции активности PrimPol и путей реинициации синтеза ДНК



является актуальным направлением дальнейших исследований.

**Вклад авторов.** Болдинова Е.О. — анализ литературы, написание черновика статьи; Макарова А.В. — редактирование статьи.

**Финансирование.** Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-24-20150 (БЕО).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Ю.И. Павлову и А.Г. Барановскому за ценную дискуссию и советы.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Leipe, D. D., and Aravind, L. (2005) Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3875–3896, doi: 10.1093/nar/gki702.
- García-Gómez, S., Reyes, A., Martínez-Jiménez, M. I., Chocrón, S., Mourón, S., Terrados, G., Powell, C., Salido, E., Méndez, J., Holt, I. J., and Blanco, L. (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells, *Mol. Cell*, **52**, 541–553, doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.025.
- Wan, L., Lou, J., Xia, Y., Su, B., Liu, T., Cui, J., Sun, Y., Lou, H., and Huang, J. (2013) HPrimpoll/CCDC111 is a human DNA primase-polymerase required for the maintenance of genome integrity, *EMBO Rep.*, **14**, 1104–1112, doi: 10.1038/embor.2013.159.
- Bianchi, J., Rudd, S. G., Jozwiakowski, S. K., Bailey, L. J., Soura, V., Taylor, E., Stevanovic, I., Green, A. J., Stracker, T. H., Lindsay, H. D., and Doherty, A. J. (2013) PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication, *Mol. Cell*, **52**, 566–573, doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.035.
- Kobayashi, K., Guillian, T. A., Tsuda, M., Yamamoto, J., Bailey, L. J., Iwai, S., Takeda, S., Doherty, A. J., and Hirota, K. (2016) Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleoside, *Cell Cycle*, **15**, 1997–2008, doi: 10.1080/15384101.2016.1191711.
- Bailey, L. J., Bianchi, J., Hégarat, N., Hochegger, H., and Doherty, A. J. (2016) PrimPol-deficient cells exhibit a pronounced G2 checkpoint response following UV damage, *Cell Cycle*, **15**, 908–918, doi: 10.1080/15384101.2015.1128597.
- Bailey, L. J., Bianchi, J., and Doherty, A. J. (2019) PrimPol is required for the maintenance of efficient nuclear and mitochondrial DNA replication in human cells, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4026–4038, doi: 10.1093/nar/gkz056.
- Makarova, A. V., Boldinova, E. O., Belousova, E. A., and Lavrik, O. I. (2018) *In vitro* lesion bypass by human PrimPol, *DNA Repair (Amst.)*, **70**, 18–24, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.07.009.
- Keen, B. A., Jozwiakowski, S. K., Bailey, L. J., Bianchi, J., and Doherty, A. J. (2014) Molecular dissection of the domain architecture and catalytic activities of human PrimPol, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 5830–5845, doi: 10.1093/nar/gku214.
- Stojkovic, G., Makarova, A. V., Wanrooij, P. H., Forslund, J., Burgers, P. M. J., and Wanrooij, S. (2016) Oxidative DNA damage stalls the human mitochondrial replisome, *Sci. Rep.*, **6**, 28942, doi: 10.1038/srep28942.
- Zafar, M. K., Ketkar, A., Lodeiro, M. F., Cameron, C. E., and Eoff, R. L. (2014) Kinetic analysis of human PrimPol DNA polymerase activity reveals a generally error-prone enzyme capable of accurately bypassing 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, *Biochemistry*, **53**, 6584–6594, doi: 10.1021/bi501024u.
- Martínez-Jiménez, M. I., García-Gómez, S., Bebenek, K., Sastre-Moreno, G., Calvo, P. A., Díaz-Talavera, A., Kunkel, T. A., and Blanco, L. (2015) Alternative solutions and new scenarios for translesion DNA synthesis by human PrimPol, *DNA Repair (Amst.)*, **29**, 127–138, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.013.
- Boldinova, E. O., Yudkina, A. V., Shilkin, E. S., Gagarinskaya, D. I., Baranovskiy, A. G., Tahirov, T. H., Zharkov, D. O., and Makarova, A. V. (2021) Translesion activity of PrimPol on DNA with cisplatin and DNA-protein cross-links, *Sci. Rep.*, **11**, 17588, doi: 10.1038/s41598-021-96692-y.
- Boldinova, E. O., Ghodke, P. P., Sudhakar, S., Mishra, V. K., Manukyan, A. A., Miropolskaya, N., Pradeepkumar, P. I., and Makarova, A. V. (2022) Translesion synthesis across the N<sup>2</sup>-Ethyl-deoxyguanosine adduct by human PrimPol, *ACS Chem. Biol.*, **17**, 3238–3250, doi: 10.1021/acscchembio.2c00717.
- Guillian, T. A., Brissett, N. C., Ehlinger, A., Keen, B. A., Kolesar, P., Taylor, E., Bailey, L. J., Lindsay, H. D., Chazin, W. J., and Doherty, A. J. (2017) Molecular basis for PrimPol recruitment to replication forks by RPA, *Nat. Commun.*, **8**, 15222, doi: 10.1038/ncomms15222.
- Quinet, A., Tirman, S., Jackson, J., Šviković, S., Lemaçon, D., Carvajal-Maldonado, D., González-

- Acosta, D., Vessoni, A. T., Cybulla, E., Wood, M., Tavis, S., Batista, L. F. Z., Méndez, J., Sale, J. S., and Vindigni, A. (2019) PRIMPOL-mediated adaptive response suppresses replication fork reversal in BRCA-deficient cells, *Mol. Cell*, **77**, 461-474.e9, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.008.
17. Piberger, A. L., Bowry, A., Kelly, R., Walker, A. K., Gonzalez, D., Bailey, L. J., Doherty, A. J., Méndez, J., Morris, J. R., Bryant, H. E., and Petermann, E. (2020) PrimPol-dependent single-stranded gap formation mediates homologous recombination at bulky DNA adducts, *Nat. Commun.*, **11**, 5863, doi: 10.1038/s41467-020-19570-7.
18. González-Acosta, D., Blanco-Romero, E., Ubieto-Capella, P., Mutreja, K., Míguez, S., Llanos, S., García, F., Muñoz, J., Blanco, L., Lopes, M., and Méndez, J. (2021) PrimPol-mediated repriming facilitates replication traverse of DNA interstrand crosslinks, *EMBO J.*, **40**, e106355, doi: 10.15252/embj.2020106355.
19. Schiavone, D., Jozwiakowski, S. K., Romanello, M., Guilbaud, G., Guillian, T. A., Bailey, L. J., Sale, J. E., and Doherty, A. J. (2016) PrimPol is required for replicative tolerance of G quadruplexes in vertebrate cells, *Mol. Cell*, **61**, 161-169, doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.038.
20. Zhao, F., Wu, J., Xue, A., Su, Y., Wang, X., Lu, X., Zhou, Z., Qu, J., and Zhou, X. (2013) Exome sequencing reveals CCDC111 mutation associated with high myopia, *Hum. Genet.*, **132**, 913-921, doi: 10.1007/s00439-013-1303-6.
21. Keen, B. A., Bailey, L. J., Jozwiakowski, S. K., and Doherty, A. J. (2014) Human PrimPol mutation associated with high myopia has a DNA replication defect, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12102-12111, doi: 10.1093/nar/gku879.
22. Kasamo, K., Nakamura, M., Daimou, Y., and Sano, A. (2020) A PRIMPOL mutation and variants in multiple genes may contribute to phenotypes in a familial case with chronic progressive external ophthalmoplegia symptoms, *Neurosci. Res.*, **157**, 58-63, doi: 10.1016/j.neures.2019.07.006.
23. Duong, V. N., Zhou, L., Martínez-Jiménez, M. I., He, L., Cosme, M., Blanco, L., Painsil, E., Anderson, K. S. (2020) Identifying the role of PrimPol in TDF-induced toxicity and implications of its loss of function mutation in an HIV<sup>+</sup> patient, *Sci. Rep.*, **10**, 9343, doi: 10.1038/s41598-020-66153-z.
24. Díaz-Talavera, A., Calvo, P. A., González-Acosta, D., Díaz, M., Sastre-Moreno, G., Blanco-Franco, L., Guerra, S., Martínez-Jiménez, M. I., Méndez, J., and Blanco, L. (2019) A cancer-associated point mutation disables the steric gate of human PrimPol, *Sci. Rep.*, **9**, 1121, doi: 10.1038/s41598-018-37439-0.
25. Picher, Á. J., Budeus, B., Wafzig, O., Krüger, C., García-Gómez, S., Martínez-Jiménez, M. I., Díaz-Talavera, A., Weber, D., Blanco, L., and Schneider, A. (2016) TruePrime is a novel method for whole-genome amplification from single cells based on TthPrimPol, *Nat. Commun.*, **7**, 13296, doi: 10.1038/ncomms13296.
26. Agudo, R., Calvo, P. A., Martínez-Jiménez, M. I., and Blanco, L. (2017) Engineering human PrimPol into an efficient RNA-dependent-DNA primase/polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 9046-9058, doi: 10.1093/nar/gkx633.
27. Boldinova, E. O., Wanrooij, P. H., Shilkin, E. S., Wanrooij, S., and Makarova, A. V. (2017) DNA damage tolerance by eukaryotic DNA polymerase and primase PrimPol, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1584, doi: 10.3390/ijms18071584.
28. Tirman, S., Cybulla, E., Quinet, A., Meroni, A., and Vindigni, A. (2020) PRIMPOL ready, set, re-prime! *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **56**, 17-30, doi: 10.1080/10409238.2020.1841089.
29. Baretic, D., Jenkyn-Bedford, M., Aria, V., Cannone, G., Skehel, M., and Yeeles, J. T. P. (2020) Cryo-EM structure of the fork protection complex bound to CMG at a replication fork, *Mol. Cell*, **78**, 926-940.e13, doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.012.
30. Jones, M. L., Baris, Y., Taylor, M. R. G., and Yeeles, J. T. P. (2021) Structure of a human replisome shows the organisation and interactions of a DNA replication machine, *EMBO J.*, **40**, e108819, doi: 10.15252/embj.2021108819.
31. Yuan, Z., Georgescu, R., Santos, R. L. A., Zhang, D., Bai, L., Yao, N. Y., Zhao, G., O'Donnell, M. E., and Li, H. (2019) Ctf4 organizes sister replisomes and Pol  $\alpha$  into a replication factory, *eLife*, **8**, e47405, doi: 10.7554/eLife.47405.
32. Rzechorzek, N. J., Hardwick, S. W., Jatikusumo, V. A., Chirgadze, D. Y., and Pellegrini, L. (2020) CryoEM structures of human CMG-ATP $\gamma$ S-DNA and CMG-AND-1 complexes, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 6980-6995, doi: 10.1093/nar/gkaa429.
33. Kapadia, N., El-Hajj, Z. W., Zheng, H., Beattie, T. R., Yu, A., and Reyes-Lamothe, R. (2020) Processive activity of replicative DNA polymerases in the replisome of live eukaryotic cells, *Mol. Cell*, **80**, 114-126.e8, doi: 10.1016/j.molcel.2020.08.014.
34. Lewis, J. S., Spenkelink, L. M., Schauer, G. D., Yurieva, O., Mueller, S. H., Natarajan, V., Kaur, G., Maher, C., Kay, C., O'Donnell, M. E., and van Oijen, A. M. (2020) Tunability of DNA polymerase stability during eukaryotic DNA replication, *Mol. Cell*, **77**, 17-25.e5, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.005.
35. Donnell, M. O., and Li, H. (2016) The eukaryotic replisome goes under the microscope, *Curr. Biol.*, **26**, R247-R256, doi: 10.1016/j.cub.2016.02.034.
36. Bleichert, F., Botchan, M. R., and Berger, J. M. (2017) Mechanisms for initiating cellular DNA replication, *Science*, **355**, eaah6317, doi: 10.1126/science.aah6317.
37. Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J. D., Morris, E. P., and Diffley, J. F. X. (2009) Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA

- during DNA replication origin licensing, *Cell*, **139**, 719-730, doi: 10.1016/j.cell.2009.10.015.
38. Tanaka, S., and Araki, H. (2013) Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a010371, doi: 10.1101/cshperspect.a010371.
  39. Perez-Arnaiz, P., Bruck, I., and Kaplan, D. L. (2016) Mcm10 coordinates the timely assembly and activation of the replication fork helicase, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 315-329, doi: 10.1093/nar/gkv1260.
  40. Kim, C., Paulus, B. F., and Wold, M. S. (1994) Interactions of human replication protein A with oligonucleotides, *Biochemistry*, **33**, 14197-14206, doi: 10.1021/bi00251a031.
  41. Yates, L. A., Aramayo, R. J., Pokhrel, N., Caldwell, C. C., Kaplan, J. A., Perera, R. L., Spies, M., Antony, E., and Zhang, X. (2018) A structural and dynamic model for the assembly of replication protein A on single-stranded DNA, *Nat. Commun.*, **9**, 5447, doi: 10.1038/s41467-018-07883-7.
  42. Pestryakov, P. E., and Lavrik, O. I. (2008) Mechanisms of single-stranded DNA-binding protein functioning in cellular DNA metabolism, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1388-1404, doi: 10.1134/S0006297908130026.
  43. Bhat, K. P., and Cortez, D. (2018) RPA and RAD51: fork reversal, fork protection, and genome stability, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 446-453, doi: 10.1038/s41594-018-0075-z.
  44. Zou, Y., Liu, Y., Wu, X., and Shell, S. M. (2006) Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses, *J. Cell Physiol.*, **208**, 267-273, doi: 10.1002/jcp.20622.
  45. Jain, R., Aggarwal, A. K., and Rech Koblit, O. (2018) Eukaryotic DNA polymerases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **53**, 77-87, doi: 10.1016/j.sbi.2018.06.003.
  46. Baranovskiy, A. G., Babayeva, N. D., Zhang, Y., Gu, J., Suwa, Y., Pavlov, Y. I., and Tahirov, T. H. (2016) Mechanism of concerted RNA-DNA primer synthesis by the human primosome, *J. Biol. Chem.*, **291**, 10006-10020, doi: 10.1074/jbc.M116.717405.
  47. Goswami, P., Abid Ali, F., Douglas, M. E., Locke, J., Purkiss, A., Janska, A., Eickhoff, P., Early, A., Nans, A., Cheung, A. M. C., Diffley, J. F. X., and Costa, A. (2018) Structure of DNA-CMG-Pol epsilon elucidates the roles of the non-catalytic polymerase modules in the eukaryotic replisome, *Nat. Commun.*, **9**, 5061, doi: 10.1038/s41467-018-07417-1.
  48. Guillian, T. A., and Yeeles, J. T. (2021) The eukaryotic replisome tolerates leading-strand base damage by replicase switching, *EMBO J.*, **40**, e107037, doi: 10.15252/embj.2020107037.
  49. Miyabe, I., Mizuno, K., Keszthelyi, A., Daigaku, Y., Skouteri, M., Mohebi, S., Kunkel, T. A., Murray, J. M., and Carr, A. M. (2015) Polymerase  $\delta$  replicates both strands after homologous recombination-dependent fork restart, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 932-938, doi: 10.1038/nsmb.3100.
  50. Zhou, Z.-X., Lujan, S. A., Burkholder, A. B., Charles, J. S., Dahl, J., Farrell, C. E., Williams, J. S., and Kunkel, T. A. (2021) How asymmetric DNA replication achieves symmetrical fidelity, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **28**, 1020-1028, doi: 10.1038/s41594-021-00691-6.
  51. Bullock, C. R., Xing, X., and Shcherbakova, P. V. (2020) DNA polymerase  $\delta$  proofreads errors made by DNA polymerase  $\epsilon$ , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6035-6041, doi: 10.1073/pnas.1917624117.
  52. Sun, H., Ma, L., Tsai, Y., Abeywardana, T., Shen, B., and Zheng, L. (2022) Okazaki fragment maturation: DNA flap dynamics for cell proliferation and survival, *Trends Cell Biol.*, **33**, 221-234, doi: 10.1016/j.tcb.2022.06.014.
  53. Stodola, J. L., and Burgers, P. M. J. (2017) Mechanism of lagging-strand DNA replication in eukaryotes, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1042**, 117-133, doi: 10.1007/978-981-10-6955-0-6.
  54. Sobhy, M. A., Tehseen, M., Takahashi, M., Bralić, A., Biasio, A. De, and Hamdan, S. M. (2021) Implementing fluorescence enhancement, quenching, and FRET for investigating flap endonuclease 1 enzymatic reaction at the single-molecule level, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **19**, 4456-4471, doi: 10.1016/j.csbj.2021.07.029.
  55. Liu, S., Lu, G., Ali, S., Liu, W., Zheng, L., Dai, H., Li, H., Xu, H., Hua, Y., Zhou, Y., Ortega, J., Li, G., Kunkel, T. A., and Shen, B. (2015) Okazaki fragment maturation involves  $\alpha$ -segment error editing by the mammalian FEN 1/MutSa functional complex, *EMBO J.*, **34**, 1829-1843, doi: 10.15252/embj.201489865.
  56. Howes, T. R. L., and Tomkinson, A. E. (2012) DNA ligase I, the replicative DNA ligase, *The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function* (MacNeill, S., ed.) Dordrecht, Springer, pp. 327-341, doi: 10.1007/978-94-007-4572-8.
  57. Sverzhinsky, A., Tomkinson, A. E., and Pascal, J. M. (2022) Cryo-EM structures and biochemical insights into heterotrimeric PCNA regulation of DNA ligase, *Structure*, **30**, 371-385.e5, doi: 10.1016/j.str.2021.11.002.
  58. Gonzalez-Magana, A., and Blanco, F. J. (2020) Human PCNA structure, function, and interactions, *Biomolecules*, **10**, 570, doi: 10.3390/biom10040570.
  59. Stokes, K., Winczura, A., Song, B., De Piccoli, G., and Grabarczyk, D. B. (2020) Ctf18-RFC and DNA Pol epsilon form a stable leading strand polymerase/clamp loader complex required for normal and perturbed DNA replication, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 8128-8145, doi: 10.1093/nar/gkaa541.
  60. Baris, Y., Taylor, M. R. G., Aria, V., and Yeeles, J. T. P. (2022) Fast and efficient DNA replication with purified human proteins, *Nature*, **606**, 204-210, doi: 10.1038/s41586-022-04759-1.
  61. Chilkova, O., Stenlund, P., Isoz, I., Stith, C. M., Burgers, P. M., and Johansson, E. (2007) The eu-



- karyotic leading and lagging strand DNA polymerases are loaded onto primer-ends via separate mechanisms but have comparable processivity in the presence of PCNA, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6588-6597, doi: 10.1093/nar/gkm741.
62. Lancey, C., Tehseen, M., Raducanu, V., Rashid, F., Merino, N., Ragan, T. J., Savva, C. G., Zaher, M. Z., Shirbini, A., Blanco, F. J., Hamdan, S. M., and De Biasio, A. (2020) Structure of the processive human Pol  $\delta$  holoenzyme, *Nat. Commun.*, **11**, 1109, doi: 10.1038/s41467-020-14898-6.
  63. Craggs, T. D., Hutton, R. D., Brenlla, A., White, M. F., and Penedo, J. C. (2014) Single-molecule characterization of Fen1 and Fen1/PCNA complexes acting on flap substrates, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 1857-1872, doi: 10.1093/nar/gkt1116.
  64. Smits, V. A. J., Cabrera, E., Freire, R., and Gillespie, D. A. (2019) Claspin – checkpoint adaptor and DNA replication factor, *EMBO J.*, **286**, 441-455, doi: 10.1111/febs.14594.
  65. Hsiao, H. W., Chun, C., and Hisao, Y. (2021) Roles of Claspin in regulation of DNA replication, replication stress responses and oncogenesis in human cells, *Genome Instab. Dis.*, **2**, 263-280, doi: 10.1007/s42764-021-00049-8.
  66. Bertoli, C., Skotheim, J. M., De Bruin, R. A. M., and Street, G. (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 518-528, doi: 10.1038/nrm3629.
  67. Hume, S., Dianov, G. L., and Ramadan, K. (2020) A unified model for the G1/S cell cycle transition, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12483-12501, doi: 10.1093/nar/gkaa1002.
  68. Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 153-166, doi: 10.1038/nrc2602.
  69. Mujwar, S., Mojzych, M., and Kontek, R. (2022) Cyclin-dependent kinases in DNA damage response, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1877**, 188716, doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188716.
  70. Williams, A. B., and Schumacher, B. (2016) p53 in the DNA-damage-repair process, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, a026070, doi: 10.1101/cshperspect.a026070.
  71. Barnum, K. J., and Connell, M. J. O. (2014) Cell cycle regulation by checkpoints, *Methods Mol. Biol.*, **1170**, 29-40, doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2.
  72. Patil, M., Pabla, N., and Dong, Z. (2013) Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation, *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 4009-4021, doi: 10.1007/s00018-013-1307-3.
  73. Taylor, M. R. G., and Yeeles, J. T. P. (2019) Dynamics of replication fork progression following helicase–polymerase uncoupling in eukaryotes, *J. Mol. Biol.*, **431**, 2040-2049, doi: 10.1016/j.jmb.2019.03.011.
  74. Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J. C., and Cimprich, K. A. (2005) Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint, *Genes Dev.*, **19**, 1040-1052, doi: 10.1101/gad.1301205.
  75. Wong, R. P., Garcia-Rodriguez, N., Zilio, N., Hanulova, M., and Ulrich, H. (2020) Processing of DNA polymerase-blocking lesions during genome replication is spatially and temporally segregated from replication forks, *Mol. Cell*, **77**, 3-16.e4, doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.015.
  76. Zou, L., and Elledge, S. J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA–ssDNA complexes, *Science*, **300**, 1542-1548, doi: 10.1126/science.1083430.
  77. Blackford, A. N., and Jackson, S. P. (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response, *Mol. Cell*, **66**, 801-817, doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015.
  78. Saldivar, J. C., Cortez, D., and Cimprich, K. A. (2017) The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 622-636, doi: 10.1038/nrm.2017.67.
  79. Cimprich, K. A., and Cortez, D. (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 616-627, doi: 10.1038/nrm2450.
  80. Li, X., and Heyer, W.-D. (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance, *Cell Res.*, **18**, 99-113, doi: 10.1038/cr.2008.1.
  81. Chang, D. J., and Cimprich, K. A. (2009) DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 82-90, doi: 10.1038/nchembio.139.
  82. Neelsen, K. J., and Lopes, M. (2015) Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 207-220, doi: 10.1038/nrm3935.
  83. Berti, M., Cortez, D., and Lopes, M. (2020) The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 633-651, doi: 10.1038/s41580-020-0257-5.
  84. Calvo, P. A., Sastre-Moreno, G., Perpiñá, C., Guerra, S., Martínez-Jiménez, M. I., and Blanco, L. (2019) The invariant glutamate of human PrimPol DxEx motif is critical for its Mn<sup>2+</sup>-dependent distinctive activities, *DNA Repair (Amst.)*, **77**, 65-75, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.03.006.
  85. Boldinova, E. O., Manukyan, A. A., and Makarova, A. V. (2021) The DNA ligands Arg47 and Arg76 are crucial for catalysis by human PrimPol, *DNA Repair (Amst.)*, **100**, 103048, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103048.
  86. Mourón, S., Rodríguez-Acebes, S., Martínez-Jiménez, M. I., García-Gómez, S., Chocrón, S., Blanco, L., and Méndez, J. (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1383-1389, doi: 10.1038/nsmb.2719.



87. Martínez-Jiménez, M. I., Calvo, P. A., García-Gómez, S., Guerra-González, S., and Blanco, L. (2018) The Zn-finger domain of human PrimPol is required to stabilize the initiating nucleotide during DNA priming, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 4138-4151, doi: 10.1093/nar/gky230.
88. Tokarsky, E. J., Wallenmeyer, P. C., Phi, K. K., and Suo, Z. (2016) Significant impact of divalent metal ions on the fidelity, sugar selectivity, and drug incorporation efficiency of human PrimPol, *DNA Repair (Amst.)*, **49**, 51-59, doi: 10.1016/j.dnarep.2016.11.003.
89. Traut, T. W. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines, *Mol. Cel. Biochem.*, **140**, 1-22, doi: 10.1007/BF00928361.
90. McElhinny, S. A., Watts, B. E., Kumar, D., Watt, D. L., and Lundström, E. (2010) Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4949-4954, doi: 10.1073/pnas.0914857107.
91. Blanco, L., Calvo, P. A., Diaz-Talavera, A., Carvalho, G., Calero, N., Martínez-Carrón, A., Velázquez-Ruiz, C., Villadangos, S., Guerra, S., and Martínez-Jiménez, M. I. (2019) Mechanism of DNA primer synthesis by human PrimPol, *Enzymes*, **45**, 289-310, doi: 10.1016/bs.enz.2019.06.003.
92. Butler, T. J., Estep, K. N., Sommers, J. A., Maul, R. W., Moore, A. Z., Bandinelli, S., Cucca, F., Tuke, M. A., Wood, A. R., Bharti, S. K., Bogenhagen, D. F., Yakubovskaya, E., Garcia-Diaz, M., Guillian, T. A., Byrd, A. K., Raney, K. D., Doherty, A. J., Ferrucci, L., Schlessinger, D., Ding, J., and Brosh, R. M., Jr. (2020) Mitochondrial genetic variation is enriched in G-quadruplex regions that stall DNA synthesis *in vitro*, *Hum. Mol. Genet.*, **29**, 1292-1309, doi: 10.1093/hmg/ddaa043.
93. Boldinova, E. O., Belousova, E. A., Gagarinskaya, D. I., Maltseva, E. A., Khodyreva, S. N., Lavrik, O. I., and Makarova, A. V. (2020) Strand displacement activity of PrimPol, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9027, doi: 10.3390/ijms21239027.
94. Torregrosa-Muñumer, R., Forslund, J., Goffart, S., Pfeiffer, A., Stojkovic, G., Carvalho, G., Al-Furoukh, N., Blanco, L., Wanrooij, S., and Pohjoismäki, J. L. O. (2017) PrimPol is required for replication reinitiation after mtDNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11398-11403, doi: 10.1073/pnas.1705367114.
95. Mehta, K. P. M., Thada, V., Zhao, R., Krishnamoorthy, A., Leser, M., Rose, K. L., and Cortez, D. (2022) CHK1 phosphorylates PRIMPOL to promote replication stress tolerance, *Sci. Adv.*, **8**, eabm0314, doi: 10.1126/sciadv.abm0314.
96. Bailey, L. J., Teague, R., Kolesar, P., Bainbridge, L. J., Lindsay, H. D., and Doherty, A. J. (2021) PLK1 regulates the PrimPol damage tolerance pathway during the cell cycle, *Sci. Adv.*, **7**, eabh1004, doi: 10.1126/sciadv.abh1004.
97. Keiji, T. (2009) The proteasome: overview of structure and functions, *Proc. Jpn.*, **85**, 12-36, doi: 10.2183/pjab/85.12.
98. Yan, Y., Xu, Z., Huang, J., Guo, G., Gao, M., Kim, W., Zeng, X., Kloeber, J. A., Zhu, Q., Zhao, F., Luo, K., and Lou, Z. (2020) The deubiquitinase USP36 regulates DNA replication stress and confers therapeutic resistance through PrimPol stabilization, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12711-12726, doi: 10.1093/nar/gkaa1090.
99. Yoshimura, A., Oikawa, M., Jinbo, H., Hasegawa, Y., Enomoto, T., and Seki, M. (2019) WRNIP1 controls the amount of PrimPol, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 764-769, doi: 10.1248/bpb.b18-00955.
100. Guillian, T. A., Jozwiakowski, S. K., Ehlinger, A., Barnes, R. P., Rudd, S. G., Bailey, L. J., Skehel, J. M., Eckert, K. A., Chazin, W. J., and Doherty, A. J. (2015) Human PrimPol is a highly error-prone polymerase regulated by single-stranded DNA binding proteins, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 1056-1068, doi: 10.1093/nar/gku1321.
101. Martínez-Jiménez, M. I., Lahera, A., and Blanco, L. (2017) Human PrimPol activity is enhanced by RPA, *Sci. Rep.*, **7**, 783, doi: 10.1038/s41598-017-00958-3.
102. Boldinova, E. O., Baranovskiy, A. G., Gagarinskaya, D. I., Manukyan, A. A., Makarova, A. V., and Tahirov, T. H. (2023) The role of catalytic and regulatory domains of human PrimPol in DNA binding and synthesis, *Nucleic Acids Res.*, gkad507, doi: 10.1093/nar/gkad507.
103. Gagarinskaya, D. I., and Makarova, A. V. (2020) A multifunctional protein PolDIP2 in DNA translesion synthesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1241**, 35-45, doi: 10.1007/978-3-030-41283-8-3.
104. Maga, G., Crespan, E., Markkanen, E., Imhof, R., Furrer, A., Villani, G., Hübscher, U., and Van Loon, B. (2013) DNA polymerase  $\delta$ -interacting protein 2 is a processivity factor for DNA polymerase  $\lambda$  during 8-oxo-7,8-dihydroguanine bypass, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 18850-18855, doi: 10.1073/pnas.1308760110.
105. Tissier, A., Janel-Bintz, R., Coulon, S., Klaile, E., Kannouche, P., Fuchs, R. P. P., and Cordonnier, A. M. (2010) Crosstalk between replicative and translesional DNA polymerases: PDIP38 interacts directly with Pol $\eta$ , *DNA Repair (Amst.)*, **9**, 922-928, doi: 10.1016/j.dnarep.2010.04.010.
106. Guillian, T. A., Bailey, L. J., Brissett, N. C., and Doherty, A. J. (2016) PolDIP2 interacts with human PrimPol and enhances its DNA polymerase activities, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3317-3329, doi: 10.1093/nar/gkw175.
107. Kazutoshi, K., Stojković, G., Velázquez-Ruiz, C., Martínez-Jiménez, M. I., Doimo, M., Laurent, T., Berner, A., Pérez-Rivera, A. E., Jenner, L., Blanco, L., and Wanrooij, S. (2021) A unique arginine cluster in PolDIP2 enhances nucleotide binding

- and DNA synthesis by PrimPol, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 2179–2191, doi: 10.1093/nar/gkab049.
108. Tsuda, M., Ogawa, S., Ooka, M., Kobayashi, K., Hirota, K., Wakasugi, M., Matsunaga, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Chikuma, S., Sasanuma, H., Debatisse, M., Doherty, A. J., Fuchs, R. P., and Takeda, S. (2019) PDIP38/PolDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching, *PLoS One*, **14**, e0213383, doi: 10.1371/journal.pone.0213383.
  109. Taylor, M. R. G., and Yeeles, J. T. P. (2018) The initial response of a eukaryotic replisome to DNA damage, *Mol. Cell*, **70**, 1067–1080, doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.022.
  110. Lyu, K., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (2019) RPA-coated single-stranded DNA promotes the ETAA1-dependent activation of ATR, *Cell Cycle*, **18**, 898–913, doi: 10.1080/15384101.2019.1598728.
  111. Van, C., Yan, S., Michael, W. M., Waga, S., and Cimprich, K. A. (2010) Continued primer synthesis at stalled replication forks contributes to checkpoint activation, *J. Cell Biol.*, **189**, 233–246, doi: 10.1083/jcb.200909105.
  112. Vallergera, M. B., Mansilla, S. F., Federico, M. B., Bertolin, A. P., and Gottifredi, V. (2015) Rad51 recombinase prevents Mre11 nuclease-dependent degradation and excessive PrimPol-mediated elongation of nascent DNA after UV irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 6624–6633, doi: 10.1073/pnas.1508543112.
  113. Bai, G., Kermi, C., Stoy, H., Schiltz, C. J., Bacal, J., Zaino, A. M., Hadden, M. K., Eichman, B. F., Lopes, M., and Cimprich, K. A. (2020) HLTf promotes fork reversal, limiting replication stress resistance and preventing multiple mechanisms of unrestrained DNA synthesis, *Mol. Cell*, **78**, 1237–1251.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.031.
  114. Kang, Z., Fu, P., Alcivar, A. L., Fu, H., Redon, C., Foo, T. K., Zuo, Y., Ye, C., Baxley, R., Madireddy, A., Buisson, R., Bielinsky, A., Zou, L., Shen, Z., Aladjem, M. I., and Xia, B. (2021) BRCA2 associates with MCM10 to suppress PRIMPOL-mediated repriming and single-stranded gap formation after DNA damage, *Nat. Commun.*, **12**, 5966, doi: 10.1038/s41467-021-26227-6.
  115. Couch, F. B., Bansbach, C. E., Driscoll, R., Luzwick, J. W., Glick, G. G., Bétous, R., Carroll, C. M., Jung, S. Y., Qin, J., Cimprich, K. A., and Cortez, D. (2013) ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse, *Genes Dev.*, **27**, 1610–1623, doi: 10.1101/gad.214080.113.
  116. Berti, M., Chaudhuri, A. R., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., Marino, F., Lucic, B., Biasin, V., Gstaiger, M., Aebersold, R., Sidorova, J. M., Monnat, R. J., Jr., Lopes, M., and Vindigni, A. (2013) Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 347–354, doi: 10.1038/nsmb.2501.
  117. Giansanti, C., Manzini, V., Dickmanns, A., Dickmanns, A., Palumbieri, M. D., Sanchi, A., Kienle, S. M., Rieth, S., Scheffner, M., Lopes, M., and Döbelstein, M. (2022) MDM2 binds and ubiquitinates PARP1 to enhance DNA replication fork progression, *Cell Rep.*, **39**, 110879, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110879.
  118. Geno, M. M., Gagné, J. P., Yasuhara, T., Jackson, J., Saxena, S., Langelier, M. F., Ahel, I., Bedford, M. T., Pascal, J. M., Vindigni, A., Poirier, G. G., and Zou, L. (2021) CARM1 regulates replication fork speed and stress response by stimulating PARP1, *Mol. Cell*, **81**, 784–800.e8, doi: 10.1016/j.molcel.2020.12.010.
  119. Leuzzi, G., Marabitti, V., Pichierri, P., and Franchitto, A. (2016) WRNIP 1 protects stalled forks from degradation and promotes fork restart after replication stress, *EMBO J.*, **35**, 1437–1451, doi: 10.15252/emboj.201593265.
  120. Tagliatela, A., Leuzzi, G., Sannino, V., Cuella-Martin, R., Huang, J. W., Wu-Baer, F., Baer, R., Costanzo, V., and Ciccio, A. (2021) REV1-Polζ maintains the viability of homologous recombination-deficient cancer cells through mutagenic repair of PRIMPOL-dependent ssDNA gaps, *Mol. Cell*, **81**, 4008–4025.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.016.
  121. Li, J., and Zhang, Q. (2015) Primpol mutation: functional study does not always reveal the truth, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **56**, 1181–1182, doi: 10.1167/iovs.14-16072.
  122. Yuan, H., Wang, Q., Li, Y., Cheng, S., Liu, J., and Liu, Y. (2020) Concurrent pathogenic variants in SLC6A1/NOTCH1/PRIMPOL genes in a Chinese patient with myoclonic-atonic epilepsy, mild aortic valve stenosis and high myopia, *BMC Med. Genet.*, **21**, 93, doi: 10.1186/s12881-020-01035-9.
  123. Pilzecker, B., Buoninfante, O. A., Pritchard, C., Blomberg, O. S., Huijbers, I. J., Van Den Berk, P. C. M., and Jacobs, H. (2016) PrimPol prevents APOBEC/AID family mediated DNA mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4734–4744, doi: 10.1093/nar/gkw123.
  124. Díaz-Talavera, A., Montero-Conde, C., Leandro-García, L. J., and Robledo, M. (2022) PrimPol: a breakthrough among DNA replication enzymes and a potential new target for cancer therapy, *Biomolecules*, **12**, 248, doi: 10.3390/biom12020248.

## REGULATION OF HUMAN DNA PRIMASE-POLYMERASE PrimPol

## Review

E. O. Boldinova<sup>1,2\*</sup> and A. V. Makarova<sup>1,2</sup><sup>1</sup> *Institute of Molecular Genetics, National Research Center “Kurchatov Institute”,  
123182 Moscow, Russia; e-mail: lizaboldinova@yandex.ru*<sup>2</sup> *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

Transmission of genetic information depends on successful completion of DNA replication. Genomic DNA is subjected to damage on a daily basis. DNA lesions create obstacles for DNA polymerases and can lead to replication blockage, DNA break formation, cell cycle disruption and apoptosis. Cells have adapted to DNA damage evolving mechanisms allowing to eliminate lesions prior to DNA replication (DNA repair) and mechanisms which help to bypass lesions during DNA synthesis (DNA damage tolerance). The second group of pathways includes the mechanism of DNA synthesis restart at the damaged sites by DNA primase-polymerase PrimPol. Human PrimPol was first described in 2013. The properties and functions of PrimPol have been extensively studied in recent years, but very little is known about the regulation of PrimPol and the association of the enzyme dysfunction with diseases. The present review is devoted to an analysis of the mechanisms of human PrimPol regulation in the context of DNA replication. The interaction of PrimPol with other proteins is discussed in detail and an attempt is made to compile a possible pathway for the regulation of human PrimPol activity. The paper also addresses the relationship of PrimPol dysfunction with human diseases.

**Keywords:** primase-polymerase PrimPol, DNA synthesis restart, replication, DNA damage

## ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАКРОФАГОВ RAW 264.7

© 2023 С.Б. Парфенюк<sup>1\*</sup>, О.В. Глушкова<sup>1</sup>, М.Г. Шарапов<sup>1</sup>, М.О. Хренов<sup>1</sup>,  
С.М. Лунин<sup>1</sup>, А.А. Кузкова<sup>1</sup>, Э.К. Мубаракшина<sup>1</sup>, Т.В. Новоселова<sup>1</sup>,  
Д.А. Черенков<sup>2</sup>, Е.Г. Новоселова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки ФИЦ ПЦБНИ РАН,  
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: lana\_kras2@rambler.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий,  
394036 Воронеж, Россия

Поступила в редакцию 05.06.2023

После доработки 14.07.2023

Принята к публикации 15.07.2023

Целью работы было изучение действия пероксиредоксина 6 (PRDX6), рекомбинантного белка-антиоксиданта, на уровень провоспалительных ответов, вызванных воздействием эндотоксина на макрофаги RAW 264.7. Добавление липополисахаридов (ЛПС) в среду культивирования клеток RAW 264.7 ожидаемо увеличивало продукцию фактора некроза опухоли-альфа (TNF-α), а добавление PRDX6 привело к достоверному снижению его продукции на 15–20%. Уровень продукции другого провоспалительного цитокина, IL-1β, значительно повышенный эндотоксином, под воздействием PRDX6 полностью нормализовался. Кроме того, добавление PRDX6 снижало продукцию активных форм кислорода, индуцированную эндотоксином, а также препятствовало сверхэкспрессии гена *Nos2* в клетках RAW 264.7. Результаты показали, что PRDX6 оказывает подавляющее действие на экспрессию гена *Nfe2l2* и продукцию фактора транскрипции NRF-2 в течение первых 6 ч культивирования клеток. Добавление эндотоксина вызывает активацию сигнальных каскадов NF-κB и SAPK/JNK, при этом в присутствии PRDX6 происходит снижение активности этих сигнальных каскадов. Известно, что провоспалительный ответ клеток, вызванный бактериальным ЛПС, приводит к активации апоптоза и элиминации повреждённых клеток. Нашими исследованиями это подтверждается, поскольку ЛПС приводит к активации гена *Trp53*, маркера апоптоза. Добавление PRDX6 в первые часы развития острого провоспалительного ответа приводит к подавлению экспрессии гена *Trp53*, что указывает на защитный эффект PRDX6, снижающий апоптоз в макрофагах RAW 264.7.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** пероксиредоксин 6, воспаление, цитокины, экспрессия генов, сигнальные каскады.

**DOI:** 10.31857/S0320972523080092, **EDN:** IKLJLS

### ВВЕДЕНИЕ

Воспаление является универсальной защитной реакцией на любое повреждение ткани, однако важное значение имеет уровень провоспалительного ответа. Известно, что его высокий уровень может вызывать множество критических состояний, включая сепсис, деструктивный панкреатит и другие. Воспалению отводится ключевая роль в патогенезе большинства лёгочных заболеваний, таких как пневмония, деструктивные заболевания лёг-

ких (абсцесс, гангрена), а также хронических неспецифических заболеваний лёгких (хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ), бронхиальная астма и другие) [1]. По этой причине в настоящее время необходимы исследования, направленные на изучение внутриклеточных механизмов развития различных заболеваний, в частности болезней лёгких.

Альвеолярные макрофаги — клетки, играющие центральную роль в воспалении и регулирующие сложные межклеточные взаимодействия. При активации альвеолярных

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ЛПС — липополисахарид; NF-κB — ядерный фактор-κB; PRDX6 — пероксиредоксин 6; TNF-α — фактор некроза опухоли-альфа.

\* Адресат для корреспонденции.



макрофагов реализуются чрезвычайно важные события врождённого иммунитета, в частности, фагоцитоз, презентация антигена Т-лимфоцитам, секреция лизоцима и активных ферментов, активация системы комплемента [2]. Именно поэтому исследование молекулярно-клеточных механизмов активации альвеолярных макрофагов имеет большое значение для понимания механизмов развития воспаления лёгочной ткани.

Воспалительные реакции, вызванные липополисахаридами (ЛПС) грамотрицательных бактерий, характеризуются мощным иммунным ответом с участием Toll-подобных рецепторов (TLR). TLR относятся к семейству паттерн-распознающих рецепторов (PRRs) и осуществляют распознавание молекулярных структур патогенов экзогенных (PAMPs, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) и ряда эндогенных лигандов (DAMPs, ассоциированные с повреждениями молекулярные паттерны – молекулы, которые высвобождаются в ответ на повреждение клеток), обеспечивая быструю реакцию клетки. Среди TLR первым был идентифицирован TLR4, который участвует в распознавании ЛПС. Сигнальный путь TLR4, опосредованный узнаванием внеклеточного эндотоксина, также включает белок миелоидной дифференцировки 2 (MD2) и CD14 [3]. Взаимодействие ЛПС с поверхностными рецепторами макрофагов активирует ядерный фактор-κВ (NF-κB), который участвует в провоспалительном ответе. Известно, что значимую роль в развитии воспаления играют активные формы кислорода (АФК). Несмотря на то что АФК являются важными регуляторными молекулами на всех этапах воспаления, их чрезмерная продукция при несвоевременной или недостаточной работе антиоксидантных систем приводит к переходу воспаления в хроническую стадию, которая, в свою очередь, лежит в основе различных заболеваний [4].

Пероксиредоксин 6 (PRDX6) – представитель 1Cys-пероксиредоксинов, содержащих единственный активный остаток цистеина (Cys47) – был обнаружен во всех клетках млекопитающих, однако его наибольшие количества выявлены в цитоплазме эпителиальных клеток: лёгких, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и ротовой полости, а также в клетках печени и поджелудочной железы [5]. Исследования рекомбинантных белков PRDX6 человека и крысы подтвердили наличие у них как пероксидазной, так и фосфолипазной активности [6]. PRDX6, по-видимому, играет двойную роль в воспалительных забо-

леваниях. С одной стороны, фосфолипазный активный центр (aiPLA2) необходим для активации провоспалительной NADPH-оксидазы. С другой стороны, пероксидазная активность PRDX6 имеет решающее значение для противодействия повышенному образованию АФК и для восстановления окисленных клеточных мембран после окислительного стресса [7]. В настоящее время рецептор PRDX6 достоверно не определён, однако в работе Sharapov et al. [8] показано, что трансмембранный транспорт PRDX6 осуществляется при участии рецептора TLR4. Гомеостаз окислительно-восстановительных реакций жизненно важен для регуляции воспалительных состояний, и нарушение его регуляции может влиять на патогенез воспалительных заболеваний дыхательных путей. Известно, что PRDX6 является важным внутриклеточным ферментом-антиоксидантом, способным к значительной экспрессии в дыхательных путях и лёгких здоровых людей [9]. В настоящее время имеется достаточное количество сведений, которые дают основания полагать, что пероксиредоксины в перспективе будут применяться в терапии заболеваний, патогенез которых связан с окислительным стрессом. К примеру, в ряде работ показана защитная роль пероксиредоксинов при различных патологиях: кожи [10, 11], лёгких [12], глаз [13], нервной системы [14], поджелудочной железы [15].

Исходя из актуальности проблемы, в настоящей работе с использованием линии макрофагоподобных клеток мыши RAW 264.7 были исследованы эффекты PRDX6 при стимулировании клеток ЛПС грамотрицательных бактерий. Концентрация ЛПС 1 мкг/мл используется в мировой практике как приводящая к острому лёгочному воспалению [16]. Добавление ЛПС к макрофагам RAW 264.7 моделирует условия воспаления дыхательных путей, вызванного бактериальной инфекцией, а также может рассматриваться в качестве модели активации макрофагальных клеток при различных неинфекционных поражениях дыхательной системы.

Целью работы было изучение эффектов PRDX6, рекомбинантного белка-антиоксиданта, на уровень провоспалительных ответов, вызванных воздействием эндотоксина на макрофаги RAW 264.7.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование клеток RAW 264.7.** Клетки RAW 264.7 растили в культуральных флаконах

в среде для культивирования, состоящей из смеси RPMI : DMEM («ПанЭко», Россия) в соотношении 1 : 1, с добавлением 10%-ной (v/v) эмбриональной телячьей сыворотки, 2,04 мМ L-глутамина («ПанЭко») и раствора антибиотика-антимикотика («Sigma», США) в концентрации, рекомендованной производителем, при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Пересев (пассаж) клеток производили после достижения плотности монослоя ~80%. В экспериментах использовались клетки после 4–8 пассажей. Жизнеспособность клеток RAW 264.7 оценивалась визуально, с использованием инвертированного микроскопа LEICA DMIL HC («Leica», Германия) с применением окрашивания 0,01%-ным (m/v) раствором трипанового синего («Appli-Chem», Германия) в физиологическом растворе (0,9%-ный (m/v) NaCl) и подсчётом живых клеток в камере Горяева. Количество жизнеспособных макрофагальных клеток составляло 93–97%. Провоспалительный ответ индуцировали ЛПС, выделенным из стенок *Escherichia coli* O55:B5 («Sigma») в концентрации 1 мкг/мл, экзогенный PRDX6 добавляли в концентрации 150 мкг/мл одновременно с индукцией провоспалительных ответов. Ген, кодирующий PRDX6 дикого типа, был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Белок был очищен с помощью металлоаффинной хроматографии (Ni-NTA-агароза) в соответствии с ранее описанной процедурой [17]. Для определения продукции цитокинов клетки снимали с поверхности культурального флакона с помощью скребков для клеток («Corning», США), избавляли от старой среды путём промывания, разводили в свежей среде и рассевали с плотностью 10<sup>6</sup> клеток в 1 мл в 24-луночные планшеты. По истечении 24 ч в каждую лунку добавляли исследуемые вещества в заданной концентрации. Завершив 72-часовую инкубацию, клетки лизировали 3 раза замораживанием-оттаиванием, при этом лизаты использовали немедленно либо хранили при –20 °C. Для определения экспрессии генов и продукции сигнальных и стрессовых белков клетки рассевали в культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> с плотностью 100 × 10<sup>6</sup> клеток на флакон. После прикрепления клеток в течение 24 ч добавляли исследуемые вещества по приведённой выше схеме и инкубировали 6 ч. Далее клетки снимали с поверхности флакона, отмывали от старой среды и разводили в 1 мл физиологического раствора для дальнейшего выделения РНК или белков. В пределах каждого независимого эксперимента характеристики образцов измеряли параллельно в 6–9 повторах, получая среднее

значение. Усреднённые значения по четырём экспериментам использовали для определения достоверности различий между группами (n = 4). В качестве контролей использовали клетки, не подвергавшиеся обработке.

**Определение уровня продукции АФК в клетках.** Уровень генерации АФК в клетках измеряли с помощью диацетилового производного 5,6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (карбокси-H<sub>2</sub>DCFDA, «Invitrogen», США). Карбокси-H<sub>2</sub>DCFDA – химически восстановленный аналог флуоресцеина, который используют в качестве общего индикатора окислительного стресса в клетках. Клетки RAW 264.7 предварительно культивировали в течение 24 ч в 96-луночной планшете (2,5 × 10<sup>4</sup> клеток на лунку) в 100 мкл среды DMEM, промывали PBS и обрабатывали свежеприготовленным раствором карбокси-H<sub>2</sub>DCFDA («Invitrogen») в стерильном ДМСО в конечной концентрации 2,5 мкМ в среде с 2%-ной (v/v) эмбриональной телячьей сывороткой. Далее клетки инкубировали с карбокси-H<sub>2</sub>DCFDA в темноте в течение 1 ч. Одновременно с добавлением карбокси-H<sub>2</sub>DCFDA добавляли ЛПС (1 мкг/мл) и PRDX6 (150 мкг/мл).

В качестве контроля использовали сигнал флуоресценции от необработанных клеток RAW 264.7. Фоновый сигнал культуральной среды вычитали из соответствующих сигналов экспериментальных образцов. Флуоресценцию измеряли с помощью флуоресцентного планшетного ридера Infinite 200 («Tecan», Австрия) при возбуждении длиной волны 480 нм и с длиной волны поглощения 530 нм (аппроксимальное возбуждение флуоресценции (Ex)/испускание (Em) = Ex/Em = 485/535 нм), как описано ранее [18]. Проводили три независимых эксперимента, в каждом из которых было по 3 повтора на каждую экспериментальную группу (n = 9 в каждой группе).

**Определение продукции цитокинов.** Применяли наборы для ИФА для определения мышиного TNF-α, IL-10 и IL-1β («PeproTech», США). Для визуализации связывания использовали зелёный краситель ABTS («Sigma») – 100 мкл, растворённые в 0,05 М цитратном буфере (pH 5,0) с добавлением 0,01%-ного пероксида водорода – и измеряли оптическую плотность при 405 нм с помощью спектрофотометра для микропланшетов (Multiskan EX, «Thermo Electron Corporation», США).

**Ds-Na-ПААГ-электрофорез и иммуноблоттинг.** Для приготовления белковых образцов из клеток RAW 264.7 клеточную суспензию, предварительно отмывтую от культуральной среды 0,9%-ного (m/v) NaCl, подвергали трёх-

кратному замораживанию-оттаиванию. Перед циклами замораживания-оттаивания к суспензии добавляли ингибиторы протеаз и фосфатаз (100×) по рекомендациям производителя («Thermo Fisher Scientific», США). Далее добавляли солюбилизирующий буфер для электрофореза и β-меркаптоэтанол (2–5%), кипятили 5 мин. Концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop2000 («NanoDrop», США), образцы наносились по 10 мкл в каждую лунку с 10%-ным (*m/v*) Ds-Na-ПААГ [19]. Наличие белков в образцах определяли методом Вестерн-блот анализа с использованием наборов следующих антител: кроличьи антитела к общему NF-κB (total-NF-κB) и фосфорилированному по Ser536 (ph-NF-κB (Ser536)), p53, phSAPK/JNK, NRF-2, TLR4, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) («Cell Signaling», США). Для выявления белков использовали систему ECL («GE Healthcare», Швеция). Фотографии полос регистрировали с помощью трансиллюминатора TFX 35.WL («Vilber Lourmat», Франция). Количественную оценку белков после денситометрии проводили с использованием программы Qara (Ver. 3.7). Было проведено по 3 независимых эксперимента (используя клетки от разных пассажей) для каждого белка. Полученные цифровые данные нормировали к соответствующему контролю нагрузки (полосам GAPDH) и выражали в относительных единицах.

**Оценка изменений экспрессии генов.** Экспрессию генов анализировали в клетках RAW 264.7 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. После воздействия исследуемых веществ, а именно экзогенного PRDX6 (150 мкг/мл), ЛПС (1 мкг/мл) или их совместного добавления в среду культивирования клеток через 6 ч инкубации были исследованы гены, кодирующие ряд ферментов антиоксидантного ответа (*Sod3*, *Prdx1*, *Nos2*), апоптоз (*Trp53*), факторы транскрипции (*Nfe2l2*, *Nfkb1*, *Ap1m1*), рецептор (*Tlr4*), цитокин (*Tnfsf18*).

Процедура выделения тотальной РНК, синтеза кДНК и организация ПЦР в режиме реального времени подробно описана нами ранее [20].

**Статистический анализ** проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6.0 («StatSoft», США). Для определения достоверности различий применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Значение *W* во всех случаях было незначимым ( $p > 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время известно, что PRDX6 вносит существенный вклад в защиту органов дыхания от воспаления, вызванного ЛПС. Новоселов в 2012 г. [21] показал увеличение секреции PRDX6 в эпителии трахеи и бронхов сразу после аппликации ЛПС и сохранение высокого уровня секреции на протяжении всего периода воспаления. Между тем внутриклеточные механизмы влияния экзогенного PRDX6 на процесс ЛПС-индуцированной активации альвеолярных макрофагов до сих пор остаются малоизученными.

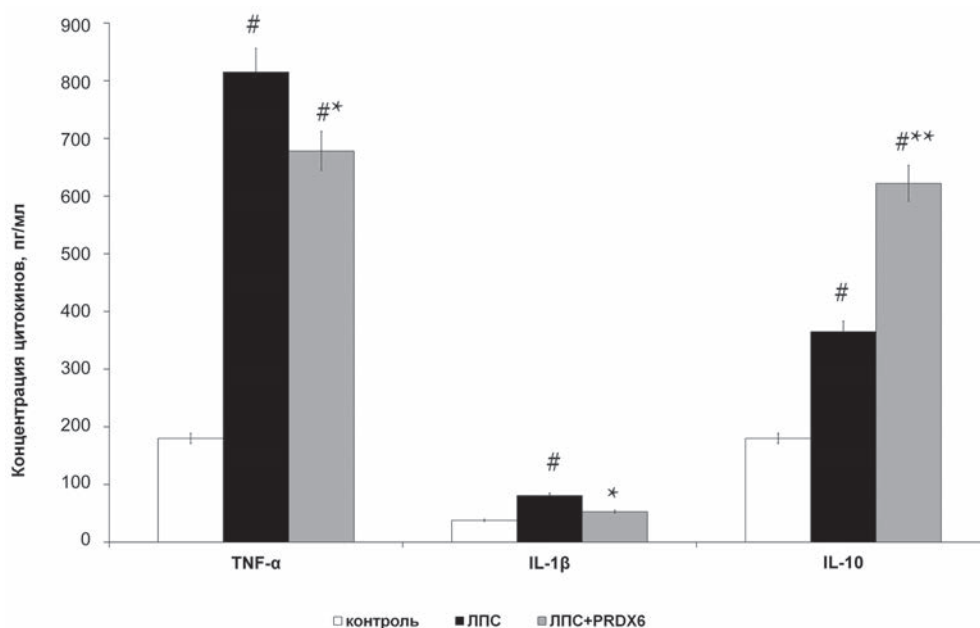
**Влияние PRDX6 на продукцию цитокинов клетками RAW 264.7 при воздействии эндотоксина.** Известно, что в очаге воспаления происходит увеличение пролиферации макрофагов. Это является защитной функцией организма, направленной на борьбу с воспалительными агентами разной природы, в частности бактериальной. С другой стороны, чрезмерное увеличение количества альвеолярных макрофагов в тканях лёгких, вырабатывающих факторы, участвующие в формировании фиброзной ткани, такие как фибронектин, IL-1 и другие, приводит к необратимым повреждениям органа. Необходимо отметить, что стойкое увеличение количества альвеолярных макрофагов лежит в основе формирования хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей за счёт увеличения количества рецепторов IgE, продукции хемоаттрактантов, привлекающих нейтрофилы и лимфоциты, в свою очередь стимулирующие макрофаги [22].

Важным маркером развития провоспалительного ответа является продукция ряда про- и противовоспалительных цитокинов. В работе были измерены уровни продукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF-α и IL-1β, а также продукция противовоспалительного цитокина IL-10 (рис. 1). Параллельно исследовали уровень экспрессии гена *Tnfsf18* на первичном этапе провоспалительного ответа (таблица).

Добавление ЛПС в среду культивирования клеток RAW 264.7 ожидаемо увеличило продукцию TNF-α до 450% от контрольных значений, а добавление PRDX6 привело к незначительному, но достоверному снижению его продукции на 15–20%. Путём исследования уровня экспрессии гена *Tnfsf18* было показано, что экзогенный PRDX6 в первые 6 ч способен удерживать уровень экспрессии данного гена на уровне контроля.

Уровень продукции другого провоспалительного цитокина, IL-1β, значительно активи-





**Рис. 1.** Влияние экзогенного PRDX6 на продукцию цитокинов в макрофагах RAW 264.7. Средние значения ( $\pm$  стандартная ошибка) изменения уровней продукции цитокинов представлены по отношению к уровням в клетках RAW 264.7 в нормальных условиях.  $\# p < 0,05$ , изменения статистически значимы для групп «ЛПС + PRDX6» и «ЛПС» относительно группы «контроль»;  $*** p < 0,01$ ,  $* p < 0,05$ , изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» относительно группы «ЛПС»

вируванный эндотоксином, под воздействием PRDX6 практически возвращается к контрольному значению.

Антивоспалительные цитокины на ранних этапах развития провоспалительного ответа ограничивают повреждение здоровой ткани и обеспечивают баланс между физиологической реакцией и патологическим воспалением. Ключевым антивоспалительным цитокином является IL-10, который противодействует эффекту основных провоспалительных цитокинов. Положительным эффектом в борьбе с воспалением можно считать тот факт, что добавление PRDX6 двукратно увеличивает продукцию IL-10.

Полученные нами данные по увеличению продукции TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-10 подтверждают тот факт, что в условиях воспаления, вызванного воздействием ЛПС, активация макрофагов проходит по так называемому классическому пути с приобретением фенотипа M1 (провоспалительный). Результаты показали, что экзогенный рекомбинантный PRDX6 является перспективным антивоспалительным агентом, способным частично снижать уровень патологических реакций, связанных с чрезмерным уровнем продукции провоспалительных цитокинов.

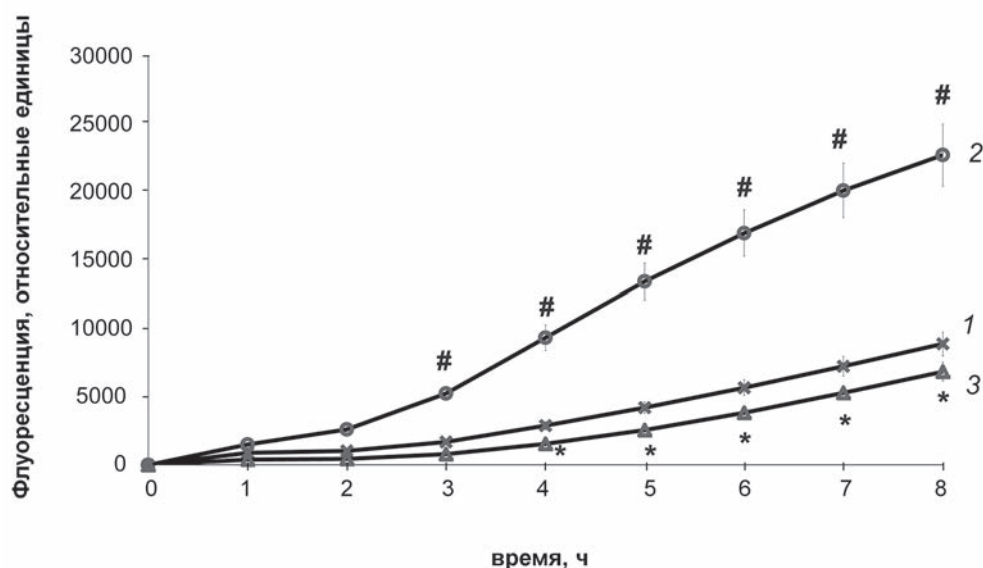
**Влияние PRDX6 на генерацию АФК в клетках RAW 264.7, стимулированных ЛПС.** В условиях воспаления показан высокий уровень АФК, который увеличивается с течением

времени (от 0 до 8 ч). При этом добавление PRDX6 полностью блокирует его увеличение, удерживая концентрацию АФК на уровне таковой для клеток, не подвергающихся никакому воздействию (рис. 2). Таким образом, было установлено, что PRDX6 стабилизирует антиоксидантный статус клетки, нарушенный в условиях провоспалительного ответа макрофагов RAW 264.7, индуцированного ЛПС.

При изучении экспрессии гена *Nos2* было показано, что в условиях воспаления в первые 6 ч PRDX6 препятствует его сверхэкспрессии (таблица).

**Влияние экзогенного PRDX6 на экспрессию генов системы антиоксидантной защиты (*Sod3*, *Prdx1*).** При взаимодействии клеток RAW 264.7 с бактериальным ЛПС происходит активация ферментных систем антиоксидантной защиты. Наблюдается повышение экспрессии генов таких ферментов, как внеклеточная супероксиддисмутаза 3. Этот фермент является участником системы быстрой защиты, и поэтому его максимальная активность проявляется в первые часы развития провоспалительного ответа при резком повышении АФК [23]. Экзогенный PRDX6 препятствует активации экспрессии гена супероксиддисмутазы 3. Вероятно, что PRDX6, добавленный в среду культивирования активированных ЛПС макрофагов, является достаточным для антиоксидантной защиты клетки, защищая её от повреждения и апоптоза, вызванных гиперпродукцией АФК.





**Рис. 2.** Влияние PRDX6 на продукцию АФК клетками RAW 264.7. Средние значения ( $\pm$  стандартная ошибка) изменения уровня флуоресценции карбокси- $H_2DCFDA$  в клетках RAW 264.7. 1 – Нормальные клетки, группа «контроль»; 2 – клетки, стимулированные ЛПС, группа «ЛПС»; 3 – клетки, культивированные в среде с одновременным добавлением ЛПС и PRDX6, группа «ЛПС + PRDX6». #  $p < 0,05$ , изменения статистически значимы для группы «ЛПС» относительно группы «контроль»; \*  $p < 0,05$ , изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» относительно группы «ЛПС»

Это подтверждается и количеством АФК в клетках при добавлении PRDX6, которое не повышается в присутствии ЛПС.

Исследовав экспрессию гена *Prdx1*, мы пришли к выводу, что ЛПС вызывает активацию его экспрессии. Добавление экзогенного PRDX6 снижает активацию экспрессии гена *Prdx1* в первые 6 ч инкубации. Логично пред-

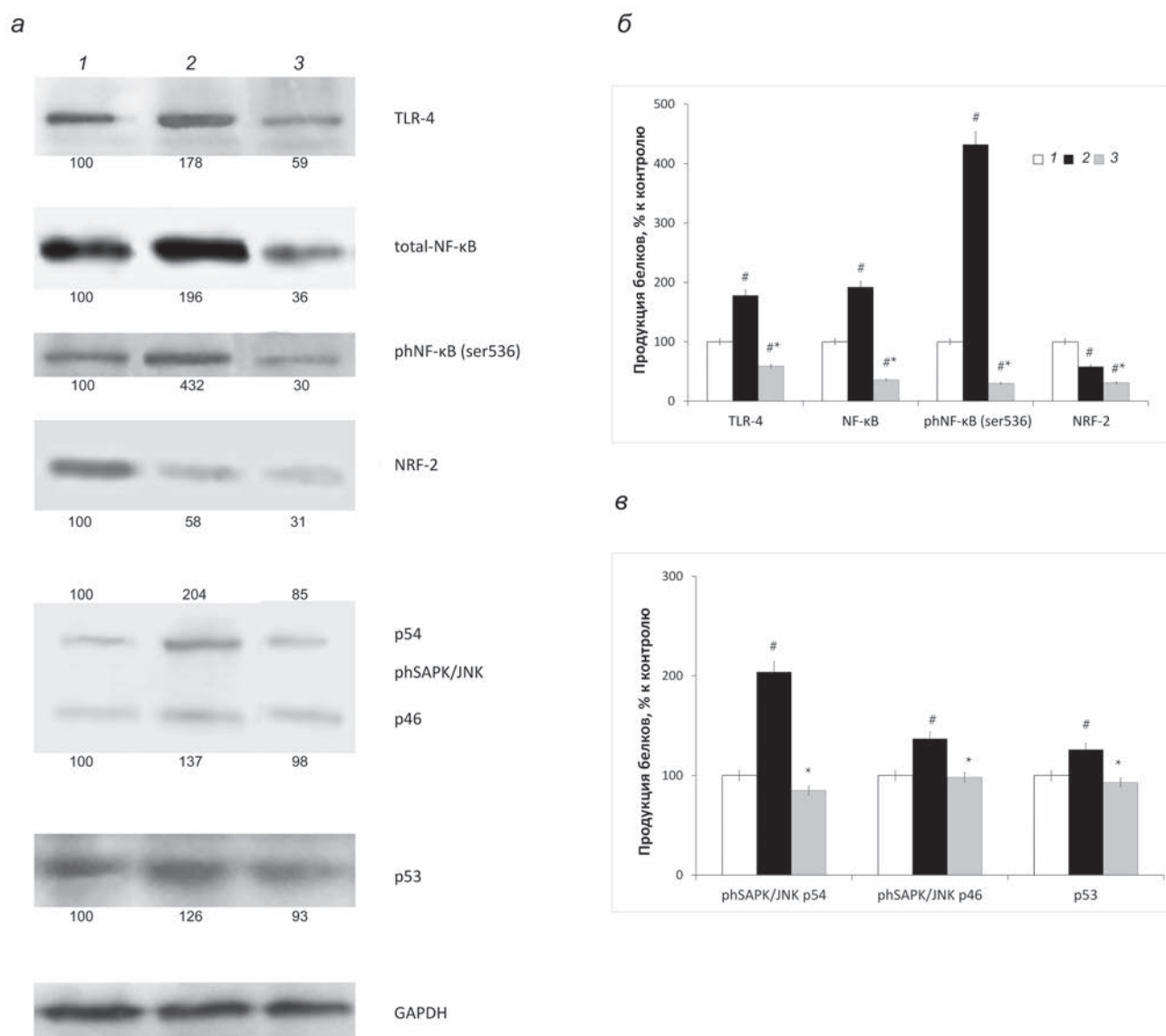
положить, что добавленный в начале культивирования экзогенный PRDX6 используется клетками для защиты от АФК, в свою очередь не позволяя PRDX1 проявить свои провоспалительные свойства (таблица).

**Влияние PRDX6 на внутриклеточную сигнализацию в макрофагах RAW 264.7 при воздействии эндотоксина.** Интересные данные были

Изменение уровня экспрессии (в отн. ед.) некоторых маркерных генов в нормальных и стимулированных эндотоксином клетках RAW 264.7 через 6 ч инкубации с PRDX6

| Гены           | Контроль      | ЛПС                   | ЛПС + PRDX6            |
|----------------|---------------|-----------------------|------------------------|
| <i>Tnfsf18</i> | $1 \pm 0,087$ | $4,95 \pm 0,361^{\#}$ | $1,2 \pm 0,088^{**}$   |
| <i>Nos2</i>    | $1 \pm 0,059$ | $8 \pm 0,688^{\#}$    | $3,6 \pm 0,259^{***}$  |
| <i>Nfxb1</i>   | $1 \pm 0,051$ | $3,7 \pm 0,316^{\#}$  | $0,8 \pm 0,054^{**}$   |
| <i>Tlr4</i>    | $1 \pm 0,095$ | $2,4 \pm 0,195^{\#}$  | $0,25 \pm 0,011^{***}$ |
| <i>Nfe2l2</i>  | $1 \pm 0,072$ | $1,2 \pm 0,086$       | $0,4 \pm 0,024^{**}$   |
| <i>Ap1m1</i>   | $1 \pm 0,058$ | $6,5 \pm 0,498^{\#}$  | $0,25 \pm 0,021^{***}$ |
| <i>Trp53</i>   | $1 \pm 0,089$ | $8,5 \pm 0,615^{\#}$  | $0,2 \pm 0,017^{***}$  |
| <i>Sod3</i>    | $1 \pm 0,062$ | $5,2 \pm 0,337^{\#}$  | $0,3 \pm 0,024^{***}$  |
| <i>Prdx1</i>   | $1 \pm 0,077$ | $2,48 \pm 0,156^{\#}$ | $1,2 \pm 0,121^{*}$    |

Примечание. Средние значения ( $\pm$  стандартная ошибка) изменения уровней экспрессии генов представлены по отношению к уровням в клетках RAW 264.7 в нормальных условиях.  $^{\#} p < 0,05$ , изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» и «ЛПС» относительно группы «контроль»;  $^{**} p < 0,01$ ,  $^{*} p < 0,05$ , изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» относительно группы «ЛПС».



**Рис. 3.** Влияние PRDX6 на продукцию TLR4, NF-κB, phNF-κB (Ser536), NRF-2, phSAPK/JNK, p53 и референсного белка GAPDH. Числовые значения внизу — данные денситометрического анализа, средние значения ( $\pm$  стандартная ошибка) изменения уровней продукции цитокинов представлены по отношению к уровням в клетках RAW 264.7 в нормальных условиях. *а* — Репрезентативные фотографии результатов Вестерн-блот анализа с использованием специфических антител к данным белкам; *б, в* — графическое представление результатов денситометрического измерения количества белка (в % от контроля). Условные обозначения: 1 — нормальные клетки, группа «контроль»; 2 — клетки, стимулированные ЛПС, группа «ЛПС»; 3 — клетки, культивированные в среде с одновременным добавлением ЛПС и PRDX6, группа «ЛПС + PRDX6». Каждое значение — среднее от трёх независимых экспериментов, на рисунке представлены результаты одного из трёх экспериментов. #  $p < 0,05$ , изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» и «ЛПС» относительно группы «контроль»; \*  $p < 0,05$ , изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» относительно группы «ЛПС»

получены при изучении экспрессии гена *Tlr4* рецептора TLR4 (таблица) и непосредственно продукции самого рецептора (рис. 3). Так, было показано, что ЛПС стимулирует экспрессию *Tlr4* (широко известный факт), а экзогенный PRDX6 полностью снимает эту стимуляцию. С использованием Вестерн-блот анализа мы продемонстрировали аналогичные результаты. Так, через 6 ч инкубации с PRDX6 клетки, стимулированные ЛПС, показали резкое снижение продукции TLR4 до 30% от уровня,

характерного для провоспалительного ответа (рис. 3).

ЛПС-Активация рецептора TLR4 приводит к последующей активации сигнального каскада NF-κB. Было установлено значительное увеличение экспрессии гена *Nfkb1* в ответ на присутствие ЛПС. Интересно, что в первые 6 ч добавление PRDX6 удерживает уровень экспрессии гена *Nfkb1* в клетках активированных ЛПС на контрольном уровне (таблица). Результаты Вестерн-блот анализа показали,

что через 6 ч после добавления ЛПС присутствие PRDX6 снижает продукцию как общего, так и фосфорилированного по Ser536 NF- $\kappa$ B до контрольных значений. Известно, что фосфорилирование NF- $\kappa$ B по Ser536 активирует клеточный апоптоз, таким образом, PRDX6 проявляет себя как антиапоптозный агент. Эти результаты свидетельствуют о том, что PRDX6 обладает ингибирующим влиянием на сигнальный каскад NF- $\kappa$ B. Его действие заметно по экспрессии соответствующего гена и продукции как общего, так и фосфорилированного по Ser536 белка (рис. 3).

NRF-2 участвует в сложной регуляторной сети и выполняет плеiotропную роль в регуляции метаболизма, воспаления, аутофагии, протеостаза, митохондриальных, физиологических и иммунных ответов [24]. Интересно, что продукция NRF-2 при действии ЛПС почти в 2 раза ниже, чем в контрольных клетках. Это согласуется с тем, что NRF-2 и NF- $\kappa$ B действуют друг на друга по принципу отрицательной обратной связи. И так как в «классических» условиях воспаления активен каскад NF- $\kappa$ B, то количество NRF-2 в этих условиях уменьшается, при этом наблюдается повышение уровня АФК в клетках, культивированных с ЛПС. Результаты исследования показали, что PRDX6 проявляет подавляющее действие на экспрессию гена *Nfe2l2* и продукцию фактора транскрипции NRF-2 в течение первых 6 ч инкубации. В присутствии PRDX6 не было выявлено описанных для ЛПС регуляторных механизмов между NRF-2 и NF- $\kappa$ B, что может говорить о том, что фермент-антиоксидант так влияет на эти сигнальные каскады, что они теряют свою способность к регулированию по принципу отрицательной обратной связи (рис. 3).

В условиях индукции провоспалительного ответа активен и сигнальный каскад SAPK/JNK. Показано, что при этом продукция pSAPK/JNK гораздо выше контрольного уровня. Обе изоформы p54 и p46 активны через 6 ч инкубации клеток с ЛПС (рис. 3). Добавление PRDX6 полностью снимает активацию данного каскада и приводит продукцию pSAPK/JNK к норме. Сигнальный каскад SAPK/JNK заканчивается активацией гена *Ap1m1*. Нами было показано, что PRDX6, добавленный к активированным ЛПС клеткам, практически полностью ингибирует экспрессию этого транскрипционного фактора (таблица).

Известно, что провоспалительный ответ клеток, вызванный бактериальным ЛПС, приводит к активации апоптоза и элиминации повреждённых клеток. Нашими исследованиями

это подтверждается, поскольку ЛПС приводит к активации гена *Trp53*, маркера апоптоза. Добавление PRDX6 в первые часы развития острого провоспалительного ответа приводит к подавлению экспрессии гена *Trp53* (таблица). Аналогичные эффекты нами показаны с помощью Вестерн-блот анализа. Так, продукция белка p53 в присутствии PRDX6 остаётся на уровне контроля в макрофагах RAW 264.7, стимулированных эндотоксином (рис. 3). Можно предположить, что эффект PRDX6 заключается в том, чтобы не дать в первые часы развиться массовому апоптозу макрофагов, необходимых для местной защиты ткани лёгких, но при «взятии под контроль» воспалительного процесса данный фермент способствует элиминации повреждённых макрофагов, которые уже не могут быть «реанимированы».

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование ряда патологий, сопряжённых с окислительным стрессом, показало, что защитные свойства PRDX6 связаны как с его пероксидазной активностью, так и с его способностью выступать в роли сигнально-регуляторной молекулы [20]. Ранее было показано, что PRDX6 ингибирует воспалительные заболевания путём подавления повреждения, вызванного свободными радикалами и митохондриальной генерацией  $H_2O_2$ , а также препятствует воспалительным заболеваниям посредством активации NF- $\kappa$ B/AP-1 в сочетании с путём JNK [25]. В своей работе, в отличие от предыдущих исследований, мы изучали влияние экзогенного PRDX6, тогда как большинство ранее опубликованных работ было направлено на исследование влияния экспрессии собственного PRDX6. Гиперпродукция провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6, является ключевым фактором в развитии патогенеза многих лёгочных патологий, таких как бронхиальная астма, ХОБЛ, респираторный дистресс-синдром взрослых, идиопатический фиброз лёгких [26]. Поэтому полученные нами данные о том, что добавление PRDX6 снижает продукцию TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , а также увеличивает продукцию противовоспалительного цитокина IL-10 в макрофагальных клетках, стимулированных ЛПС, являются актуальными для дальнейшего исследования противовоспалительных свойств PRDX6. В работе Zhao et al. [27] были исследованы эффекты всех 6 типов перокси-редоксинов и показано, что PRDX1, PRDX2 и PRDX4 обладают выраженным провоспалительным действием на макрофаги RAW 264.7,

тогда как PRDX6 влияет на них незначительно. Работа была проведена с использованием нативных клеток, тогда как в своей работе мы исследовали влияние PRDX6 на макрофаги, активированные бактериальным эндотоксином. Исходя из полученных нами результатов, можно сделать вывод о том, что PRDX6 снижает провоспалительные эффекты эндотоксина на макрофагоподобных клетках RAW 264.7.

Сигнальные пути NF- $\kappa$ B и MAPK регулируют воспаление и иммунные ответы, контролируя экспрессию генов провоспалительных факторов, таких как TNF- $\alpha$  и IL-6. Yuan et al. в 2019 г. показали, что ядерная транслокация фосфорилированного p65, ингибирование киназы I $\kappa$ B (IKK) в сигнальном пути NF- $\kappa$ B и фосфорилирование ERK, JNK и p38 MAPK (т.е. активация сигнального пути MAPK) может контролировать выработку IgE и IL-4 и ингибировать медиаторы воспаления, характерные для бронхиальной астмы [28]. Ранее нами было показано, что PRDX6 активирует каскад NF- $\kappa$ B в фибробластах 3T3 и стабилизирует до контрольного уровня активность данного сигнального каскада при его гиперактивации в условиях воздействия ионизирующего излучения [29]. В настоящей работе мы подтвердили способность PRDX6 выступать в роли регуляторной молекулы, показав его способность снижать гиперактивацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B при развитии провоспалительного ответа, вызванного ЛПС.

Zhang et al. [30] показали, что нокдаун TLR4 приводит к блокировке выработки АФК, ингибированию экспрессии p53 и каспазы-3. В своей статье авторы предполагают, что TLR4 является перспективной мишенью для профилактики и лечения заболеваний, связанных с апоптозом, в частности атеросклероза. Наши результаты, полученные при исследовании экспрессии и продукции TLR4, показали, что экзогенное влияние PRDX6 на активированные ЛПС макрофаги приводит к блокировке данного рецептора и всех нижележащих сигнальных путей, что в конечном итоге приводит к ингибированию апоптоза, вероятно, через ингибирование экспрессии p53.

Оксид азота, синтезируемый из L-аргинина с помощью NO-синтаз, представляет собой небольшую липофильную диффундирующую высокореактивную молекулу с дихотомической регуляторной ролью во многих биологических событиях в физиологических и патологических условиях [31]. NO может способствовать апоптозу в одних клетках и ингибировать апоптоз в других.

Местная клеточная среда играет решающую роль в характере этих видов регуляции [32]. Высокая продукция NO действует как проапоптотический модулятор, активируя протеазы семейства каспаз через высвобождение митохондриального цитохрома c в цитозоль, повышенную регуляцию белка p53, активацию сигнального пути SAPK/JNK, изменяя экспрессию апоптоз-ассоциированных белков семейства Bcl-2. Тем не менее, низкие или физиологические концентрации NO препятствуют апоптозу клеток, вызванному Fas и цитокинами. Антиапоптотический механизм связан с транскрипцией генов защитных белков (Bcl-2, циклооксигеназа-2) и прямым ингибированием эффекторных каспаз путём S-нитрозилирования тиоловой группы цистеина в их каталитическом сайте. Dubey et al. [33] доказали решающую роль индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в апоптозе нейтрофилов посредством усиленного генерирования АФК и опосредованной каспазой-8 активации пути гибели митохондрий. В своей работе мы показали, что экзогенный PRDX6 препятствует гиперэкспрессии гена *Nos2* и повышению концентрации АФК в макрофагах, что, в конечном счёте, оказывает влияние на апоптоз. Подавление экспрессии гена *Trp53* экзогенным PRDX6 подтверждает его антиапоптотический эффект на клетки RAW 264.7, активированные эндотоксином.

Таким образом, настоящая работа дополняет наши более ранние исследования и выдвинутое предположение о том, что экзогенный PRDX6 выступает в роли регуляторной молекулы. В частности, PRDX6 является противовоспалительным агентом, способным защитить активированные ЛПС макрофаги RAW 264.7 от чрезмерного провоспалительного ответа и не допустить развития патологических состояний, вызванных хроническим воспалением лёгких.

**Вклад авторов.** С.Б. Парфенюк, Е.Г. Новоселова — концепция и руководство работой; С.Б. Парфенюк, О.В. Глушкова, М.Г. Шарапов, М.О. Хренов, Э.К. Мубаракшина, Т.В. Новоселова, А.А. Кузекова — проведение экспериментов; С.Б. Парфенюк, Е.Г. Новоселова, С.М. Лунин, О.В. Глушкова — обсуждение результатов исследования; С.Б. Парфенюк, Е.Г. Новоселова — написание текста; С.М. Лунин, Д.А. Черенков, О.В. Глушкова, М.Г. Шарапов — редактирование текста статьи.

**Благодарности.** В работе использовали оборудование (планшет-ридер Infinite 200 («Tecan»)) центра коллективного пользования Пущинского научного центра.



**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00041.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barnes, P. J. (2017) Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD, *Clin. Sci. (Lond)*, **13**, 1541-1558, doi: 10.1042/CS20160487.
- Joshi, N., Walter, J. M., and Misharin, A. V. (2018) Alveolar macrophages, *Cell Immunol.*, **330**, 86-90, doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.005.
- Lu, X. J., Ning, Y. J., Liu, H., Nie, L., and Chen, J. (2018) A novel lipopolysaccharide recognition mechanism mediated by internalization in teleost macrophages, *Front. Immunol.*, **9**, 2758, doi: 10.3389/fimmu.2018.02758.
- Челомбитько М. А. (2018) Роль активных форм кислорода в воспалении, *Вестн. Моск. Унив.*, **73**, 242-246.
- Sharapov, M. G., Ravin, V. K., and Novoselov, V. I. (2014) Peroxyredoxins as multifunctional enzymes, *Mol. Biol. (Mosk)*, **48**, 600-628, doi: 10.1134/S0026893314040128.
- Hanschmann, E. M., Godoy, J. R., Berndt, C., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2013) Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins – molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling, *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 1539-1605, doi: 10.1089/ars.2012.4599.
- Arevalo, J. A., and Vázquez-Medina, J. P. (2018) The role of peroxiredoxin 6 in cell signaling, *Antioxidants (Basel)*, **7**, 172, doi: 10.3390/antiox7120172.
- Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Parfenyuk, S. B., Glushkova, O. V., and Novoselov, V. I. (2022) The role of phospholipase activity of peroxiredoxin 6 in its transmembrane transport and protective properties, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 152-165, doi: 10.3390/ijms232315265.
- Chuchalin, A. G., Novoselov, V. I., Shifrina, O. N., Soodaeva, S. K., Yanin, V. A., et al. (2003) Peroxiredoxin VI in human respiratory system, *Respir. Med.*, **97**, 147-151, doi: 10.1053/rmed.2003.1429.
- Kümin, A., Huber, C., Rüllicke, T., Wolf, E., and Werner, S. (2006) Peroxiredoxin 6 is a potent cytoprotective enzyme in the epidermis, *Am. J. Pathol.*, **169**, 1194-1205, doi: 10.2353/ajpath.2006.060119.
- Kümin, A., Schäfer, M., Epp, N., Bugnon, P., Born-Berclaz, C., et al. (2007) Peroxiredoxin 6 is required for blood vessel integrity in wounded skin, *J. Cell. Biol.*, **179**, 747-760, doi: 10.1083/jcb.200706090.
- Sundar, I. K., Chung, S., Hwang, J. W., Arunachalam, G., Cook, S., et al. (2010) Peroxiredoxin 6 differentially regulates acute and chronic cigarette smoke-mediated lung inflammatory response and injury, *Exp. Lung Res.*, **36**, 451-462, doi: 10.3109/01902141003754128.
- Fisher, A. B. (2011) Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A<sub>2</sub> activities, *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 831-844, doi: 10.1089/ars.2010.3412.
- Power, J. H., Asad, S., Chataway, T. K., Chegini, F., Manavis, J., et al. (2008) Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology, *Acta Neuropathol.*, **115**, 611-622, doi: 10.1007/s00401-008-0373-3.
- Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Khrenov, M. O., Lunin, S. M., et al. (2019) Protective effect of peroxiredoxin 6 against toxic effects of glucose and cytokines in pancreatic RIN-m5F  $\beta$ -cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 637-643, doi: 10.1134/S0006297919060063.
- Chen, S., Hu, Y., Zhang, J., and Zhang, P. (2021) Anti-inflammatory effect of salusin $\beta$  knockdown on LPS-activated alveolar macrophages via NF- $\kappa$ B inhibition and HO-1 activation, *Mol. Med. Rep.*, **23**, 127, doi: 10.3892/mmr.2020.11766.
- Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., and Ravin, V. K. (2009) Cloning, expression and comparative analysis of peroxiredoxine 6 from different species, *Mol. Biol. (Mosk)*, **43**, 505-511, doi: 10.1134/s0026893309030194.
- Wu, D., and Yotnda, P. (2011) Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers, *J. Vis. Exp.*, **57**, 3357, doi: 10.3791/3357.
- Glushkova, O. V., Khrenov, M. O., Novoselova, T. V., Lunin, S. M., Parfenyuk, S. B., et al. (2015) The role of the NF- $\kappa$ B, SAPK/JNK, and TLR4 signalling pathways in the responses of RAW 264.7 cells to extremely low intensity microwaves, *Int. J. Radiat. Biol.*, **91**, 321-328, doi: 10.3109/09553002.2014.996261.
- Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., and Gudkov, S. V. (2019) Radioprotective role of peroxiredoxin 6, *Antioxidants (Basel)*, **8**, 15, doi: 10.3390/antiox8010015.
- Новоселов В. И. (2012) Роль пероксиредоксинов при окислительном стрессе в органах дыхания, *Пульмонология*, 83-87.
- Ross, E. A., Devitt, A., and Johnson, J. R. (2021) Macrophages: the good, the bad, and the gluttony, *Front. Immunol.*, **12**, 708186, doi: 10.3389/fimmu.2021.708186.

23. Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases, *Antioxid. Redox. Signal.*, **15**, 1583-1606, doi: 10.1089/ars.2011.3999.
24. Zhang, X., Yu, Y., Lei, H., Cai, Y., Shen, J., et al. (2020) The Nrf-2/HO-1 signaling axis: a ray of hope in cardiovascular diseases, *Cardiol. Res. Pract.*, **30**, 5695-5723, doi: 10.1155/2020/5695723.
25. Park, M. H., Jo, M., Kim, Y. R., Lee, C. K., and Hong, J. T. (2016) Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases, *Pharmacol. Ther.*, **163**, 1-23, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.018.
26. Webster, J. M., Kempen, L. J. A. P., Hardy, R. S., and Langen, R. C. J. (2020) Inflammation and skeletal muscle wasting during cachexia, *Front. Physiol.*, **11**, 597-675, doi: 10.3389/fphys.2020.597675.
27. Zhao, L. X., Du, J. R., Zhou, H. J., Liu, D. L., Gu, M. X., et al. (2016) Differences in proinflammatory property of six subtypes of peroxiredoxins and anti-inflammatory effect of ligustilide in macrophages, *PLoS One*, **11**, e0164586, doi: 10.1371/journal.pone.0164586.
28. Yuan, F., Liu, R., Hu, M., Rong, X., Bai, L., et al. (2019) JAX2, an ethanol extract of *Hyssopus cuspidatus* Boriss, can prevent bronchial asthma by inhibiting MAPK/NF- $\kappa$ B inflammatory signaling, *Phytomedicine*, **57**, 305-314, doi: 10.1016/j.phymed.2018.12.043.
29. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., et al. (2021) The role of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling in the radioprotective effects of exogenous PRDX6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **15**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
30. Zhang, Y., Xia, G., Zhang, Y., Liu, J., Liu, X., et al. (2017) Palmitate induces VSMC apoptosis via toll like receptor (TLR)4/ROS/p53 pathway, *Atherosclerosis*, **263**, 74-81, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.002.
31. Duran, X., Vilahur, G., and Badimon, L. (2009) Exogenous *in vivo* NO-donor treatment preserves p53 levels and protects vascular cells from apoptosis, *Atherosclerosis*, **205**, 101-106, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.11.016.
32. Lee, M., Rey, K., Besler, K., Wang, C., and Choy, J. (2017) Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase, *Results. Probl. Cell Differ.*, **62**, 181-207, doi: 10.1007/978-3-319-54090-0\_8.
33. Dubey, M., Nagarkoti, S., Awasthi, D., Singh, A. K., Chandra, T., et al. (2016) Nitric oxide-mediated apoptosis of neutrophils through caspase-8 and caspase-3-dependent mechanism, *Cell Death Dis.*, **7**, e2348, doi: 10.1038/cddis.2016.248.

## PROTECTIVE EFFECTS OF PEROXIREDOXIN 6 IN MODELING PROINFLAMMATORY RESPONSE USING RAW 264.7 MACROPHAGES

S. B. Parfenyuk<sup>1\*</sup>, O. V. Glushkova<sup>1</sup>, M. G. Sharapov<sup>1</sup>, M. O. Khrenov<sup>1</sup>,  
S. M. Lunin<sup>1</sup>, A. A. Kuzekova<sup>1</sup>, E. K. Mubarakshina<sup>1</sup>, T. V. Novoselova<sup>1</sup>,  
D. A. Cherenkov<sup>2</sup>, and E. G. Novoselova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences,  
Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences,  
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: lana\_kras2@rambler.ru

<sup>2</sup> Voronezh State University of Engineering Technologies, 394036 Voronezh, Russia

The aim of the work was to study the effects of peroxiredoxin 6 (PRDX6), a recombinant antioxidant protein, on the level of proinflammatory responses caused by endotoxin exposure to RAW 264.7 macrophages. The addition of LPS to the RAW 264.7 cell culture medium expectedly increased the production of TNF- $\alpha$ , and the addition of PRDX6 led to a significant decrease in its production by 15-20%. The level of production of another proinflammatory cytokine, IL-1 $\beta$ , significantly activated by endotoxin, was completely normalized under the PRDX6 action. In addition, the addition of PRDX6 reduced the production of reactive oxygen species (ROS) induced by endotoxin and also prevented overexpression of the *iNos* gene in RAW 264.7 cells. The results showed that PRDX6 has a suppressive effect on the expression of the *Nfe2l2* gene and the production of the transcription factor NRF-2 during the first 6 h of cell culture. The addition of endotoxin causes the activation of the NF- $\kappa$ B and SAPK/JNK signaling cascades, while in the presence of PRDX6, the activity of these signaling cascades decreases. It is known that the proinflammatory response of cells caused by bacterial LPS leads to the activation of apoptosis and the elimination of damaged cells. Our studies confirm this, since LPS leads to the activation of the *Trp53* gene, a marker of apoptosis. The addition of peroxiredoxin 6 in the first hours of the development of an acute proinflammatory response leads to the suppression of *Trp53* gene expression, which indicates a protective effect of PRDX6 that reduces apoptosis in RAW 264.7 macrophages.

**Keywords:** peroxiredoxin 6, inflammation, cytokines, gene expression, signaling cascades

УДК 577.112.7;577.113.7;577.22

## КОМПЛЕКСЫ И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АССОЦИАТЫ ДОДЕЦИЛ-СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

© 2023 А.С. Павлова\*, В.В. Илющенко, М.С. Купрюшкин, Т.Д. Жарков, Е.С. Дюдеева,  
И.А. Бауэр, А.С. Чубаров, Д.В. Пышный, И.А. Пышная\*

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

Поступила в редакцию 26.04.2023

После доработки 26.06.2023

Принята к публикации 04.07.2023

Сывороточный альбумин, имеющий в своей молекуле несколько сайтов связывания различных соединений, в том числе липофильных олигонуклеотидных производных, является объектом биомедицинских исследований как перспективная платформа для создания многокомпонентных самоорганизующихся систем. В данной работе мы исследовали методом задержки в геле стехиометрию связывания бычьего сывороточного альбумина и сывороточного альбумина человека с додецил-содержащими олигонуклеотидами. Результаты исследования свидетельствуют об образовании в условиях, близких к физиологическим, комплексов со стехиометрией альбумин : олигонуклеотидное производное, равной 1 : (1,25 ± 0,25). Методом атомно-силовой микроскопии показано, что результатом взаимодействия сывороточного альбумина человека с дуплексом комплементарных додецил-содержащих олигонуклеотидов являются высокомолекулярные ассоциаты округлой формы диаметром 165,5 ± 94,3 нм и высотой 28,9 ± 16,9 нм, а с комплексами полиадениловой кислоты и додецил-содержащего олиготимидилата — супрамолекулярные ассоциаты размером 315,4 ± 70,9 и 188,3 ± 43,7 нм. Полученные данные позволяют рассматривать додецил-содержащие олигонуклеотиды и альбумин как перспективные составляющие для разработки самоорганизующихся систем для решения задач молекулярной биологии и биомедицины, в частности, создания уникальных тераностиков направленного действия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** сывороточный альбумин, додецил-содержащие олигонуклеотиды, белково-нуклеиновые комплексы, самоорганизация биополимеров, супрамолекулярные ассоциаты, доставка нуклеиновых кислот.

DOI: 10.31857/S0320972523080109, EDN: IKOTTQ

### ВВЕДЕНИЕ

Терапевтические нуклеиновые кислоты (тНК), их синтетические аналоги и наноконструкции на их основе являются в настоящее время объектами исследований для решения различных задач в областях персонализированной медицины и тераностики [1–4]. Восемнадцать лекарственных препаратов на основе тНК получили разрешение на применение в терапии различных заболеваний человека и более 100 находятся на разных этапах доклинических испытаний [3, 5–7]. Одним из важных

факторов, сдерживающих потенциал применения тНК *in vivo*, является проблема их направленной доставки к внутриклеточным мишеням [1–2]. Помимо этого, существуют другие сложности в применении тНК, связанные с такими аспектами, как быстрая деградация тНК под действием внеклеточных и внутриклеточных ферментов, выведение тНК из организма, плохая способность тНК к преодолению барьеров ретикулоэндотелиальной системы, низкая эффективность проникновения тНК внутрь клеток и выхода из эндосом [3, 8–10]. Имеющиеся достижения в области разработки

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия; БСА — бычий сывороточный альбумин; ДСО — додецил-содержащий олигонуклеотид; ЖК — жирные кислоты; НК — нуклеиновые кислоты; тНК — терапевтические НК; поли(dA) — полиадениловая кислота; СА — сывороточный альбумин; ЧСА — сывороточный альбумин человека; ЧСА<sub>м</sub> — очищенная мономерная фракция ЧСА; экв. — эквивалент; FAM — остаток флуоресцентного красителя 6-карбоксифлуоресцеина.

\* Адресат для корреспонденции.

синтетических (модифицированных) аналогов тНК позволили существенно нивелировать их деградацию [2, 8, 11–17]. Поэтому в настоящее время особое внимание уделяют изучению влияния модификаций тНК-конструкций на их взаимодействие с белками и другими компонентами как крови, так и внутриклеточными, поскольку это может прямым или косвенным образом отразиться как на доставке тНК, так и на эффективности оказываемого тНК биологического эффекта в организме [1, 8, 18–23]. Присоединение гидрофобных остатков к тНК, в частности, холестерина, жирных кислот (ЖК) и липидов, а также других алкилсодержащих группировок, способствует повышению эффективности проникновения таких производных тНК через мембрану внутрь клеток, а также улучшению их фармакокинетических характеристик *in vivo* [8, 10, 24–29]. Среди данных остатков особый интерес представляют группировки, имеющие повышенное сродство к связыванию с сывороточным альбумином (СА) [20, 25, 30–32]. СА, основной белковый компонент сыворотки крови, за счёт низкой иммуногенности, продолжительного времени полужизни, способности накапливаться в тканях, подверженных онкотрансформации и воспалению, а также наличию в своей структуре сайтов связывания различных лигандов, является объектом многочисленных исследований в мире, направленных на разработку систем доставки широкого спектра терапевтических и диагностических средств [33–38]. В свою очередь, связывание СА с олигонуклеотидами и их производными рассматривается как один из способов для создания тНК-содержащих конструкций с целью увеличения их времени циркуляции, повышения биодоступности и стабильности, снижения иммуногенности и, как следствие, уменьшения вероятности неспецифических побочных эффектов и улучшения эффективности действия [20, 30–32]. Вследствие эффекта повышенной проницаемости и удерживания (enhanced permeability and retention, EPR-эффект), характерного для опухоли и её окружения, а также наличия специфических к СА рецепторов, количество которых повышено в некоторых видах рака [37–40], ожидается, что создание альбумин-связанных конструкций будет способствовать улучшению накопления терапевтических средств в тканях опухоли *in vivo*.

Помимо относительно простых конструкций с присоединением липофильных остатков к тНК, актуально направление по созданию самоорганизующихся (и, как правило, определённым образом упорядоченных) систем с

использованием элементов НК-архитектоники [41–45]. Несомненным преимуществом таких сложноорганизованных систем доставки является возможность включения в их состав нескольких, в том числе направляющих, терапевтических либо диагностических, а также стимул-чувствительных компонентов [45–49].

Ранее было показано, что производные олигонуклеотидов, содержащие 3 додецильных остатка в составе ненуклеотидного блока в своей структуре, способны эффективно проникать *in vitro* в клетки аденокарциномы лёгкого А549 и эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека в отсутствие трансфецирующих агентов [50]. Инкубирование додецил-содержащих олигонуклеотидов (ДСО) в присутствии почти 2-кратного избытка бычьего сывороточного альбумина (БСА) приводит к формированию белково-нуклеиновых комплексов [51]. Однако известно, что молекула СА содержит как минимум 7 сайтов связывания остатков жирных кислот, транспорт которых белок осуществляет в организме [52–54].

В данной работе методом задержки в геле мы исследовали связывание БСА и сывороточного альбумина человека (ЧСА) с олигонуклеотидными производными, содержащими 1, 2 или 3 додецильных остатка. Отдельное внимание было уделено оценке возможности комплементарного взаимодействия олигонуклеотидов в составе комплексов НК–белок. Получено, что ДСО с тремя додецильными остатками формируют с альбумином стабильные в условиях электрофореза комплексы, стехиометрия образования которых в эквивалентах (экв.) белок:ДСО составила 1 : (1,25 ± 0,25). Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) была изучена морфология ассоциатов в образцах ЧСА с комплементарными ДСО и ЧСА с полиадениловой кислотой (поли(dA)) и олиготимидилатным ДСО (далее: высокомолекулярных или супрамолекулярных ассоциатов соответственно). Зафиксировано наличие высокомолекулярных ассоциатов ЧСА с дуплексом комплементарных ДСО округлой формы диаметром 165,5 ± 94,3 нм и высотой 28,9 ± 16,9 нм, а также двух популяций супрамолекулярных ассоциатов ЧСА с поли(dA) и олиготимидилатным ДСО размером 315,4 ± 70,9 и 188,3 ± 43,7 нм соответственно.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** Акриламид («AppliChem GmbH», Германия); бис-акриламид, Кумасси бриллиантовый голубой G-250 («Amresco», США);



ксиленцианоловый голубой, бычий сывороточный альбумин (A7030), натриевая соль поли(2'-дезоксикадениловой кислоты (81342), 1 М  $\text{MgCl}_2$  («Sigma», США); сывороточный альбумин человека (фракция V; «Reanal», Венгрия); для выделения мономера использовали ЧСА (P06-26050, «PAN Biotech UK Ltd», Великобритания); ацетон (о.с.ч.) («Реахим», Россия);  $\text{LiClO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (98–99,85%, «Acros Organics», США); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Bio-Rad Laboratories», США); Tris («Fisher Scientific», США);  $\text{AcOH}$  (ледяная); деионизованная  $\text{H}_2\text{O}$  18 М $\Omega$ , полученная в системе очистки Simplicity 185 («Millipore», США).

**Состав буферных растворов.** В работе использовали следующие буферные растворы: TAN – 100 мМ  $\text{NaCl}$ , 50 мМ Tris-Ac (pH 7,5); TAM – 15 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 50 мМ Tris-Ac (pH 7,5). Все растворы фильтровали через 0,22 мкм шприцевые фильтры Millipore Syringe Filter units («Merck», Германия).

**Синтез олигонуклеотидных производных с остатками додецил-содержащего ненуклеотидного мономерного звена D и флуоресцентного красителя 6-карбоксифлуоресцеина (FAM)** проводили твердофазным амидофосфитным методом на автоматическом НК-синтезаторе АСМ-800 («Биоссет», Россия) с использованием реагентов и протоколов, в том числе постсинтетической очистки, описанных ранее [50–51, 55].

**Концентрации растворов ДСО, СА и поли(dA)** определяли по измерению поглощения (A) при комнатной температуре с использованием спектрофотометра NanoVue™ («GE Healthcare», США). Молярные коэффициенты поглощения  $\epsilon_{260}$  ДСО рассчитывали, используя значения  $\epsilon_{260}$  для моно- и динуклеотидов, приведённые в работе Dunn и Hall [56],  $\epsilon_{260}$  остатка FAM считали равным 20 900  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Glen Research Technical Bulletin; «Glen Research», США). Молярные коэффициенты поглощения ДСО полагали равными сумме  $\epsilon_{260}$  соответствующего олигонуклеотида и остатка FAM, вклад ненуклеотидного додецил-содержащего звена в суммарную величину  $\epsilon_{260}$  ДСО не учитывали. Значения  $\epsilon_{280}$  альбуминов использовали: 43 824  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  – для БСА и 37 000  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  – для ЧСА [57]. Значение концентрации поли(dA) рассчитывали, полагая  $\epsilon_{260}$  аденина равным 12 300  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

**Мономерная фракция сывороточного альбумина человека** была выделена, как описано в работе Chubarov et al. [58].

**Формирование комплексов альбумин-ДСО** проводили в растворе TAN (для анализа методом задержки в геле) либо TAM (для АСМ).

Стоковые растворы СА, ДСО и поли(dA) разбавляли до указанных концентраций, соответствующих соотношению смешивания СА : ДСО в экв. За 1 экв. принимали количество молей СА при указанной концентрации и конечном объёме проб 20 мкл. При смешивании комплементарных нуклеотидных последовательностей и СА для анализа методом задержки в ПААГ пробы готовили двумя способами. В первом случае сперва добавляли НК-компоненты, инкубировали (3 мин 95 °C), охлаждали до 37 °C, затем добавляли альбумин. Во втором случае сперва готовили комплексы альбумина с одним из ДСО, смешивая в одной пробирке белок с ДСО 3R, а в другой – белок с 3L, отдельно инкубировали их 30 мин при 37 °C, а затем объединяли в одну пробирку. При приготовлении образцов для исследования методом АСМ сперва смешивали НК-компоненты, инкубировали (3 мин 95 °C), охлаждали до 37 °C, затем добавляли альбумин.

**Исследование методом задержки в 8%-ном нативном ПААГ** (акриламид : бисакриламид = 29 : 1) проводили с использованием камеры Owl™ Dual-Gel Vertical Electrophoresis System P10DS («Owl separation Systems Inc.», США) при термостатировании системы с помощью циркуляционного термостата F12 («Julabo Inc.», США). Приготовленные, как описано выше, пробы инкубировали 30 мин при 37 °C без перемешивания, затем добавляли 5 мкл водного раствора 30% (v/v) глицерина с 0,05% (w/v) ксиленцианоловым голубым, и 5 мкл из каждой пробы наносили на ПААГ. Относительную подвижность проб анализировали при постоянной мощности 6 Вт и термостатировании камеры для электрофореза при 37 °C. Документирование результатов анализа проводили с помощью сканирования гелей ( $E_x/E_m = 488/530$  нм) с использованием системы VersaDoc™ MP 4000 Molecular Imager® System («Bio-Rad Laboratories», США; (ОЦПМИ) ИХБФМ СО РАН). Интенсивность флуоресценции от полос образцов на электрофореграммах оценивали с помощью программного пакета GelPro 4.0 («Media Cybernetics L.P.», США). Выход кривых на плато определяли с помощью аппроксимации данных методом нелинейной фильтрации в программном обеспечении Origin® («OriginLab», США).

**Исследование методом АСМ** проводили с использованием сканирующего зондового микроскопа MultiMode 8™ («Bruker», США), подключённого к контроллеру NanoScope® V («Veeco», США). Приготовленные, как описано выше, пробы инкубировали 15 ч при 15 °C

без перемешивания, затем 7 мкл каждой пробы наносили на свежеосколотую поверхность слюды площадью  $1 \times 1 \text{ см}^2$ , спустя 1 мин промывали 3 раза по 1 мл  $\text{H}_2\text{O}$  18 МΩ, сушили в токе аргона и исследовали методом АСМ. Остатки проб хранили при 4 °С, и дальнейшее разбавление проводили буферным раствором ТАМ такой же температуры. Изображения поверхности получали в режиме полуконтактной моды Soft tapping микроскопа в атмосферных условиях с помощью алмазоподобного кантилевера NSG10\_DLC («NT-MDT Spectrum Instruments», Россия), имеющего параметры радиуса кривизны — 1–3 нм, резонансной частоты — 190–325 кГц и силовой постоянной — 5,5–22,5 Н/м. Полученные изображения обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения Nanoscope Analysis 1.40 («Bruker»).

**Статистическая значимость полученных данных.** Приведённые в работе электрофореграммы и изображения АСМ исследованных образцов являются результатами одного типичного эксперимента из серии не менее трёх аналогичных. Размерные характеристики комплексов ЧСА с ДСО и с поли(dA) на изображениях АСМ определяли с помощью функций Section и Particle analysis, производя анализ не менее трёх типичных изображений одинакового масштаба из разных мест поверхности слюды с нанесённым образцом. Результат приведён в виде среднего значения и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на модельной системе, состоящей из серий олигонуклеотидных производных гомотимидилатного (1Т, 2Т, 3Т) и гетеронуклеотидного состава (1N, 2N, 3N), имеющих на 5'-конце остаток 6-карбоксифлуоресцеина и разное число (1–3) последовательно расположенных остатков додецил-содержащего нуклеотидного звена **D** (рис. 1).

**Исследование связывания додецил-содержащих олигонуклеотидов с сывороточными альбуминами методом задержки в геле.** Для оценки стехиометрии образования комплексов альбумин–ДСО анализировали степень ассоциации олигонуклеотидных производных с белком в зависимости от соотношения СА:ДСО. Для этого провели серию экспериментов, добавляя к 0,1 нмоль альбумина (1 экв.) ДСО, количество которого варьировали от 0,5 до 3 экв. по отношению к белку. Электрофоретическая подвижность не связанного с белком ДСО значительно выше, чем подвижность СА. Поэтому при добавлении альбумина к ДСО на электрофореграмме можно наблюдать появление ДСО-содержащих полос с более низкой подвижностью в ПААГ, соответствующих образованию альбумин-олигонуклеотидных комплексов СА••ДСО (здесь и далее знак •• будет обозначать связывание СА с ДСО) [51]. Область подвижности данных комплексов далее на представленных электрофореграммах обозначена красной квадратной скобкой,

Обозначение      Нуклеотидная последовательность 5'→3'

Контрольный олигонуклеотид:

0Т                      FAM-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Додецил-содержащие производные:

1Т                      FAM-D-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

2Т                      FAM-DD-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

3Т                      FAM-DDD-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

1N                      FAM-D-GGTAGCAAGTCGAGACT

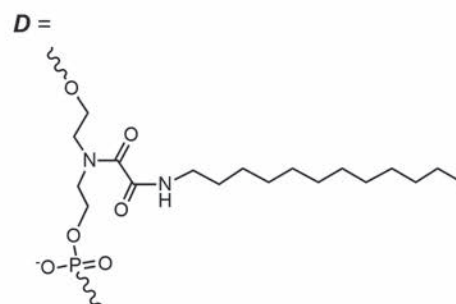
2N                      FAM-DD-GGTAGCAAGTCGAGACT

3N                      FAM-DDD-GGTAGCAAGTCGAGACT

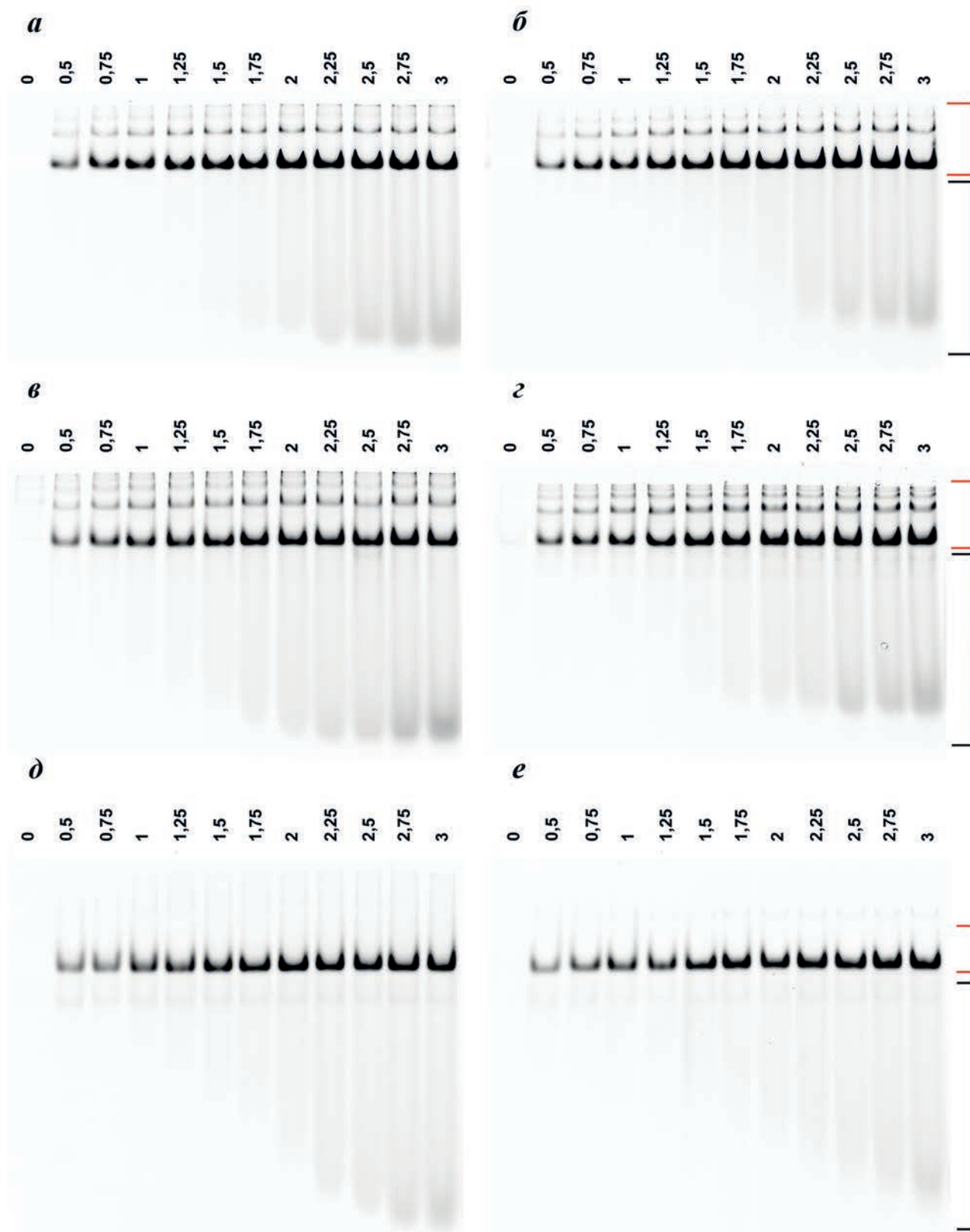
Комплементарные додецил-содержащие производные:

3R                      FAM-DDD-GATATGATGACGTTAGTTAG

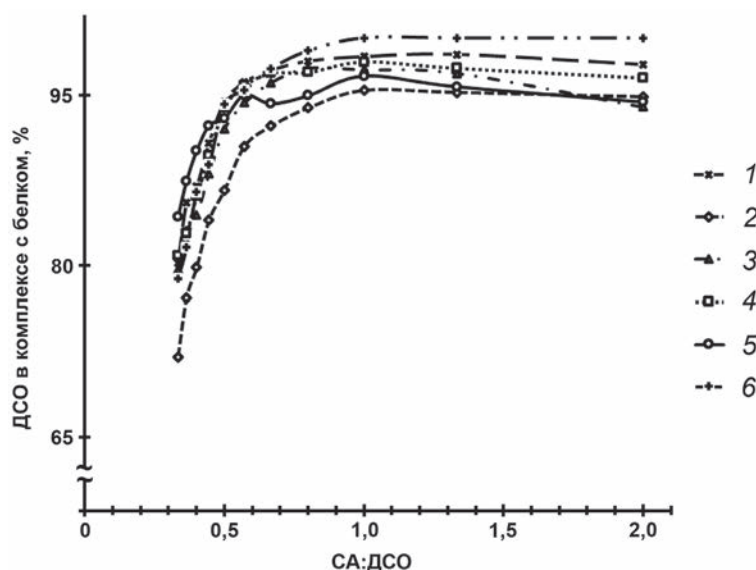
3L                      FAM-DDD-CTAATAACGTCATCATATC



**Рис. 1.** Структуры олигодезоксирибонуклеотидных производных. FAM — остаток 6-карбоксифлуоресцеина; **D** — структура нуклеотидного додецил-содержащего звена в составе олигонуклеотида



**Рис. 2.** Электрофореграмма относительной подвижности комплексов БСА (*a* и *б*), ЧСА (*в* и *г*) и мономерной фракции ЧСА<sub>м</sub> (*д* и *е*) с ДСО 3R (*a*, *в*, и *д*) и 3L (*б*, *г*, и *е*) в 8%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. Каждая проба содержала 5 мкМ белка в растворе TAN, объём пробы – 20 мкл. Цифры над дорожками соответствуют эквивалентам ДСО в составе пробы. За 1 экв. было принято количество вещества альбумина, равное 0,1 нмоль. Пробы готовили и анализировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Красной квадратной скобкой обозначена область, соответствующая подвижности комплексов белка с ДСО в данных условиях, чёрной – область подвижности свободного ДСО



**Рис. 3.** Зависимость количества ДСО в комплексе с белком (%) от значения соотношения СА к ДСО (в экв.). За 1 экв. было принято количество вещества  $n(\text{СА})$ , равное 0,1 нмоль. 1 – БСА••3L; 2 – ЧСА••3R; 3 – ЧСА••3L; 4 – ЧСА<sub>м</sub>••3R; 5 – ЧСА<sub>м</sub>••3L; 6 – БСА••3R

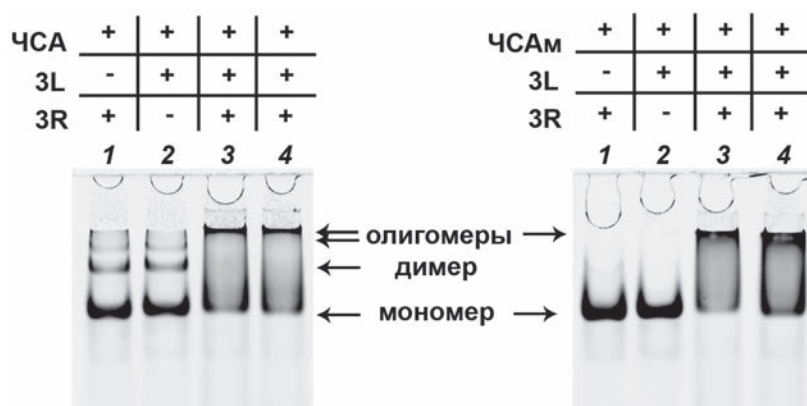
а область подвижности не связанного с белком ДСО – чёрной (рис. 1П в Приложении 1; рис. 2). Полос, соответствующих комплексам СА••ДСО, несколько, так как сывороточный альбумин, помимо мономера, также существует в виде димера и других олигомерных форм [58–59], с которыми, как было нами ранее показано, ДСО также связывается [51].

Исследование влияния количества введенных в олигонуклеотид додецильных остатков на степень сродства ДСО к связыванию с альбумином показало, что ДСО с одним (1Т, 1N) и один из ДСО с двумя остатками (2Т) не образуют с БСА комплексов, устойчивых в условиях электрофоретического анализа (рис. 1П, а, б и г в Приложении 1). Другое производное с двумя (2N) и производные с тремя додецильными остатками (3Т, 3N) способны формировать с БСА комплексы с более низкой электрофоретической подвижностью в сравнении со свободными ДСО (рис. 1П, в, д и е в Приложении 1). При этом в дорожках с комплексами БСА••2N (рис. 1П, д в Приложении 1) наблюдается размывание флуоресцентного сигнала ДСО вне зависимости от его количества, добавляемого к белку, что не позволяет оценить стехиометрию формирования данного комплекса. Стехиометрия образования комплексов БСА••3Т и БСА••3N составила не более 1 : 1,5 (БСА : ДСО), так как на полученных электрофореграммах при соотношении 1 : 1,5 и выше (рис. 1П, в и е в Приложении 1) мы наблюдали накопление флуоресцентного сигнала от свободного, не связанного с белком, ДСО.

Сравнительное исследование связывания ДСО с гомологичными альбуминами БСА и ЧСА, а также очищенной мономерной фракцией ЧСА (ЧСА<sub>м</sub>) показало, что ДСО 3R и 3L (рис. 1) образуют стабильные комплексы со всеми указанными вариантами СА (рис. 2, а–г). Полученные электрофореграммы были использованы для расчёта долей связанного с белком и свободного ДСО, исходя из интенсивности флуоресценции соответствующих полос для каждой из проб. Зависимости количества связанного с белком ДСО от значения соотношения СА : ДСО имеют вид кривых с выходом на плато в диапазоне 0,67–1 по оси абсцисс (рис. 3), что соответствует стехиометрии образующихся ассоциатов в среднем 1 : (1,25 ± 0,25) (СА : ДСО, в экв.).

Олигонуклеотидные производные 3R и 3L являются комплементарными (рис. 1) и могут образовывать дуплекс (3R/3L), температура плавления которого в исследуемых условиях, согласно данным OligoAnalyzer [60], составляет ~ 52 °С, что свидетельствует о его стабильности. Было показано, что как при добавлении любого из вариантов исследуемых альбуминов к преформированному дуплексу 3R/3L, так и при смешивании растворов преформированных комплексов СА••3R с комплексами СА••3L наблюдается образование белково-олигонуклеотидных ассоциатов, отличных по своей подвижности от ранее зафиксированных (рис. 4). Флуоресцентный сигнал от формирующихся в образцах, содержащих СА, 3R и 3L, комплексов регистрируется на электрофореграмме, в том числе в области кармана





**Рис. 4.** Электрофореграмма относительной подвижности комплексов ЧСА (слева) и мономерной фракции ЧСА<sub>м</sub> (справа) с ДСО 3R и 3L в 8%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. Каждая проба содержала 0,1 нмоль белка в растворе TAN, 0,175 нмоль 3R и/или 3L (указано знаком «+»), объем проб – 20 мкл. Цифрами указаны номера дорожек. Методики приготовления проб для нанесения на дорожки 1–4 отличались. 1 и 2 – Готовили разбавлением стоковых растворов СА и ДСО до необходимых концентраций. 3 – Готовили, добавив в буферный раствор сперва ДСО 3R и 3L, после чего инкубировали 3 мин при 95 °С, охлаждали до 37 °С, затем добавляли альбумин и инкубировали 30 мин при 37 °С. 4 – Готовили последовательно: сперва в двух отдельных пробирках смешивали по 0,05 нмоль СА с 0,175 нмоль 3R и 0,05 нмоль СА с 0,175 нмоль 3L так, чтобы конечный объем в каждой пробирке составил 10 мкл, после чего данные пробирки инкубировали 30 мин при 37 °С, чтобы образовался комплекс СА•ДСО, а затем содержимое пробирок объединяли в одну и инкубировали ещё 30 мин при 37 °С. По прошествии времени инкубации пробы наносили на ПААГ и анализировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Стрелками указана область подвижности соответствующих форм сывороточного альбумина, связанного с ДСО

на границе буферный раствор–ПААГ (рис. 4). Данная область является характерной для подвижности олигомеров сывороточного альбумина (рис. 4). Полученные результаты свидетельствуют о частичном образовании высокомолекулярных ассоциатов, вероятно, морфология (форма и/или размер) которых препятствует их движению в 8%-ном ПААГ.

Таким образом, результаты, полученные с помощью метода задержки в геле, свидетельствуют о способности ДСО связываться с БСА и ЧСА, включая его очищенную мономерную фракцию, в условиях, близких к физиологическим, с образованием как комплексов со стехиометрией белок : ДСО в среднем 1 : (1,25 ± 0,25) (в экв.), так и высокомолекулярных ассоциатов, формирование которых может быть обусловлено комплементарным взаимодействием ДСО, связанных с белком.

**Исследование ассоциатов альбумина с комплементарными додецил-содержащими производными методом атомно-силовой микроскопии.** Для изучения морфологии полученных высокомолекулярных ассоциатов образец, содержащий преформированный дуплекс 3R/3L и ЧСА, был исследован методом АСМ. Было обнаружено, что при концентрации ЧСА 0,4 мкМ (и ДСО – 1,2 мкМ) поверхность слюды с нанесённым образцом (3R/3L + ЧСА) содержит крупные частицы округлой формы, диаметром 165,5 ± 94,3 нм и высотой 28,9 ± 16,9 нм, расположенные на слое значительно более мелких частиц диаметром 12,0 ± 2,3 нм и высотой не

более 3 нм (рис. 1П и 2П в Приложении 2). Поскольку мелкие частицы образовывали плотное покрытие на поверхности, мы предположили, что в данных условиях при концентрации ЧСА 0,4 мкМ это может свидетельствовать о перенасыщении поверхности слюды белком вследствие его хорошей адсорбции. Разбавив образец (3R/3L + ЧСА) в 10 раз, мы снова наблюдали редко представленные крупные частицы аналогичного размера (рис. 3П и 4П в Приложении 2). Данные частицы характеризовались однородной структурой без каких-либо отдельно просматривающихся компонентов внутри (рис. 5П в Приложении 2). Слой мелких частиц стал менее плотным (рис. 3П и 6П в Приложении 2) и было отмечено, что некоторые из мелких частиц располагались на поверхности парами на минимальном расстоянии друг от друга (рис. 6П в Приложении 2).

В контрольном образце дуплекса 3R/3L при концентрации ДСО 0,12 мкМ были обнаружены крупные частицы диаметром 101,8 ± 31,6 нм и высотой 30,8 ± 10,7 нм (рис. 7П и 8П в Приложении 2) и единично представленные мелкие частицы, диаметр и высота которых не превышали 10 и 3 нм соответственно (рис. 9П в Приложении 2).

В контрольном образце 0,04 мкМ ЧСА без добавления ДСО мы наблюдали только множество низких (высотой до 1,5 нм) мелких (диаметром до 20 нм) частиц (рис. 10П и 11П в Приложении 2).

**Исследование ассоциатов альбумина с комплексами поли(dA) и олиготимидилатными олигонуклеотидами методом атомно-силовой микроскопии.** Для исследования способности связывания СА с ДСО в составе супрамолекулярных ассоциатов методом АСМ был исследован образец, состоящий из предварительно сформированных комплексов поли(dA) с олиготимидилатным ДСО 3Т, к которым затем был добавлен ЧСА: (поли(dA) + 3Т + ЧСА).

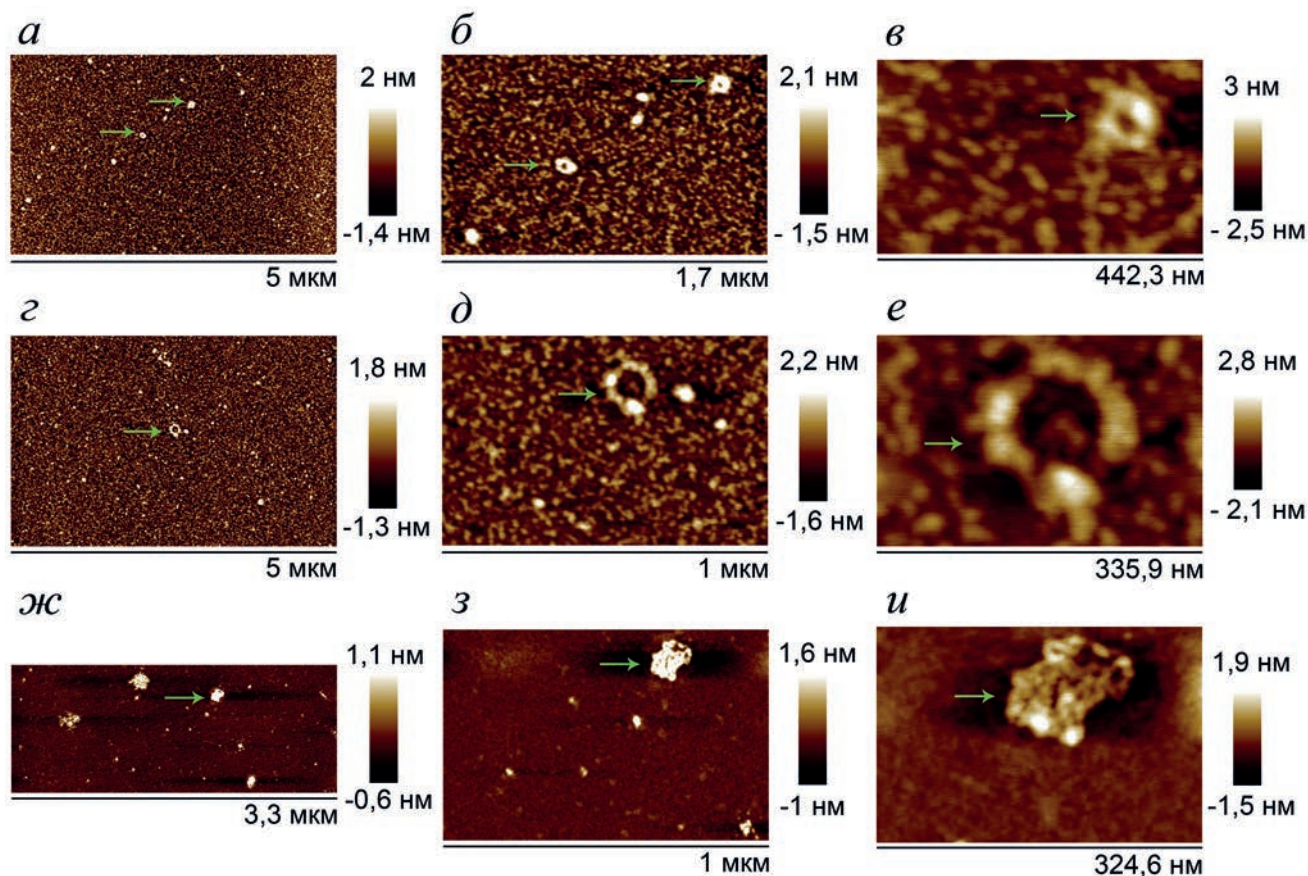
На первом этапе были изучены типичные топографические изображения слюды с нанесёнными на её поверхность контрольными образцами сравнения — ЧСА, а также комплексов (поли(dA) + 3Т) и (поли(dA) + 0Т) (рис. 12П–22П в Приложении 2). Образец (поли(dA) + 0Т) был выбран в качестве образца сравнения, поскольку известно, что СА может взаимодействовать с нативными НК, не содержащими липофильные остатки [61]. Видно, что образец ЧСА визуализируется на поверхности в виде слоя типичных округлых частиц, большинство из которых менее 20 нм, но присутствуют также более крупные частицы диаметром ~ 25–35 нм (рис. 12П–14П в Приложении 2). Поверхность слюды с образцом (поли(dA) + 3Т) (рис. 15П, 17П, 19П и 21П в Приложении 2) представлена как дцДНК-подобными обрывочными фрагментами линейной формы, так и эллипсоид-подобными фрагментами (40 × 15 нм; рис. 21П в Приложении 2). В контрольном образце (поли(dA) + 0Т) видна сеть из линейных дцДНК-цепей, которые, предсказуемо, из-за реализации связывания гомо(олиго/поли)-нуклеотидных последовательностей способны формировать разветвлённые формы ДНК (рис. 16П, 18П, 20П и 22П в Приложении 2). В отличие от образца (поли(dA) + 3Т), в образце (поли(dA) + 0Т) наблюдаются более протяжённые цепи (рис. 20П и 22П в Приложении 2). Анализ показывает, что в случае (поли(dA) + 0Т) на типичном поле наблюдения масштабом 1 мкм<sup>2</sup> визуализируется 20 ± 1 точек ветвления дцДНК, тогда как для (поли(dA) + 3Т) — всего 1–2 точки (рис. 19П и 20П в Приложении 2).

На поверхности слюды, содержащей (поли(dA) + 3Т + ЧСА) мы наблюдали частицы округлой формы и редко представленные кольцеобразные структуры (рис. 23П, 25П, 27П, 29П, 30П и 32П в Приложении 2; рис. 5, а, б, г и д). Внешний диаметр кольцеобразных структур варьировал от 65 до 200 нм (рис. 31П и 32П в Приложении 2; рис. 5, в и е). Следует отметить, что каждая из зафиксированных нами кольцевых структур типично имела несколько утолщённых участков (рис. 5, в и е; рис. 31П и 32П в При-

ложении 2). Размер частиц округлой формы в образце (поли(dA) + 3Т + ЧСА), по данным АСМ, соответствовал таковому для контрольного образца ЧСА (рис. 12П–14П в Приложении 2). Мы предположили, что в данных условиях (концентрация ЧСА — 1 мкМ) это снова может свидетельствовать о перенасыщении поверхности слюды альбумином из-за повышенного сродства именно белка к неорганической поверхности. Поэтому были исследованы образцы (поли(dA) + 3Т + ЧСА), разбавленные в 100 раз (концентрация ЧСА — 10 нМ). На типичных топографических изображениях слюды (рис. 33П, 35П и 37П в Приложении 2; рис. 5, ж–и), как и ожидалось, отсутствовал ранее наблюдаемый белковый слой, и мы фиксировали крупные (отдельные — до 500 нм в диаметре) образования из хорошо различимых нитевидных составляющих (рис. 5, и). Среди данных образований можно выделить две популяции крупного (315,4 ± 70,9 нм) (рис. 41П в Приложении 2) и более мелкого (188,3 ± 43,7 нм) размера. Образования в большинстве случаев имели форму близкую к округлой. Толщина отдельной нитевидной составляющей внутри этих образований была ~ 11 нм (рис. 39П в Приложении 2), что соответствует типичным дцДНК-структурам, наблюдаемым методом АСМ в контрольных экспериментах (рис. 21П и 22П в Приложении 2).

Полученные изображения для образца (поли(dA) + 0Т + ЧСА) при концентрации ЧСА 1 мкМ (рис. 24П, 26П и 28П в Приложении 2) были схожими с изображениями контрольного образца 1 мкМ ЧСА (рис. 12П–14П в Приложении 2) и для образца (поли(dA) + 3Т + ЧСА). Однако в образце (поли(dA) + 0Т + ЧСА) не было найдено кольцеобразных структур как до (рис. 24П, 26П, 28П в Приложении 2), так и после его разбавления (рис. 34П, 36П, 38П в Приложении 2). После разбавления образца (поли(dA) + 0Т + ЧСА) мы наблюдали наличие главным образом линейных и в значительной степени укороченных фрагментов дцДНК (рис. 38П в Приложении 2), содержащих округлые, белок-подобные возвышения/утолщения как внутри, так и на концах цепи ДНК (рис. 40П в Приложении 2). Похожие округлые возвышения/утолщения, напоминающие частицы белка, мы наблюдали в структурах зафиксированных образований в образце (поли(dA) + 3Т + ЧСА) (рис. 5, и; рис. 39П и 42П в Приложении 2).

Таким образом, с помощью метода АСМ было обнаружено, что в указанных условиях результатом взаимодействия ЧСА с дуплексом комплементарных ДСО могут являться



**Рис. 5.** Топографические изображения слюды, полученные методом АСМ, с нанесённым на неё образцом (поли(dA) + 3T + ЧСА) в растворе ТАМ до разбавления (а–е) и после (ж–и). Концентрация поли(dA) – 23 мкМ (а–е) и 0,23 мкМ (ж–и); ДСО – 0,5 мкМ (а–е) и 5 нМ (ж–и); ЧСА – 1 мкМ (а–е) и 10 нМ (ж–и). Пробы готовили и анализировали, как описано в разделе «Материалы и методы»

округлые высокомолекулярные ассоциаты диаметром  $165,5 \pm 94,3$  нм и высотой  $28,9 \pm \pm 16,9$  нм, а результатом взаимодействия ЧСА с комплексами поли(2'-дезокс)адениловой кислоты и олиготимидилатного ДСО могут являться супрамолекулярные ассоциаты, самоорганизованные главным образом в виде субмикронных структур. Такие структуры представлены двумя основными популяциями размером  $315,4 \pm 70,9$  и  $188,3 \pm 43,7$  нм. При этом их высота не превышала 2,5 нм.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возможность связывания альбумина с олигонуклеотидами продемонстрирована как для нативных НК [61], так и для их синтетических аналогов, модифицированных по углеводно-фосфатному остову [19], а также для содержащих липофильные группировки олигонуклеотидных производных [20, 25, 30–32]. Было отмечено, что липофильные производные тНК, обладающие высоким сродством к альбумину, демонстрируют улучшенные фармако-

кинетические характеристики и эффективность действия [20, 29–31], а эффективность действия антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих остатки жирных кислот, коррелирует со степенью их сродства к СА [25]. Параметры связывания липофильных производных тНК с альбумином, например, стабильность и стехиометрия формирующихся комплексов, зависят от типа модификаций в составе тНК, её последовательности и вторичной структуры [20, 30–32].

В данной работе мы изучили олигонуклеотидные производные, содержащие от 1 до 3 липофильных додецильных остатков **D**. Последовательное увеличение числа остатков **D** позволило нам отследить, как повышение гидрофобности олигонуклеотида влияло на его сродство к СА. В качестве олигонуклеотидных составляющих ДСО мы использовали либо гомотимидилатные, либо гетеронуклеотидные последовательности, значительно отличающиеся по таким физико-химическим характеристикам, как стэкинг азотистых оснований внутри цепи и образование вторичных структур [62]. Наше исследование демонстрирует,



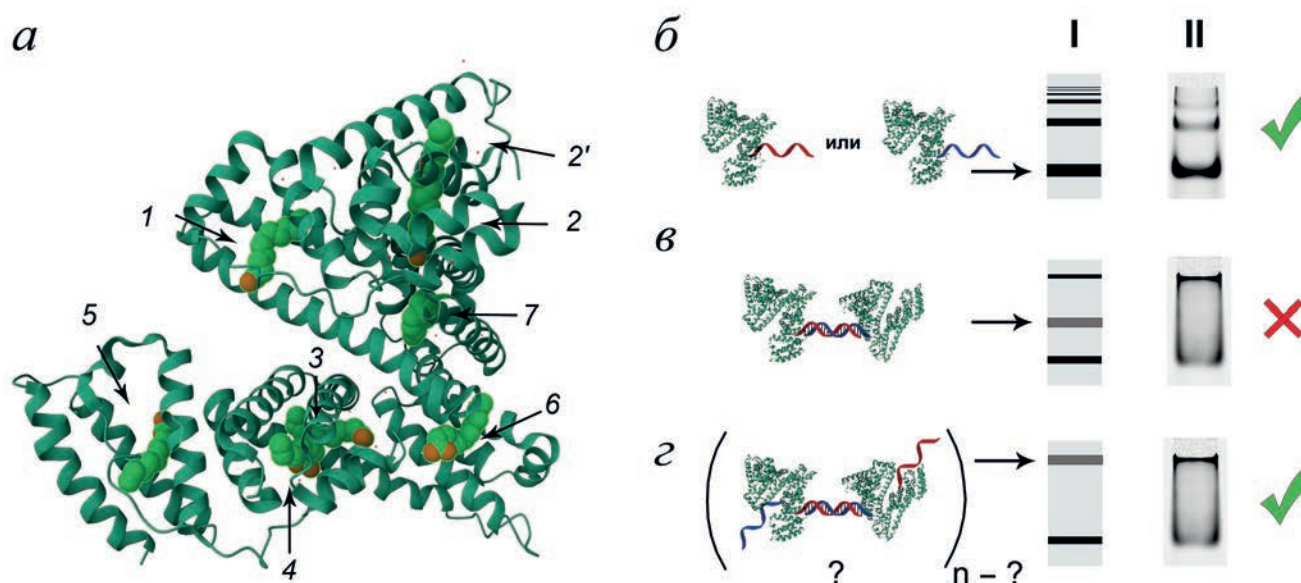
что степень сродства ДСО к альбумину симбатна количеству введенных гидрофобных додецильных остатков (рис. 1П в Приложении 1). Наличие одного додецильного остатка в составе олигонуклеотидов (на примере 1Т и 1N) не обеспечивало стабильности образующихся комплексов БСА••1Т и БСА••1N, по данным электрофоретического анализа. В случае введения двух остатков D мы регистрировали формирование частично устойчивых комплексов БСА••2N, то есть для производного с гетеронуклеотидной последовательностью (рис. 1П, д в Приложении 1). В то же время для 2Т нам удалось зафиксировать, по всей видимости, факт диссоциации соответствующего комплекса ДСО с альбумином в процессе анализа: чётких полос, характеризующих подвижность комплексов БСА••2Т, не регистрируется. Полученные данные указывают, что нуклеотидная последовательность ДСО может оказывать влияние на стабильность их комплексов с альбумином. Разное сродство к связыванию с СА в зависимости от нуклеотидной последовательности ранее было описано для тиофосфатных аналогов олигонуклеотидов [19]. В нашем случае, вероятно, после закрепления алифатических остатков ДСО в сайтах предполагаемого гидрофобного взаимодействия с молекулой белка олигонуклеотидная цепь в зависимости от её последовательности имеет разные возможности для реализации сети дополнительных низкоспецифических контактов белок–НК. При этом наиболее гидрофобные производные ДСО, содержащие 3 додецильных остатка, образовывали стабильные комплексы со всеми вариантами образцов СА, используемых в работе.

Нами была установлена стехиометрия образования стабильных комплексов СА••ДСО для трёх различных препаратов сывороточных альбуминов: выделенного мономера из фракции V по методу Кона ЧСА, фракции V по методу Кона ЧСА и фракции V по методу Кона БСА (без жирных кислот). Показано, что в среднем с молекулой белка любого из исследованных видов СА может связаться  $1,25 \pm 0,25$  молекул ДСО с тремя додецильными остатками. Мы полагаем, что данный факт свидетельствует о присутствии в образцах комплексов альбумина с ДСО по крайней мере двух популяций ассоциатов: СА••(ДСО)<sub>1</sub>, когда с белком связана 1 молекула ДСО, и СА••(ДСО)<sub>2</sub> — когда связаны 2 молекулы. Согласно литературным данным, в физиологических условиях молекула ЧСА осуществляет транспорт до 2 молекул ЖК [63–64]. Больше количество ЖК (до 4 молекул) альбумин может

транспортировать в случае напряжённых физических нагрузок или адренергической стимуляции [64]. Установленные сайты связывания остатков ЖК в молекуле ЧСА обсуждались ранее [52, 65–68]. В экспериментах *in vitro* при инкубации СА в присутствии значительных избытков ЖК удалось получить кристаллические структуры ЧСА, в которых с молекулой белка связано 7–8 молекул ЖК [65]. Так, методом РСА была установлена структура ЧСА в комплексе с восемью молекулами лауриновой (C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>COOH) кислоты (рис. 6, а), алифатический остаток которой близок по длине к додецильному (C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>–) в составе ДСО. Отмечается, что сайты связывания 2, 4 и 5 характеризуются высоким сродством к ЖК, а сайты связывания 1, 3 и 6 — средним сродством (рис. 6, а) [65, 68]. Сайт 7, по некоторым данным, может являться одним из главных сайтов связывания для короткоцепочечных ЖК [65]. Мы предполагаем, что связывание ДСО с альбумином происходит в местах расположения вышеописанных высокоаффинных сайтов связывания остатков ЖК, что обеспечивает стабильность комплексов СА••ДСО в условиях электрофоретического анализа. Вероятно, именно комбинация сайтов связывания, занимаемых додецильными остатками первого ДСО, может определять возможность взаимодействия с СА второй молекулы ДСО. Альбумин является белком, подверженным аллостерической модуляции, когда связывание некоторых лигандов может влиять на взаимодействие других лигандов в других сайтах молекулы СА [69], в том числе делая такое взаимодействие невозможным. Также популяции СА••(ДСО)<sub>1</sub> и СА••(ДСО)<sub>2</sub> могут иметь различную устойчивость в условиях электрофоретического разделения, в частности, более «нагруженный» комплекс белка с ДСО может диссоциировать, не позволяя зафиксировать его наличие методом задержки в геле.

В отличие от ЧСА, о сайтах связывания БСА с ЖК в литературе представлено меньше данных. Известно, что БСА и ЧСА имеют высокую гомологию, оба состоят из 3 (I–III) также гомологичных доменов, разделённых на 2 субдомена (А и В) [64, 70]. Наглядно сравнение структур данных белков приведено в работе Golianová et al. [71], где также обозначены основные сайты связывания гидрофобных соединений в БСА. В нашей работе стехиометрия образования комплексов альбумина с ДСО отличалась незначительно в случаях с БСА, ЧСА или его мономерной фракции ЧСА<sub>м</sub> (рис. 3), что свидетельствует о реализации схожих механизмов связывания рассматриваемых





**Рис. 6.** Схематичное изображение: *a* – структуры ЧСА в комплексе с лауриновой кислотой ( $C_{11}H_{23}COOH$ ); *б–г* – предполагаемых комплексов ЧСА с ДСО. Тёмно-зелёным цветом выделена структура белка (*а–г*), светло-зелёным – молекулы лауриновой кислоты (*а*), оранжевым цветом – карбоксильные группы в  $C_{11}H_{23}COOH$  (*а*), волнистой линией красного цвета – **3R** (*б–г*), волнистой линией синего цвета – **3L** (*б–г*). Арабскими цифрами (*а*) показаны сайты связывания жирной кислоты: 1–7 – основные, 2' – дополнительный, согласно данным Bhattachary et al. [65]. Приведённая структура ЧСА (*а*) опубликована в работе Bhattachary et al. [65] и в банке данных трёхмерных структур белков и НК PDB (RCSB.org), ID 1E7F. Римские цифры (*б–г*) указывают на демонстрацию теоретически возможного (I) и полученного (II) вида расположения полос образца ЧСА (5 мкМ) в комплексе с **3R** (15 мкМ) и **3L** (15 мкМ) при анализе методом задержки в геле. Стрелками (*б–г*) указаны полосы, предположительно соответствующие подвижности изображённых схематично комплексов белка с ДСО

производных с белками, где превалирующее, гидрофобное, взаимодействие осуществляется между додецильными остатками и соответствующими участками в структурах белков.

Данные об образовании комплексов альбумина с 18-звенным антисмысловым олигонуклеотидом, содержащим на 5'-конце лиганд D1 (не путать с додецильным остатком **D** в текущем исследовании) для связывания с белком, были опубликованы в работе Lacroix et al. [20]. Как и в нашем случае, сродство к связыванию с белком для олигонуклеотидов, содержащих лиганд D1, сохранялось вне зависимости от вида сывороточного альбумина – ЧСА или БСА. Кроме того, авторами было продемонстрировано аналогичное сродство к связыванию D1-содержащих олигонуклеотидов с мышинным СА.

Важной частью работы стало исследование возможности реализации Уотсон-Криковских взаимодействий между олигонуклеотидными цепями двух комплементарных ДСО, связанных в комплексах с альбумином. Полученные нами данные (рис. 4) по изучению подвижности ассоциатов, образованных комплементарными ДСО **3R** и **3L** с альбумином, также свидетельствуют в пользу наличия в комплексах СА с одним ДСО как минимум двух популяций,  $СА \bullet (ДСО)_1$  и  $СА \bullet (ДСО)_2$ . Наличие

первой популяции, когда с СА связана 1 молекула ДСО, обуславливает одну из двух наблюдаемых нами полос в образце СА с двумя комплементарными ДСО (рис. 4, дорожки 3 и 4) – с высокой электрофоретической подвижностью, сопоставимой с таковой для комплексов мономерной формы  $СА \bullet ДСО$  (рис. 4, дорожки 1 и 2). В образце, содержащем 2 комплементарных ДСО и белок, данная полоса может соответствовать комплексам как состава  $СА \bullet 3R$ ,  $СА \bullet 3L$ , так и дуплексу, связанному с мономерной формой белка  $СА \bullet 3R/3L$ , поскольку в данных условиях подвижность указанных комплексов отличается незначительно, так как молекулярная масса ЧСА (~ 66,5 кДа [54]) существенно превышает молекулярную массу данных ДСО (~ 7,5 кДа). При этом вторая популяция комплексов типа  $СА \bullet (ДСО)_2$ , несущих по 2 молекулы ДСО, имеет возможность и реализует её в образце СА с комплементарными ДСО в виде формирования структур, молекулярность которых по белковому компоненту явно превышает значение как минимум в 3 молекулы, что видно при анализе расположения на электрофореграмме второй полосы (рис. 4, дорожки 3 и 4) – с очень низкой подвижностью, характерной для области подвижности олигомеров альбумина в контрольных пробах (рис. 4, дорожки 1 и 2) [59].

Значимое количество флуоресцентно меченой ДНК в этом случае регистрируется локализованной вблизи дна кармана для нанесения образца.

На рис. 6, б–г под соответствующими римскими цифрами приведены теоретически возможные (I) и экспериментально наблюдаемые (II) изображения электрофореграмм, характеризующих подвижность ассоциатов с участием ЧСА, 3R и 3L (рис. 4). Заметим, если предположить, что с СА связывается 1 молекула 3R или 3L, тогда образующиеся комплексы СА••3R и СА••3L (схематично представлены на рис. 6, б) при реализации комплементарного взаимодействия должны привести к «сцепке» 2 молекул белка (СА••3R/3L••СА) при условии, что связанные молекулы ДСО способны реализовать такое взаимодействие. Подвижность такого ассоциата (СА••3R/3L••СА) (схематично представлен на рис. 6, в) не должна быть ниже подвижности олигомеров альбумина, состоящих из более чем 2 молекул белка (рис. 4), а должна быть близка к подвижности димера СА. Таких полос при соотношении СА : 3R : 3L = 1 : 1,5 : 1,5 (в экв.) и времени инкубации проб 30 мин мы не наблюдали (рис. 4; рис. 6, в). Однако при соотношении ЧСА<sub>м</sub> : 3R : 3L = 1 : 0,25 : 0,25 (в экв.) и времени инкубации 15 мин нам удалось зафиксировать ассоциат (рис. 2П в Приложении 1; дорожка 8 на панелях а и б, обозначен стрелкой красного цвета), по всей видимости, состава (ЧСА<sub>м</sub>••3R/3L••ЧСА<sub>м</sub>), поскольку его подвижность была сопоставима с подвижностью димера ЧСА и комплексов димера ЧСА с одним ДСО (рис. 2П в Приложении 1; дорожка 2 на панели б и дорожки 6, 7 на панелях а и б). При увеличении количества комплементарных ДСО мы наблюдали постепенное уменьшение подвижности данной полосы (рис. 2П в Приложении 1; дорожки 9–12 на панелях а и б), вероятно, вызванное участием ассоциата (ЧСА<sub>м</sub>••3R/3L••ЧСА<sub>м</sub>) в дальнейшем образовании более высокомолекулярных ассоциатов.

Если же с молекулой белка способно связаться 2 и более молекул ДСО, то в этом случае возможно образование более сложно организованных высокомолекулярных ассоциатов (схематично представлены на рис. 6, г) и их подвижность может быть значительно ниже мономерной и димерной форм белка (рис. 4). В нашем случае при соотношении СА : 3R : 3L = 1 : 1,5 : 1,5 (в экв.) и времени инкубации проб 30 мин мы наблюдали именно это (рис. 4; рис. 6, б–г). Образование данных высокомолекулярных ассоциатов происходит только в присутствии комплементарных ДСО;

при добавлении даже 6-кратного избытка одного из ДСО их формирования не наблюдалось (рис. 2П в Приложении 1; дорожка 1), что позволяет сделать вывод о вкладе именно Уотсон-Криковских взаимодействий в их организацию.

Для изучения морфологии образующихся высокомолекулярных ассоциатов мы использовали метод АСМ. Было обнаружено, что в образце (3R/3L + ЧСА) присутствуют крупные по диаметру и высоте округлые частицы (рис. 1П, 3П–5П в Приложении 2), структура которых ввиду своей однородной плотности не позволяет однозначно заключить, участвует ли в их образовании белок или нет. С одной стороны, похожие крупные частицы были зафиксированы нами в контрольном образце дуплекса 3R/3L (рис. 7П и 8П в Приложении 2), где они, по всей видимости, являются мицеллами, сформированными ДСО за счёт наличия липофильных додецильных остатков по обоим концам дуплекса. Образование мицелл характерно как для ДСО по ранее полученным нами данным [51], так и для других производных олигонуклеотидов с липофильными остатками [31], при этом размер мицелл зависит от условий экспериментов (концентрации ДСО, pH среды, вида и концентрации солей, температуры, времени инкубации). С другой стороны, электрофоретическая подвижность образцов 3R/3L и (3R/3L + ЧСА) значительно отличается (рис. 3П в Приложении 1). Образец 3R/3L при концентрации каждого из ДСО 15 мкМ имеет вид нечёткой растянутой полосы в геле, что свидетельствует в пользу формирования мицелл дуплексом ДСО. Однако при добавлении к дуплексу 3R/3L белка мы не наблюдали подобного вида полос в образце (3R/3L + ЧСА), часть которого визуализируется ближе к области кармана для нанесения. Это может свидетельствовать о том, что формирование высокомолекулярных ассоциатов в данном случае происходит уже с участием белка, молекулярная масса которого значительно превышает таковую для ДСО и может приводить к существенному снижению электрофоретической подвижности образующихся ассоциатов. Мы предположили, что размер дуплекса 3R/3L (~ 7 нм из расчёта 0,34 нм на одно нуклеотидное звено) слишком мал в сравнении с данными о размере ЧСА (~ 6–13 нм) [38, 72], чтобы было возможным отличить с помощью метода АСМ олигонуклеотидные цепи в составе высокомолекулярных ассоциатов от частиц, являющихся молекулами белка, и оценить количество его молекул, входящее в их состав. Поэтому далее мы исследовали образец ЧСА

с комплексами (поли(dA) + 3T). Теоретически с молекулой полиадениловой кислоты может связаться несколько молекул олиготимидилата с образованием протяжённых дуплексов, которые также могут соединяться по типу формирования конкатамеров в случае связывания олиготимидилата с разными молекулами поли(dA). Мы предположили, что такая система будет более пригодна для сравнительного исследования связывания альбумина с ДСО с помощью метода АСМ по аналогии применения данного метода для визуализации связанных с протяжёнными ДНК других белков [73].

Полученные нами данные исследования супрамолекулярных ассоциатов методом АСМ свидетельствуют, что без альбумина как нативный 0T, так и додецил-содержащий 3T олиготимидилаты образовывали с поли(dA)-матрицей конкатамерные ДНК-подобные комплексы (рис. 15П–22П в Приложении 2): в обоих образцах наблюдали фрагменты высотой до 1,5 нм и шириной в местах без утолщений/возвышений — 10–15 нм (рис. 21П и 22П в Приложении 2). Наблюдаемые более короткие фрагменты и существенно меньшее количество точек их разветвления (рис. 19П и 20П в Приложении 2) в образце (поли(dA) + 3T) в сравнении с (поли(dA) + 0T) позволяют предположить, что наличие додецильных остатков в ДСО способствует ограничению длины образующихся конкатамерных комплексов в образце (поли(dA) + 3T). Вероятно, додецильные остатки могут препятствовать кооперативному связыванию содержащих их олиготимидилатов на поли(dA)-матрице, поэтому образец (поли(dA) + 3T) имел вид неупорядоченно расположенных укороченных фрагментов (рис. 19П в Приложении 2). Либо алифатический додецильный остаток способствует сворачиванию/изгибу НК-цепи за счёт образования гидрофобных скрепок ДСО, расположенных на одной или разных поли(dA)-матрицах, как было показано ранее [74–75]. Изображение же образца (поли(dA) + 0T) соответствовало виду «классических» конкатамерных комплексов (рис. 18П и 20П в Приложении 2) по аналогии с работой Виноградовой и соавт. [76]. Наличие утолщений/возвышений в обоих образцах (рис. 21П и 22П в Приложении 2) также может быть обусловлено возможностью образования триплексов в данных образцах [77].

Добавление альбумина к контрольному образцу (поли(dA) + 0T) привело к уменьшению наблюдаемой длины конкатамерных комплексов, по нашему предположению, из-за сродства НК к альбумину [19, 61], что также может нарушать кооперативность связывания олиго-

тимидилата с полиадениловой кислотой. При этом более высокое сродство додецильных остатков к белку послужило причиной самоорганизации разбросанных до этого по поверхности обрывочных фрагментов ДНК в образце (поли(dA) + 3T) в сравнительно крупные округлые образования, состоящие из отдельных нитевидных компонентов (рис. 5, ж–и), в образце (поли(dA) + 3T + ЧСА). Толщина данных «нитей» близка к таковой для фрагмента ДНК и составила ~ 11 нм (рис. 39П в Приложении 2). Следует отметить, что в данных структурах были различимы округлые возвышения/утолщения, близкие по размеру к частицам белка (рис. 5, и; рис. 42П в Приложении 2). Вероятно, реализующиеся взаимодействия СА•ДСО в качестве «скрепок» могли способствовать объединению комплексов (поли(dA) + 3T) в зафиксированные более сложные структуры в образце (поли(dA) + 3T + ЧСА). Данные популяции округлых или близких к овальной форме крупных ( $315,4 \pm 70,9$  нм) и менее крупных ( $188,3 \pm 43,7$  нм) структур, сформированных из переплетённых «нитей», таким образом, можно квалифицировать как прототип наногелей с элементами НК-архитектоники по аналогии с работами Thelu et al [41], Li et al [46], Zhang и Tung [78] и Lacroix et al [79]. При этом зарегистрированные нами кольцообразные структуры (рис. 5, а–е) в этом же образце (поли(dA) + 3T + ЧСА) до его разбавления могли являться лишь «выпетливаниями» данных образований в избыточно присутствующем белковом слое.

С учётом известной способности СА к желированию с образованием гелей, отличающихся фазовым состоянием [80], а также стремительного развития направления ДНК-оригами и дизайна основанных на данном принципе систем доставки для тНК, полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале ДСО и СА как соединений-составляющих для создания новых многокомпонентных самоорганизующихся систем, в том числе обладающих свойствами биосовместимых наночастиц или наногелей. Важность создания подобных систем для решения задач молекулярной биологии и биомедицины отмечается ведущими научными изданиями [2]. При этом следующим этапом подтверждения потенциала систем доставки на основе СА и ДСО должны стать исследования их активности, возможных токсических эффектов и предполагаемых механизмов действия с использованием не только клеточных культур, но и объектов *in vivo*, например, специальных линий мышей.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в представленном исследовании результаты, наряду с достаточно быстрым связыванием ДСО с сывороточным альбумином в условиях, близких к физиологическим, а также ранее продемонстрированными фактами, что связывание ДСО с СА на 30% снижает, но не предотвращает их проникновения внутрь клеток *in vitro* [51] и отсутствием цитотоксичности в рабочем диапазоне концентраций [50], делают привлекательным использование таких олигонуклеотидных производных для разработки препаратов-транспортёров тНК, в том числе на основе аутологичной крови пациента. На следующих этапах необходимо продолжить исследования, чтобы изучить другие свойства ДСО, способные оказать влияние на их фармакодинамику и фармакокинетику в организме.

**Вклад авторов.** А.С. Павлова — реализация концепции исследования, постсинтетическое выделение ДСО, проведение экспериментов (метод задержки в ПААГ и АСМ), обработка и анализ полученных данных, написание текста статьи; В.В. Илющенко — проведение экспериментов (метод задержки в ПААГ), анализ и обработка первичных данных; Т.Д. Жарков,

М.С. Купрюшкин, Е.С. Дюдеева — синтез и постсинтетическое выделение ДСО и контрольных олигонуклеотидов; И.А. Бауэр, А.С. Чубаров — выделение и очистка мономерной фракции ЧСА; Д.В. Пышный, И.А. Пышная — концепция и руководство работой, редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Исследование проводилось в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

**Благодарности.** А.С.П. выражает благодарность к.ф.-м.н., зав. ЛСТБ ИХБФМ СО РАН Ломзову А.А. и к.ф.-м.н., н.с. ЛСТБ ИХБФМ СО РАН Голышеву В.М. за полезные консультации по использованию метода АСМ. В работе использовали оборудование VersaDoc™ MP 4000 Molecular Imager® System («Bio-Rad Laboratories», США) Объединённого Центра геномных, протеомных и метаболомных исследований (ОЦГПМИ) ИХБФМ СО РАН.

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

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith, C. I. E., and Zain, R. (2019) Therapeutic oligonucleotides: state of the art, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **59**, 605-630, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021050.
- Roberts, T. C., Langer, R., and Wood, M. J. A. (2020) Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **19**, 673-694, doi: 10.1038/s41573-020-0075-7.
- Gökirmak, T., Nikan, M., Wiechman, S., Prakash, T. P., Tanowitz, M., and Seth, P. P. (2021) Overcoming the challenges of tissue delivery for oligonucleotide therapeutics, *Trends Pharmacol. Sci.*, **42**, 588-604, doi: 10.1016/j.tips.2021.04.010.
- Bakowski, K., and Vogel, S. (2022) Evolution of complexity in non-viral oligonucleotide delivery systems: from gymnotic delivery through bioconjugates to biomimetic nanoparticles, *RNA Biol.*, **19**, 1256-1275, doi: 10.1080/15476286.2022.2147278.
- Crooke, S. T., Baker, B. F., Crooke, R. M., and Liang, X.-H. (2021) Antisense technology: an overview and prospectus, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **20**, 427-453, doi: 10.1038/s41573-021-00162-z.
- Mullard, A. (2023) 2022 FDA approvals, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **22**, 83-88, doi: 10.1038/d41573-023-00001-3.
- Egli, M., and Manoharan, M. (2023) Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 2529-2573, doi: 10.1093/nar/gkad067.
- Juliano, R. L. (2016) The delivery of therapeutic oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 6518-6548, doi: 10.1093/nar/gkw236.
- Juliano, R. L. (2021) Manipulation of the endosome trafficking machinery: implications for oligonucleotide delivery, *Biomedicines*, **9**, 512, doi: 10.3390/biomedicines9050512.
- Tran, P., Weldemichael, T., Liu, Z., and Li, H.-Yu (2022) Delivery of oligonucleotides: efficiency with lipid conjugation and clinical outcome, *Pharmaceutics*, **14**, 342, doi: 10.3390/pharmaceutics14020342.
- Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., and Stetsenko, D. A. (2014) Phosphoryl guanidines: A new type of nucleic acid analogues, *Acta Naturae*, **6**, 116-118, doi: 10.32607/20758251-2014-6-4-116-118.
- Lomzov, A. A., Kupryushkin, M. S., Shernyukov, A. V., Nekrasov, M. D., Dovidenko, I. S., Stetsenko, D. A.,



- and Pyshnyi, D. V. (2019) Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: isolation and properties, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **513**, 807-811, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.024.
13. Miroshnichenko, S. K., Patutina, O. A., Burakova, E. A., Chelobanov, B. P., Fokina, A. A., Vlassov, V. V., Altman, S., Zenkova, M. A., and Stetsenko, D. A. (2019) Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 1229-1234, doi: 10.1073/pnas.1813376116.
14. Pavlova, A. S., Yakovleva, K. I., Epanchitseva, A. V., Kupryushkin, M. S., Pyshnaya, I. A., Pyshnyi, D. V., Ryabchikova, E. I., and Dovydenko, I. S. (2021) An influence of modification with phosphoryl guanidine combined with a 2'-O-methyl or 2'-fluoro group on the small-interfering-RNA effect, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9784, doi: 10.3390/ijms22189784.
15. Anderson, B. A., Freestone, G. C., Low, O., DeHoyos, C. L., Drury, III, W. J., Østergaard, M. E., Migawa, M. T., Fazio, M., Wan, W. B., Berdeja, A., Scandalis, E., Burel, S. A., Vickers, T. A., Crooke, S. T., Swayze, E. E., Liang, X., and Seth, P. P. (2021) Towards next generation antisense oligonucleotides: mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 9026-9041, doi: 10.1093/nar/gkab718.
16. Kandasamy, P., Liu, Y., Aduda, V., Akare, S., Alam, R., Andreucci, A., Boulay, D., Bowman, K., Byrne, M., Cannon, M., Chivatakarn, O., Shelke, J. D., Iwamoto, N., Kawamoto, T., Kumarasamy, J., Lamore, S., Lemaitre, M., Lin, X., Longo, K., Looby, R., Marappan, S., Metterville, J., Mohapatra, S., Newman, B., Paik, I.-H., Patil, S., Purcell-Estabrook, E., Shimizu, M., Shum, P., Standley, S., Taborn, K., Tripathi, S., Yang, H., Yin, Y., Zhao, X., Dale, E., and Vargeese, S. (2022) Impact of guanidine-containing backbone linkages on stereopure antisense oligonucleotides in the CNS, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 5401-5423, doi: 10.1093/nar/gkac037.
17. Hall, J. (2023) Future directions for medicinal chemistry in the field of oligonucleotide therapeutics, *RNA*, **29**, 423-433, doi: 10.1261/rna.079511.122.
18. Godfrey, C., Desviat, L. R., Smedsrød, B., Piétri-Rouxel, F., Denti, M. A., Disterer, P., Lorain, S., Nogales-Gadea, G., Sardone, V., Anwar, R., Andaloussi, S. E., Lehto, T., Khoo, B., Brolin, C., van Roon-Mom, W. M. C., Goyenvallé, A., Aartsma-Rus, A., and Arechavala-Gomez, V. (2017) Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies, *EMBO Mol. Med.*, **9**, 545-557, doi: 10.15252/emmm.201607199.
19. Gaus, H. J., Gupta, R., Chappell, A. E., Østergaard, M. E., Swayze, E. E., and Seth, P. P. (2019) Characterization of the interactions of chemically-modified therapeutic nucleic acids with plasma proteins using a fluorescence polarization assay, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 1110-1122, doi: 10.1093/nar/gky1260.
20. Lacroix, A., Fakih, H. H., and Sleiman, H. F. (2020) Detailed cellular assessment of albumin-bound oligonucleotides: Increased stability and lower non-specific cell uptake, *J. Control. Release*, **324**, 34-46, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.020.
21. Crooke, S. T., Seth, P. P., Vickers, T. A., and Liang, X.-H. (2020) The interaction of phosphorothioate-containing RNA targeted drugs with proteins is a critical determinant of the therapeutic effects of these agents, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 14754-14771, doi: 10.1021/jacs.0c04928.
22. Kim, W., Ly, N. K., He, Y., Li, Y., Yuan, Zh., and Yeo, Y. (2023) Protein corona: friend or foe? Co-opting serum proteins for nanoparticle delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **192**, 114635, doi: 10.1016/j.addr.2022.114635.
23. Chen, Z., Chen, X., Huang, J., Wang, J., and Wang, Z. (2022) Harnessing protein corona for biomimetic nanomedicine design, *Biomimetics*, **7**, 126, doi: 10.3390/biomimetics7030126.
24. Chernikov, I. V., Gladkikh, D. V., Meschaninova, M. I., Ven'yaminova, A. G., Zenkova, M. A., et al. (2017) Cholesterol-containing nuclease-resistant siRNA accumulates in tumors in a carrier-free mode and silences *MDR1* gene, *Mol. Ther.*, **6**, 209-220, doi: 10.1016/j.omtn.2016.12.011.
25. Prakash, T. P., Mullick, A. E., Lee, R. G., Yu, J., Yeh, S. T., Low, A., Chappell, A. E., Østergaard, M. E., Murray, S., Gaus, H. J., Swayze, E. E., and Seth, P. P. (2019) Fatty acid conjugation enhances potency of antisense oligonucleotides in muscle, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 6029-6044, doi: 10.1093/nar/gkz354.
26. Benizri, S., Gissot, A., Martin, A., Vialet, B., Barthelemy, P., and Grinstaff, M. W. (2019) Bioconjugated oligonucleotides: recent developments and therapeutic applications, *Bioconjugate Chem.*, **30**, 366-383, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00761.
27. Kupryushkin, M. S., Zharkov, T. D., Ilina, E. S., Markov, O. V., Kochetkova, A. S., Akhmetova, M. M., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V., Lavrik, O. A., and Khodyreva, S. N. (2021) Triazinylamidophosphate oligonucleotides: synthesis and study of their interaction with cells and DNA-binding proteins, *Russ. J. Bioorganic Chem.*, **47**, 719-733, doi: 10.1134/S1068162021030110.
28. Brown, K. M., Nair, J. K., Janas, M. M., Anglero-Rodriguez, Y. I., Dang, L. T. H., Peng, H., Theile, C. S., Castellanos-Rizaldos, E., Brown, C., Foster, D., Kurz, J., Allen, J., Maganti, R., Li, J., Matsuda, S., Stricos, M., Chickering, T., Jung, M., Wassarman, K., Rollins, J., Woods, L., Kelin, A., Guenther, D. C.,

- Mobley, M. W., Petrusis, J., McDougall, R., Racie, T., Bombardie, J., Cha, D., Agarwal, S., Johnson, L., Jiang, Y., Lentini, S., Gilbert, J., Nguyen, T., Chigas, S., LeBlanc, S., Poreci, U., Kasper, A., Rogers, A. B., Chong, S., Davis, W., Sutherland, J. E., Castonero, A., Milstein, S., Schlegel, M. K., Zlatev, I., Charisse, K., Keating, M., Manoharan, M., Fitzgerald, K., Wu, J.-T., Maier, M. A., and Jadhav, V. (2022) Expanding RNAi therapeutics to extrahepatic tissues with lipophilic conjugates, *Nat. Biotechnol.*, **40**, 1500-1508, doi: 10.1038/s41587-022-01334-x.
29. Biscans, A., Caiazzzi, J., McHugh, N., Hariharan, V., Muhuri, M., and Khvorova, A. (2021) Docosanoic acid conjugation to siRNA enables functional and safe delivery to skeletal and cardiac muscles, *Mol. Ther.*, **29**, 1382-1394, doi: 10.1016/j.ymthe.2020.12.023.
30. Sarrett, S. M., Werfel, T. A., Lee, L., Jackson, M. A., Kilchrist, K. V., Brantley-Sieders, D., and Duvall, C. L. (2017) Lipophilic siRNA targets albumin in situ and promotes bioavailability, tumor penetration, and carrier-free gene silencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E6490-E6497, doi: 10.1073/pnas.1621240114.
31. Jin, C., Zhang, H., Zou, J., Liu, Y., Zhang, L., Li, F., Wang, R., Xuan, W., Ye, M., and Tan, W. (2018) Floxuridine homomeric oligonucleotides "Hitchhike" with albumin *in situ* for cancer chemotherapy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 8994-8997, doi: 10.1002/anie.201804156.
32. Chappell, A. E., Gaus, H. J., Berdeja, A., Gupta, R., Jo, M., Prakash, T. P., Oestergaard, E. E., Swayze, E. E., and Seth, P. P. (2020) Mechanisms of palmitic acid-conjugated antisense oligonucleotide distribution in mice, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 4382-4395, doi: 10.1093/nar/gkaa164.
33. Sleep, D. (2015) Albumin and its application in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **12**, 793-812, doi: 10.1517/17425247.2015.993313.
34. Hoogenboezem, E. N., and Duvall, C. L. (2018) Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **130**, 73-89, doi: 10.1016/j.addr.2018.07.011.
35. Varanko, A., Saha, S., and Chilkoti, A. (2020) Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **156**, 133-187, doi: 10.1016/j.addr.2020.08.008.
36. Prajapati, R., and Somoza, Á. (2021) Albumin nanostructures for nucleic acid delivery in cancer: current trend, emerging issues, and possible solutions, *Cancers*, **13**, 3454, doi: 10.3390/cancers13143454.
37. Chubarov, A. S. (2022) Serum albumin for magnetic nanoparticles coating, *Magnetochemistry*, **8**, 13, doi: 10.3390/magnetochemistry8020013.
38. Hu, H., Quintana, J., Weissleder, R., Parangi, S., and Miller, M. (2022) Deciphering albumin-directed drug delivery by imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **185**, 114237, doi: 10.1016/j.addr.2022.114237.
39. Merlot, A. M., Kalinowski, D. S., and Richardson, D. R. (2014) Unraveling the mysteries of serum albumin – more than just a serum protein, *Front. Physiol.*, **5**, 299, doi: 10.3389/fphys.2014.00299.
40. Zhao, P., Wang, Y., Wu, A., Rao, Y., and Huang, Y. (2018) Roles of albumin-binding proteins in cancer progression and biomimetic targeted drug delivery, *ChemBioChem*, **19**, 1796-1805, doi: 10.1002/cbic.201800201.
41. Thelu, H. V. P., Atchimnaidu, S., Perumal, D., Hari Krishnan, K. S., Vijayan, S., and Varghese, R. (2019) Self-assembly of an aptamer-decorated, DNA-protein hybrid nanogel: a biocompatible nanocarrier for targeted cancer therapy, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2**, 5227-5234, doi: 10.1021/acsabm.9b00323.
42. Huang, J., Ma, W., Sun, H., Wang, H., He, X., Cheng, H., Huang, M., Lei, Y., and Wang, K. (2020) Self-assembled DNA nanostructures-based nanocarriers enabled functional nucleic acids delivery, *ACS Appl. Bio Mater.*, **3**, 2779-2795, doi: 10.1021/acsabm.9b01197.
43. Harris, M. A., Kuang, H., Schneiderman, Z., Shiao, M. L., Crane, A. T., Chrostek, M. R., Tăbăran, A.-F., Pengo, T., Liaw, K., Xu, B., Lin, L., Chen, C. C., O'Sullivan, M. G., Kannan, R., Low, W. C., and Kokkoli, E. (2021) ssDNA nanotubes for selective targeting of glioblastoma and delivery of doxorubicin for enhanced survival, *Sci. Adv.*, **7**, eabl5872, doi: 10.1126/sciadv.abl5872.
44. Liu, J., Chen, L., Zhai, T., Li, W., Liu, Y., and Gu, H. (2022) Programmable assembly of amphiphilic DNA through controlled cholesterol stacking, *J. Am. Chem. Soc.*, **144**, 16598-16603, doi: 10.1021/jacs.2c06610.
45. Ma, W., Zhan, Y., Zhang, Y., Mao, C., Xie, X., and Lin, Y. (2021) The biological applications of DNA nanomaterials: current challenges and future directions, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **6**, 351, doi: 10.1038/s41392-021-00727-9.
46. Li, J., Zheng, C., Cansiz, S., Wu, C., Xu, J., Cui, C., Liu, Y., Hou, W., Wang, Y., Zhang, L., Teng, I.-T., Yang, H.-H., and Tan, W. (2015) Self-assembly of DNA nanohydrogels with controllable size and stimuli-responsive property for targeted gene therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 1412-1415, doi: 10.1021/ja512293f.
47. Raniolo, S., Unida, V., Vindigni, G., Stolfi, C., Iacovelli, F., Desideri, A., and Biocca, S. (2021) Combined and selective miR-21 silencing and doxorubicin delivery in cancer cells using tailored DNA nanostructures, *Cell Death Dis.*, **12**, 7, doi: 10.1038/s41419-020-03339-3.
48. Wang, Y., Cheng, J., Zhao, D., Liu, Y., Luo, T., Zhong, Y.-F., Mo, F., Kong, X.-Y., and Song, J. (2020) Designed DNA nanostructure grafted with erlotinib for non-small-cell lung cancer therapy, *Nanoscale*, **12**, 23953, doi: 10.1039/d0nr06945k.

49. Wang, H., Xiao, H., Zhu, X., Liu, Y., Fu, Z., Li, C., Lu, C., and Yang, H. (2021) A cyanine-mediated self-assembly system for the construction of a two-in-one nanodrug, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **60**, 21226–21230, doi: 10.1002/anie.202108393.
50. Markov, O. V., Filatov, A. V., Kupryushkin, M. S., Chernikov, I. V., Patutina, O. A., Strunov, A. A., Chernolovskaya, E. L., Vlassov, V. V., Pyshnyi, D. V., and Zenkova, M. A. (2020) Transport oligonucleotides – a novel system for intracellular delivery of antisense therapeutics, *Molecules*, **25**, 3663, doi: 10.3390/molecules25163663.
51. Pavlova, A. S., Dovydenko, I. S., Kupryushkin, M. S., Grigor'eva, A. E., Pyshnaya, I. A., and Pyshnyi, D. V. (2020) Amphiphilic “like-a-brush” oligonucleotide conjugates with three dodecyl chains: self-assembly features of novel scaffold compounds for nucleic acids delivery, *Nanomaterials*, **10**, 1948, doi: 10.3390/nano10101948.
52. Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., and Ascenzi, P. (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life*, **57**, 787–796, doi: 10.1080/15216540500404093.
53. Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., and Ascenzi, P. (2012) Human serum albumin: from bench to bedside, *Mol. Aspects Med.*, **33**, 209–290, doi: 10.1016/j.mam.2011.12.002.
54. Knudsen Sand, K. M., Bern, M., Nilsen, J., Noordzij, H. T., Sandlie, I., and Andersen, J. T. (2015) Unraveling the interaction between FcRn and albumin: opportunities for design of albumin-based therapeutics, *Front. Immunol.*, **5**, 682, doi: 10.3389/fimmu.2014.00682.
55. Kupryushkin, M. S., Nekrasov, M. D., Stetsenko, D. A., and Pyshnyi, D. V. (2014) Efficient functionalization of oligonucleotides by new achiral non-nucleosidic monomers, *Org. Lett.*, **16**, 2842–2845, doi: 10.1021/ol500668n.
56. Dunn, D. B., and Hall, R. H. (1975) Purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides: physical constants and spectral properties, in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* (Fasman, G. D., eds) CRC Press, Cleveland, Vol. 1, pp. 65–215.
57. Dobrynin, S., Kutseikin, S., Morozov, D., Krumkacheva, O., Spitsyna, A., Gatilov, Y., Silnikov, V., Angelovski, G., Bowman, M. K., Kirilyuk, I., and Chubarov, A. (2020) Human serum albumin labelled with sterically-hindered nitroxides as potential MRI CONTRAST Agents, *Molecules*, **25**, 1709, doi: 10.3390/molecules25071709.
58. Chubarov, A., Spitsyna, A., Krumkacheva, O., Mitin, D., Suvorov, D., Tormyshev, V., Fedin, M., Bowman, M. K., and Bagryanskaya, E. (2021) Reversible dimerization of human serum albumin, *Molecules*, **26**, 108, doi: 10.3390/molecules26010108.
59. Atmeh, R. F., Arafa, I. M., and Al-Khateeb, M. (2007) Albumin aggregates: hydrodynamic shape and physico-chemical properties, *Jordan J. Chem.*, **2**, 169–182.
60. Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., and Peek, A. S. (2008) IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers, *Nucleic Acids Res.*, **36**, W163–W169, doi: 10.1093/nar/gkn198.
61. Alinovskaya, L. I., Sedykh, S. E., Ivanisenko, N. V., Soboleva, S. E., and Nevinsky, G. A. (2018) How human serum albumin recognizes DNA and RNA, *Biol. Chem.*, **399**, 347–360, doi: 10.1515/hsz-2017-0243.
62. Bar-Ziv, R., and Libchaber, A. (2001) Effects of DNA sequence and structure on binding of RecA to single-stranded DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9068–9073, doi: 10.1073/pnas.15124289.
63. Fredrickson, D. S., and Gordon, R. S. (1958) The metabolism of albumin-bound C14-labeled unesterified fatty acids in normal human subjects, *J. Clin. Invest.*, **37**, 1504–1515, doi: 10.1172/JCI103742.
64. Peters, Jr., T. (1995) *All about Albumin. Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, doi: 10.1016/B978-0-12-552110-9.X5000-4.
65. Bhattacharya, A. A., Grüne, T., and Curry, S. (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin, *J. Mol. Biol.*, **303**, 721–732, doi: 10.1006/jmbi.2000.4158.
66. Curry, S. (2003) Plasma albumin as a fatty acid carrier, in *Advances in Molecular and Cell Biology, Lipobiology* (van der Vusse, G. J., eds) Elsevier, vol. 33, pp. 29–46.
67. Fujiwara, S.-i., and Amisaki, T. (2008) Identification of high affinity fatty acid binding sites on human serum albumin by MM-PBSA method, *Biophys. J.*, **94**, 95–103, doi: 10.1529/biophysj.107.111377.
68. Van der Vusse, G. J. (2009) Albumin as fatty acid transporter, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 300–307, doi: 10.2133/dmpk.24.300.
69. Ascenzi, P., Bocedi, A., Notari, S., Fanali, G., Fesce, R., and Fasano, M. (2006) Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin, *Mini. Rev. Med. Chem.*, **6**, 483–489, doi: 10.2174/138955706776361448.
70. Agudelo, D., Bourassa, P., Bruneau, J., Bérubé, G., Asselin, É., and Tajmir-Riahi, H.-A. (2012) Probing the binding sites of antibiotic drugs doxorubicin and N-(trifluoroacetyl) doxorubicin with human and bovine serum albumins, *PLoS One*, **7**, e43814, doi: 10.1371/journal.pone.0043814.
71. Golianová, K., Havadej, S., Verebová, V., Uličný, J., Holečková, B., and Staničová, J. (2021) Interaction of conazole pesticides epoxiconazole and prothioconazole with human and bovine serum albumin studied using spectroscopic methods and molecular modeling, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1925, doi: 10.3390/ijms22041925.



72. Bisker, G., Ahn, J., Kruss, S., Ulissi, Z. W., Salem, D. P., and Strano, M. S. (2015) A mathematical formulation and solution of the CoPhMoRe inverse problem for helically wrapping polymer corona phases on cylindrical substrates, *J. Phys. Chem. C*, **119**, 13876-13886, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b01705.
73. Beckwitt, E., Kong, M., and Van Houten, B. (2018) Studying protein–DNA interactions using atomic force microscopy, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **73**, 220-230, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.06.028.
74. Pyshnaya, I. A., Pyshnyi, D. V., Lomzov, A. A., Zarytova, V. F., and Ivanova, E. M. (2004) The influence of the non-nucleotide insert on the hybridization properties of oligonucleotides, *Nucleosides Nucleic Acids*, **23**, 1065-1071, doi: 10.1081/NCN-200026073.
75. Виноградова О. А., Еремеева Е. В., Ломзов А. А., Пышная И. А., Пышный Д. В. (2009) Изогнутые дцДНК с заданными геометрическими характеристиками на основе комплексов мостиковых олигонуклеотидов, *Биоорг. химия*, **35**, 384-396.
76. Виноградова О. А., Щеглов Д. В., Латышев А. В., Пышный Д. В. (2011) Изучение структурной организации конкатемерных комплексов на основе нативных и модифицированных дцДНК-блоков, *Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина*, **9**, 109-117.
77. Pyne, A. L. B., Noy, A., Main, K. H. S., Velasco-Berrelleza, V., Piperakis, M. M., Mitchenall, L. A., Cugliandolo, F. M., Beton, J. G., Stevenson, C. E. M., Hoogenboom, B. W., Bates, A. D., Maxwell, A., and Harris, S. A. (2021) Base-pair resolution analysis of the effect of supercoiling on DNA flexibility and major groove recognition by triplex-forming oligonucleotides, *Nat. Commun.*, **12**, 1053, doi: 10.1038/s41467-021-21243-y.
78. Zhang, W., and Tung, C.-H. (2017) Sequence-independent DNA nanogel as a potential drug carrier, *Macromol. Rapid Commun.*, **38**, 1700366, doi: 10.1002/marc.201700366.
79. Lacroix, A., Edwardson, T. G. W., Hancock, M. A., Dore, M. D., and Sleiman, H. F. (2017) Development of DNA nanostructures for high-affinity binding to human serum albumin, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 7355-7362, doi: 10.1021/jacs.7b02917.
80. Arabi, S. H., Aghelnejad, B., Schwieger, C., Meister, A., Kerth, A., and Hinderberger, D. (2018) Serum albumin hydrogels in broad pH and temperature ranges: characterization of their self-assembled structures and nanoscopic and macroscopic properties, *Biomater. Sci.*, **6**, 478, doi: 10.1039/c7bm00820a.

## COMPLEXES AND SUPRAMOLECULAR ASSOCIATES OF DODECYL-CONTAINING OLIGONUCLEOTIDES WITH SERUM ALBUMIN

A. S. Pavlova\*, V. V. Ilyushchenko, M. S. Kupryushkin, T. D. Zharkov, E. S. Dyudeeva,  
I. A. Bauer, A. S. Chubarov, D. V. Pyshnyi, and I. A. Pyshnaya\*

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

Serum albumin is currently in the focus of biomedical research as a promising platform for the creation of multicomponent self-assembling systems due to the presence of several sites with a high binding affinity of various compounds in its molecule, including lipophilic oligonucleotide conjugates. In this work, we investigated the stoichiometry of the dodecyl-containing oligonucleotides binding to bovine and human serum albumins via electrophoretic mobility shift assay. The results testify to the formation of albumin-oligonucleotide complexes with a stoichiometry of about 1 : (1.25 ± 0.25) under physiological-like conditions. Using atomic force microscopy, it was found that interaction of human serum albumin with a duplex of complementary dodecyl-containing oligonucleotides resulted in associates of round shape with a diameter of 165.5 ± 94.3 nm and 28.9 ± 16.9 nm in height, and with polydeoxyadenylic acid and dodecyl-containing oligothymidylate also resulted in formation of supramolecular associates with a size of about 315.4 ± 70.9 and 188.3 ± 43.7 nm. The obtained data allow considering dodecyl-containing oligonucleotides and albumin as potential components for the development of methods to design self-assembled systems for solving problems of molecular biology, biomedicine, and the development of unique theranostics with targeted action.

**Keywords:** serum albumin, dodecyl-containing oligonucleotides, protein-nucleic acids complexes, biopolymers self-assembly, supramolecular associates, nucleic acids delivery