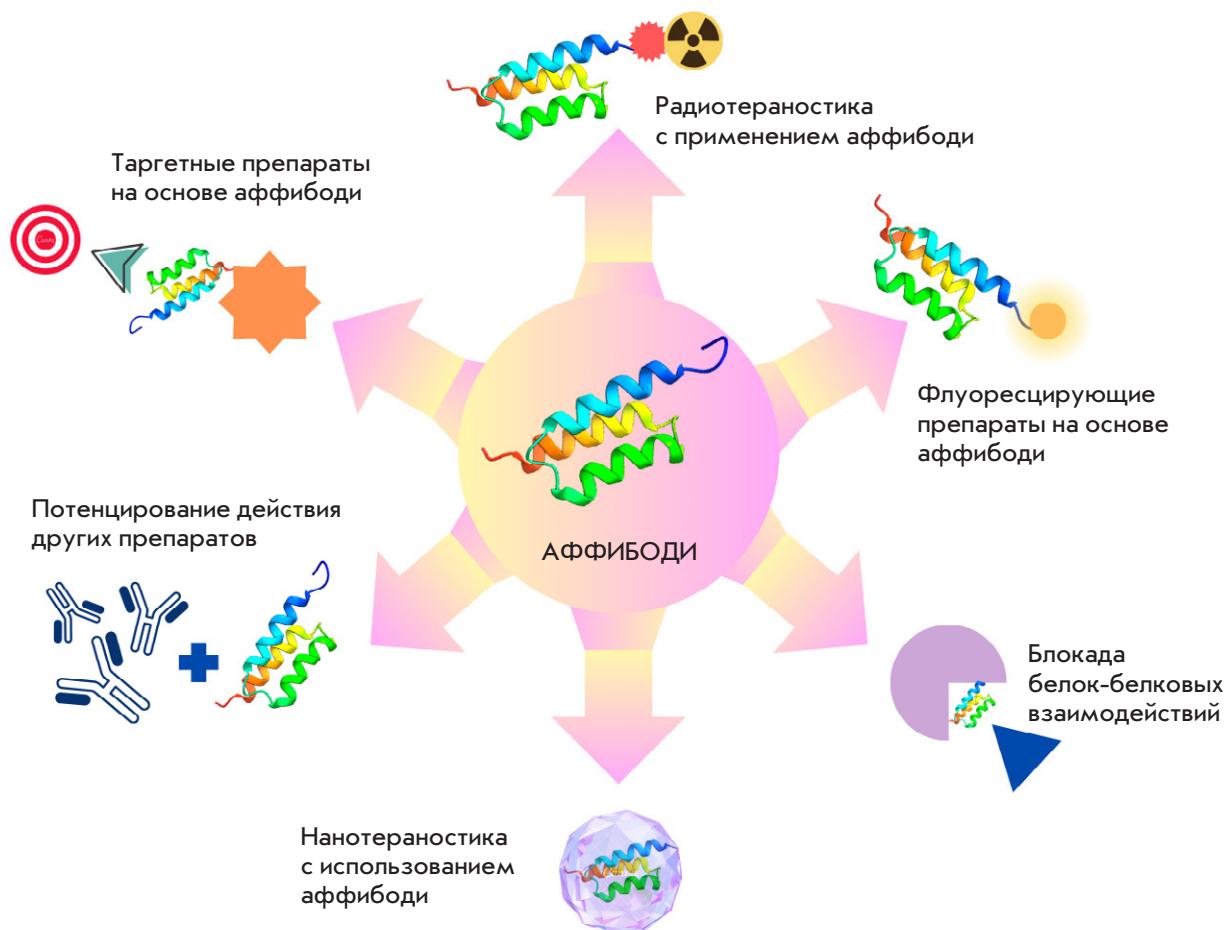


ActaNaturae

Таргетная радионуклидная детекция злокачественных опухолей с использованием аффибоди

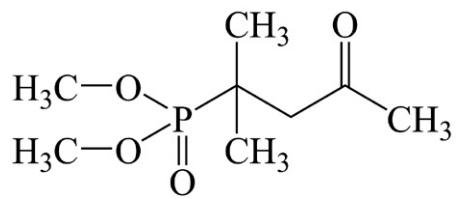


ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЕ мРНК-ВАКЦИНЫ
В ОНКОЛОГИИ: ВОЗМОЖНОСТИ,
СЛОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ
СТР. 17

МИТОФАГИЯ
ПРИ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМОЙ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ
СТР. 64

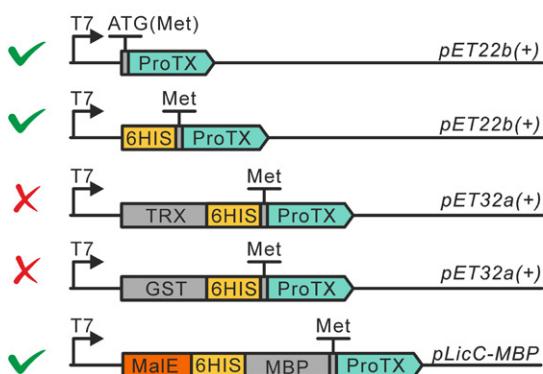
Радиозащитные свойства препарата «Димефосфон» на модели лучевого поражения *in vivo*

Д. А. Киселёва, М. А. Мельченко, О. И. Яровая, Н. В. Басов, А. Д. Рогачев, А. Г. Покровский, Н. Ф. Салахутдинов, Т. Г. Толстикова
Поиск эффективных радиозащитных средств остается одной из главных целей радиационной онкологии и радиобиологии. Радиозащитные свойства препарата «Димефосфон», обладающего антиацидотическими, противоопухолевыми, антиоксидантными свойствами, изучали на животных с экспериментальным лучевым поражением. Показано, что введение препарата оказывает локальный радиозащитный эффект, уменьшая тяжесть радиационно-индукционного повреждения кишечного эпителия и капсул селезенки.



Структурная формула активного вещества препарата «Димефосфон»

Рекомбинантная продукция, видоспецифическая активность на канале TRPA1 и важная роль N-концевого остатка токсина ProTx-I из яда тарантула *Thrixopelma pruriens*



Дизайн генетических конструкций для получения ProTx-I в клетках *E. coli*

М. А. Шулепко, М. Джан, Е. А. Живов, Д. С. Кульбацкий, А. С. Парамонов, Ю. Чэ, А. В. Кузнецов, А. В. Попов, М. П. Кирпичников, З. О. Шенкарев, Е. Н. Люкманова
Токсин ProTx-I (тарантул *Thrixopelma pruriens*) ингибирует каналы Na_v и TRPA1 и может служить моделью для создания новых анальгетиков. Мотив ингибиторного цистинового узла затрудняет рекомбинантную продукцию ProTx-I. Тестирование различных подходов к бактериальной продукции дисульфидсодержащих белков позволило получить ProTx-I с природной структурой путем ренатурации из цитоплазматических телец включения и при секреции в периплазмазу слитым с мальтозосвязывающим белком. ProTx-I более активен против TRPA1 крысы, чем человека, а модификация N-концевой последовательности ослабляет ProTx-I.

Исследование потенциала пептидного препарата Семакс и его производного для коррекции патологических нарушений в животной модели болезни Альцгеймера

А. И. Радченко, Е. В. Кузубова, А. А. Апостол, В. А. Митькевич, Л. А. Андреева, С. А. Лимборская, Ю. В. Степенко, В. С. Шмигерева, А. В. Солин, М. В. Корокин, М. В. Покровский, Н. Ф. Мясоедов, А. А. Макаров

Болезнь Альцгеймера – одно из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. В настоящей работе определено действие известного нейропротективного пептида Семакс и его производного на поведенческие характеристики и развитие амилоидоза у трансгенных мышей линии APPswe/PS1dE9/Blg, являющихся моделью болезни Альцгеймера. Полученные результаты показывают перспективность использования Семакса и его производных для разработки методов лечения и коррекции болезни Альцгеймера.



Схема эксперимента исследования действия Семакса и Гептапептида на мышах линии APP/PS1

Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,
Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики»

Редакционный совет:

Главные редакторы: А.Г. Габибов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,
М.В. Угрюмов

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),
И.П. Биленкина (Москва, Россия),
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),
Дж. Ву (Шанхай, Китай),
В.М. Говорун (Москва, Россия),
С.М. Деев (Москва, Россия),
О.А. Донцова (Москва, Россия),
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин

Верстка: К.К. Опарин

Корректура: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

WEB-редактор: О.Б. Семина

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4

Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60

E-mail: actanaturaе@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал
Acta Naturaе обязательна. Любое воспроизведение опубликованных
материалов без письменного согласия редакции не допускается.
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAЕ, 2025

Номер подписан в печать 29 декабря 2025 г.

Тираж 25 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,
г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2



**Основатель и председатель
редакционного совета (с 2009 по 2023 г.)
журнала Acta Naturaе
академик Григорьев Анатолий Иванович**

Журнал *Acta Naturaе* входит в Перечень ведущих
периодических изданий Высшей аттестационной
комиссии Минобрнауки России

Включен в базы данных PubMed,
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.0 (WOS); 3.5 (Scopus)

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

О. Д. Брагина, А. А. Несынов, Е. Ю. Ситникова,
С. В. Паталяк, С. М. Деев

Таргетная радионуклидная детекция
злокачественных опухолей с использованием
аффибоди 4

А. А. Ибрагимова, А. А. Федоров,
К. М. Кириленко, Е. Л. Чойнзонов, Е. В. Денисов,
М. Р. Патышева

Персонализированные мРНК-вакцины в онкологии:
возможности, сложности и перспективы 17

СОДЕРЖАНИЕ

Е. Н. Кукаев, А. О. Токарева, О. А. Крог-Йенсен, А. А. Лёнюшкина, Н. Л. Стародубцева Кишечная микробиота и короткоцепочечные жирные кислоты в патогенезе некротизирующего энтероколита у глубоко недоношенных новорожденных 38	А. И. Радченко, Е. В. Кузубова, А. А. Апостол, В. А. Митькович, Л. А. Андреева, С. А. Лимборская, Ю. В. Степенко, В. С. Шмигерева, А. В. Солин, М. В. Корокин, М. В. Покровский, Н. Ф. Мясоедов, А. А. Макаров Исследование потенциала пептидного препарата Семакс и его производного для коррекции патологических нарушений в животной модели болезни Альцгеймера 110
А. Д. Майборода, А. А. Макеева, Р. А. Азаркина, А. С. Барашкова, А. С. Мамаева Пептиды EPFL в регуляции развития и стрессовых ответов у растений 52	М. А. Шулепко, М. Джан, Е. А. Живов, Д. С. Кульбацкий, А. С. Парамонов, Ю. Чэ, А. В. Кузнецов, А. В. Попов, М. П. Кирпичников, З. О. Шенкарев, Е. Н. Люкманова Рекомбинантная продукция, видоспецифическая активность на канале TRPA1 и важная роль N-концевого остатка токсина ProTx-I из яда тарантула <i>Thrixopelma pruriens</i> 121
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ	
И. Д. Антипенко, С. А. Венедюхина, Н. П. Сорокина, И. В. Кучеренко, Т. С. Смирнова, Г. Н. Рогов, М. Ю. Шкурников Полное секвенирование генома выявляет вариабельность метаболических и иммунных систем у изолятов <i>Propionibacterium freudenreichii</i> 72	Правила для авторов 130
И. Д. Антипенко, Н. П. Сорокина, И. В. Кучеренко, Е. В. Кураева, Е. С. Масежная, М. Ю. Шкурников Комплексная характеристика пяти штаммов <i>Lactococcus</i>: от фенотипических свойств к геномным особенностям 83	
Д. А. Киселёва, М. А. Мельченко, О. И. Яровая, Н. В. Басов, А. Д. Рогачев, А. Г. Покровский, Н. Ф. Салахутдинов, Т. Г. Толстикова Радиозащитные свойства препарата «Димефосфон» на модели лучевого поражения <i>in vivo</i> 93	
Н. В. Панин, И. В. Пирогов, Д. Ф. Гуранда, В. К. Швядас Хиральный хроматографический анализ аминокислот с предколоночной модификацией о-фталевым альдегидом: улучшение определения энантиомеров с помощью ион-парных реагентов 103	

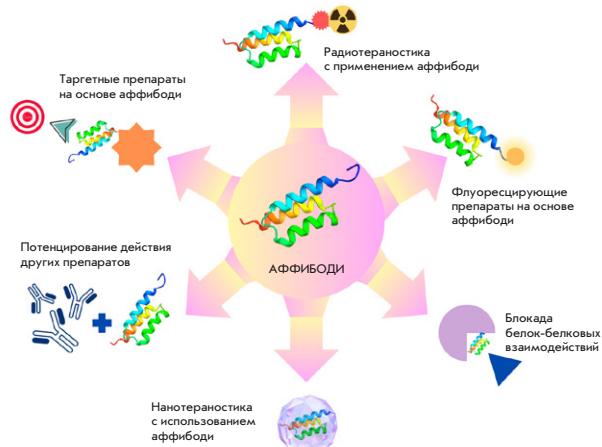


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Брагиной и др.)

Таргетная радионуклидная детекция злокачественных опухолей с использованием аффибоди

О. Д. Брагина^{1,2}, А. А. Несынов^{1*}, Е. Ю. Ситникова³, С. В. Паталяк^{1,3}, С. М. Деев^{2,4}

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, 634009 Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, 634050 Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, 634050 Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное научное учреждение науки Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*E-mail: nesynov.alex@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2025

Принята к печати 06.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27677

РЕФЕРАТ В представленном обзоре рассмотрены возможности использования молекул аффибоди в различных областях биотехнологии и клинической медицины. Показана высокая аффинность и специфичность молекул аффибоди к выбранным молекулярным мишениям, а также возможность визуализации различных злокачественных опухолей *in vivo*. Большее внимание уделено доклиническим и клиническим исследованиям коньюгатов аффибоди с различными радиоизотопами для проведения таргетной радионуклидной визуализации опухолей, что представляет особую актуальность в рамках проблем, возникающих на этапах диагностики и лечения данной категории пациентов. В клинических испытаниях показана хорошая переносимость радиофармацевтических препаратов и эффективность их использования для оценки распространенности опухолевого процесса и определения статуса HER2/ней у больных раком молочной железы, что обуславливает перспективность проведения дальнейших исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА злокачественные образования, терапия, таргетная радионуклидная диагностика, альтернативные каркасные белки, аффибоди.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЗНО – злокачественное новообразование; ИГХ – иммуногистохимия; РФП – радиофармпрепарат; АКБ – альтернативные каркасные белки; РФЛП – радиофармацевтический лекарственный препарат; ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; ФДГ – фтордезоксиглюкоза; FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*.

ВВЕДЕНИЕ

По данным IARC (International Agency For Research On Cancer) ежегодно в мире регистрируется около 20 млн новых случаев онкологических заболеваний, при этом показатели смертности на 2022 год составили 9.7 млн. Отмечается тенденция к ежегодному приросту данных показателей. Так, согласно демографическим прогнозам, количество новых случаев злокачественных новообразований (ЗНО) достигнет 35 млн к 2050 году [1].

В Российской Федерации по данным на 2023 год зарегистрировано 674 тыс. случаев ЗНО, при этом прирост по сравнению с 2022 годом составил 8% [2]. Учитывая высокую распространенность и социально-экономическую значимость онкологических заболеваний, актуальными остаются разработка более прицельных методов диагностики ЗНО, новых лекарственных препаратов и способов преодоления резистентности к противоопухолевой терапии [3–5].

В настоящее время основной частью диагностического поиска в онкологической практике является получение опухолевого материала с последующей гистологической верификацией. Этот этап во многом определяет дальнейшую лечебную тактику, прогноз и необходимость применения дополнительных, в том числе молекулярно-генетических, исследований [6]. Опухолевый материал может быть получен путем core-биопсии, а также эксцизионной биопсии, включающей полное извлечение опухоли во время диагностического хирургического вмешательства [7, 8]. Используемые методики во всех случаях являются инвазивными и травматичными, а в некоторых случаях требуют восстановления и реабилитации пациентов, что сопровождается дополнительными финансовыми затратами. Так, проведение торакоскопических и лапароскопических манипуляций требует госпитализации больных, выполнение анестезиологического пособия, а также не исключает невозможность выполнения процедуры ввиду анатомического расположения опухоли, наличия множественных диссеминированных метастатических очагов и отказа пациента от выполнения манипуляции [9, 10]. Нерешенной остается проблема необходимости иммуногистохимического исследования дополнительных опухолевых структур (метастазов в регионарные лимфатические узлы и отдаленные органы и ткани), что обусловлено возможностью различий их рецепторного статуса по сравнению с первичной опухолью (межопухолевой гетерогенностью) и отсутствием возможности выполнения в рутинной практике врача-онколога [11, 12].

Кроме того, существует ряд проблем, связанных с гистологическим и иммуногистохимическим (ИГХ) исследованиями опухолевой ткани, обусловленными сложностями оценки происхождения опухолевых клеток в случае низкодифференцированных и апластических образований [13] и субъективностью оценки изучаемых параметров [14]. По данным статистики, процент расхождений между заключениями патоморфологов может составлять до ~30%, что обусловлено сложностями дифференциальной диагностики, человеческим фактором, а также возможностью использования дополнительных методов окрашивания [15, 16].

Несовершенство стандартных лучевых и морфологических методов, необходимость выполнения инвазивных манипуляций, высокие экономические затраты, а также возможные трудности в интерпретации и воспроизведимости результатов диктуют необходимость разработки и внедрения дополнительных диагностических процедур, способствующих расширению диагностических и терапевтических опций у больных злокачественными

образованиями, что будет способствовать увеличению продолжительности жизни и ее качества. В этой связи разработка новых подходов, основанных на применении малых молекул, в частности, имеющих антителоподобные функции и тропных опухолевым антигенам, представляется крайне актуальным.

ТЕРАНОСТИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ

С развитием фундаментальной онкологии важным стало определение молекулярно-генетических параметров опухоли, что позволяет выявлять новые точки приложения лекарственной терапии, вплотную подводя к концепции персонифицированной медицины, то есть к назначению лечения, основанного на биологических особенностях опухоли каждого конкретного пациента с достижением максимальной эффективности [17]. Активно развивающимся направлением персонализированной медицины является тераностика, сочетающая диагностический этап, включающий определение различных молекулярных мишеней в опухолевой клетке и показания к терапии, с последующим прицельным терапевтическим воздействием на выявленные ранее у пациента маркеры опухолевого роста. Широкое использование тераностического подхода позволит достичь увеличения частоты ответа на проводимую терапию, снизить риск развития нежелательных явлений, улучшить общую и безрецидивную выживаемость, качество жизни пациентов, снизить экономическую нагрузку на здравоохранение [18].

Термин «тераностика» был впервые применен генеральным директором компании PharmaNetics Джоном Фанкхаузером в 1998 году для описания бизнес-модели собственной компании, заключавшейся в разработке диагностических панелей, предназначенных для последующего назначения специализированного лекарственного лечения [19]. Однако принцип использования одной и той же молекулы для диагностики и лечения онкологических заболеваний появился несколькими десятилетиями ранее. Важной вехой в формировании тераностического подхода стало открытие и широкое распространение радиоактивного йода, применяемого в терапии рака щитовидной железы [20]. Было показано, что визуализация опухоли с помощью изотопа йода-123 перед началом проведения радиоийодтерапии способствовала лучшему планированию тактики лечения. В результате сочетание йода-123 и йода-131 стало первой парой радиоизотопов, используемых в тераностике. Развитие радиохимии и совершенствование инструментальных методов исследования привело к значительному прогрессу в этом направлении [21]. Необходимо отметить, что уже более

10 лет существует журнал *Theranostics*, обобщающий многие современные данные в этом направлении (www.thno.org). В последнее время это направление получило существенный импульс развития в связи с применением радионуклидов.

В зависимости от методов диагностики и терапевтического агента выделяют фото-, соно-, химио-, нано- и радиотераностику [22]. В рамках тераностического подхода большим потенциалом обладает *таргетная радионуклидная диагностика*, являющаяся единственным направлением тераностики, интегрированным в клиническую практику. Суть метода заключается в использовании меченых радиоизотопами «нацеливающих» молекул, прицельно связывающихся с рецепторами на поверхности опухолевых клеток. Излучение изотопов при этом фиксируется специализированной аппаратурой и обеспечивает не только анатомическую оценку распространенности опухолевого процесса у больных злокачественными образованиями, но и молекулярную оценку выявленных очагов без использования дополнительных инвазивных процедур с возможностью выполнения повторных исследований на этапах первичной диагностики и на этапах лечения [23–25].

В качестве «нацеливающего» модуля в составе радиофармпрепараторов (РФП) применяются различные молекулярные структуры, к которым относят полноразмерные моноклональные антитела, фрагменты антител, а также синтетические каркасные молекулы или альтернативные каркасные белки (АКБ), являющиеся наиболее перспективными для использования в таргетной радионуклидной диагностике [26–29].

Альтернативные каркасные белки

Стремительное развитие технологий для осуществления клонального отбора полипептидов путем их связывания из обширных библиотек способствовало разработке нового класса связывающих белков с помощью методов белковой инженерии. Для снижения иммуногенности эти структуры были созданы на основе разнообразного набора каркасов, отличающихся по размеру и структурной организации от прототипа иммуноглобулина. На сегодняшний день описано множество различных классов неиммуноглобулиновых аффинных белков, основанных на разнообразии поверхностно расположенных аминокислотных остатков, локализованных либо в элементах вторичной структуры, либо в неструктурированных петлях, с последующей селекцией с использованием различных платформ отображения [30].

Структура данных соединений, как правило, состоит из постоянной каркасной части (постоян-

ная область) и вариабельной области (переменная область). При этом первый компонент содержит в своем составе пару α -спиралей или β -слоев, образующих жесткую третичную структуру, и поддерживает конформационную стабильность, присущую белковым каркасам; второй же компонент представлен несколькими открытыми петлями или несколькими остатками в жестких вторичных структурах, обеспечивающих специфическую способность связываться с различными молекулами-мишениями посредством структурного спаривания лиганд–рецептор или химических взаимодействий [31].

Малый размер АКБ (4–15 кДа) играет важную роль в биораспределении и способности молекул проникать в ткань опухоли, что проявляется в существенном сокращении временного интервала от введения радиофармацевтического лекарственного препарата до начала исследования, степени накопления препарата в опухоли, а также определяет выбор подходящего под конкретные цели и время исследования радиоизотопа. Еще одной общей характеристикой АКБ является хорошая устойчивость к факторам внешней среды. Отсутствие в структуре АКБ дисульфидных мостиков, характерных для антител, а также достаточно плотная структура обуславливают высокую термоустойчивость, стабильность в кислых и щелочных условиях, устойчивость к протеолизу. Кроме того, для конъюгации с лекарственными препаратами или диагностическими реагентами в белковые каркасы с помощью химического синтеза могут быть введены дополнительные структуры. Небольшие белковые каркасы обычно растворимы и обладают хорошей физико-химической стабильностью, что благоприятствует их применению *in vivo*. Все перечисленные характеристики делают каркасные белки соединениями, универсальными для модификации и производства [32].

На текущий момент представителями класса альтернативных каркасных белков являются молекулы аффибоди, аффилины, антикалины, атрамеры, дарпины, домены типа ингибитора Кунитца, альбуминсвязывающие домены, имеющие сродство к белку (АДАПТы) и др. Каждый из них находится на различных этапах изучения с обязательным поиском точек последующего клинического применения.

АФФИБОДИ В БИОТЕХНОЛОГИИ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Синтетическая молекула аффибоди является представителем класса альтернативных каркасных белков, имеющих доменное строение. Молекула аффибоди в своей основе имеет Z-домен – пептидный домен белка А золотистого стафилокок-

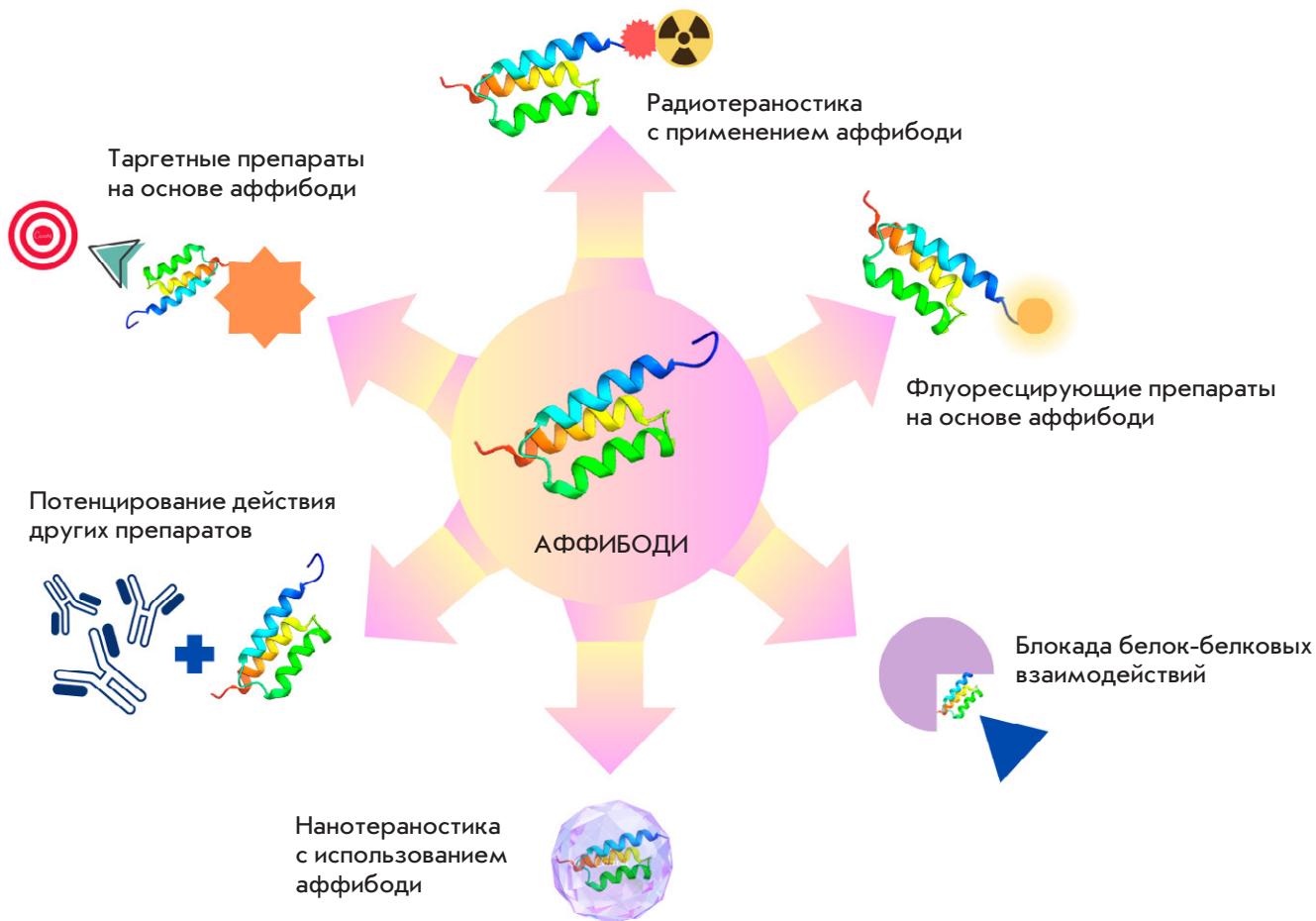


Рис. 1. Области применения молекул аффибоди в биотехнологии и клинической медицине

ка (*Staphylococcus aureus*) [33]. Пространственная структура Z-домена, состоящего из 58 аминокислотных остатков (а.о.) и имеющего достаточно низкую молекулярную массу (~6.5 кДа), образована тремя альфа-спиральами, формирующими бочонок. Молекулы аффибоди обладают хорошей структурной стабильностью, устойчивы к протеолизу, действию высоких температур (около 90°C), кислым и щелочным условиям (рН от 2.5 до 11) [34]. Комбинаторные библиотеки аффибоди могут быть получены путем рандомизации генов, кодирующих 13 а.о. в первой и второй спиральах Z-домена. Для этого используются фаговый, клеточный, рибосомный и мРНК-дисплеи. Для отбора молекул библиотеки смешивают с целевым антигеном, а затем подвергают вымыванию, в результате чего остаются только связавшиеся с лигандом пептиды. Полученные таким образом первичные нацеливающие молекулы в дальнейшем могут быть перандомизированы с целью повышения сродства к конкретной выбранной мишени [35]. Варианты, представляющие интерес, могут быть экспрессиро-

ваны в бактериальных, дрожжевых, клеточных системах или, ввиду небольшого размера, аффибоди могут быть получены также методами пептидного синтеза [36]. Включение функционализирующей группы в N- или C-конец пептида позволяет получить молекулу с требуемыми для конкретной цели свойствами – мечения радиоизотопом для радионуклидной диагностики, цитотоксической группы для таргетного лечения и др. [37, 38].

Благодаря своим уникальным свойствам молекулы аффибоди представляют большой интерес для диагностической и клинической медицины, а также перспективны для использования в различных биомедицинских областях (рис. 1).

Так, активно изучаются возможности использования связанных с флуоресцентными фрагментами молекул аффибоди для биолюминесцентной визуализации злокачественных образований, основными преимуществами которой являются высокая чувствительность, отсутствие токсичности и необходимости выполнения инвазивных мероприятий, а также низкая стоимость [39].

Молекулы аффибоди могут использоваться также в качестве барьера между взаимодействующими белками, обеспечивая новый метод лечения заболеваний, вызванных этими взаимодействиями. Примером могут служить вирусные заболевания. Белки-спайки вируса являются важными мишениями для разработки вакцин и противовирусных препаратов. Например, показана высокая специфичность и аффинность молекулы аффибоди к белку RBMFP (продукт, синтезированный из белка SARS-CoV-2), при этом взаимодействие молекулы аффибоди с рецепторсвязывающим фрагментом RBM (Receptor Binding Motif) приводит к нейтрализации псевдовирусной инфекции SARS-CoV-2 [40].

Конъюгаты молекул аффибоди с различными типами наночастиц рассматривают как перспективные агенты для терапии и визуализации злокачественных образований [41]. Например, конъюгат аффибоди с контрастным агентом nanobullbe используется для связывания HER2 и IR783 и разработки метода ультразвуковой детекции HER2-положительного рака молочной железы [42]. Изучается возможность терапевтического воздействия высококо-аффинных зондов Gd@C-dots-Cys-ZEGFR:1907 к EGFR в терапии немелкоклеточного рака легкого и PFH/AGM-CBA/HSV-TK/липосомы (PAHL)-аффибоди в терапии HER2-позитивного рака молочной железы [43, 44].

Особое значение имеет разработка таргетных препаратов на основе аффибоди. Так, в 2022 году была начата III фаза клинического исследования препарата Izokibep® – ингибитора IL-17, используемого при некоторых комплемент-зависимых заболеваниях: псориатического артрита,uveита, болезни Бехтерева, суппуративного гидраденита и др. [45, 46].

Аффибоди для таргетной радионуклидной диагностики злокачественных образований

Большая часть исследований посвящена возможности использования аффибоди в качестве основы радиофармацевтических препаратов для таргетной визуализации злокачественных образований различной локализации. Важным для таргетной радионуклидной диагностики злокачественных новообразований является выбор визуализирующего метода, что обусловлено уникальными характеристиками каждого радиоизотопа, среди которых можно выделить период полураспада ($T_{1/2}$), тип излучения (позитронное или гамма-излучение), способ получения (генератор или циклотрон) [47, 48]. В настоящее время для детекции излучения используются однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронная эмис-

Таблица 1. Радиоизотопы для радионуклидной диагностики с использованием ПЭТ или ОФЭКТ

Радиоизотоп	$T_{1/2}$	Тип излучения	Способ получения
^{68}Ga	68 мин	β^+ , γ	Генератор
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6.02 ч	γ	Генератор
^{18}F	109.8 мин	β^+	Циклотрон
^{66}Ga	9.9 ч	β^+ , γ	Циклотрон
^{64}Cu	12.7 ч	β^+ , β^- , γ	Циклотрон
^{188}Re	17 ч	β^+ , γ	Генератор
^{89}Zr	78.4 ч	β^+	Циклотрон
^{111}In	2.81 дня	γ	Циклотрон
^{177}Lu	6.7 дней	β^- , γ	Циклотрон
^{125}I	60 дней	γ	Циклотрон
^{57}Co	271.8 сут	γ	Циклотрон

сионная томография (ПЭТ), выбор которых зависит от применяемого в составе РФП изотопа (табл. 1). В настоящее время наиболее распространеными радионуклидами, используемыми с молекулами аффибоди, являются ^{68}Ga ($T_{1/2} = 68$ мин), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($T_{1/2} = 6.02$ ч), ^{18}F ($T_{1/2} = 109.8$ мин) и т.д., а в качестве долгоживущих радионуклидов используются ^{66}Ga ($T_{1/2} = 9.9$ ч), ^{64}Cu ($T_{1/2} = 12.7$ ч), ^{188}Re ($T_{1/2} = 17$ ч), ^{89}Zr ($T_{1/2} = 78.4$ ч), ^{111}In ($T_{1/2} = 2.81$ дня), ^{177}Lu ($T_{1/2} = 6.7$ дней), ^{125}I ($T_{1/2} = 60$ дней), ^{57}Co ($T_{1/2} = 271.8$ сут) [49].

Радиоконъюгаты синтезируют к рецепторам, которые сверхэкспрессируются на поверхности опухолевых клеток при многих злокачественных патологиях и не только вовлечены в патогенез ЗНО, но и являются дополнительной терапевтической опцией у онкобольных. Так, в настоящее время проводятся доклинические исследования радиоконъюгатов к лиганду рецептора программируемой гибели клеток PD-L1. Этот рецептор является трансмембранным белком, регулирующим клеточный иммунный ответ, а экспрессия PD-L1 опухолевыми клетками или клетками микроокружения опухоли приводит к ингибированию клеточного иммунного ответа. Благодаря этому опухолевые клетки избегают апоптоза, связанного с цитотоксическим действием Т-лимфоцитов. Экспрессия PD-L1 обнаружена во многих опухолях, в том числе в меланоме, раке легкого, молочной железы, мочевого пузыря, поджелудочной железы, яичника [50–52].

Так, Liang и соавт. [53] оценивали фармакокинетику препарата [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-PDA-аффибоди, профиль его токсичности, а также возможность визуализации *in vivo* PD-L1-позитивных опухолей путем проведения ОФЭКТ через 30, 60 и 120 мин после инъекции. Отмечено достаточно быстрое (через 30 мин)

накопление РФП в опухоли, однако, с учетом общего распределения препарата, оптимальным для визуализации был интервал 1–2 ч. К недостаткам данного препарата относятся низкое разрешение ОФЭКТ, высокое накопление препарата в почках, а также в щитовидной железе и в желудочно-кишечном тракте, что обусловлено связыванием неконъюгированного оксида технеция-99м.

Другой перспективной мишенью для таргетной визуализации является рецептор B7-Н3 (CD276) – трансмембранный белок из семейства молекул контрольных точек, обладающий коактивирующими или коингирующими действиями в отношении Т-лимфоцитов. В нормальных тканях белок экспрессируется на достаточно низком уровне, однако в некоторых опухолях отмечена его сверхэкспрессия [54]. К таким опухолям относятся рак предстательной железы, почечно-клеточный и уротериальный рак, рак яичника и др. В ткани опухоли этот белок обладает проонкогенным действием за счет ингибиции противоопухолевого иммунного ответа. В связи с активным развитием иммунотерапии этот рецептор рассматривается как потенциальная мишень, что делает актуальной разработку специфической диагностики сверхэкспрессии B7-Н3 в ткани опухоли [55].

Oroujeni и соавт. [56] изучали препарат $[^{99m}\text{Tc}]$ -Tc-AC12-GGGC на клеточных линиях рака яичника и молочной железы. В качестве группы отрицательного контроля они использовали клеточную линию лимфомы Ramos, не экспрессирующую B7-Н3. Накопление препарата B7-Н3-позитивными клетками ксеногraftов было в 6 раз выше, чем в группе контроля. Однако обнаружено низкое абсолютное значение накопления препарата в опухоли. По результатам ОФЭКТ через 4 ч после инъекции РФП наблюдалась визуализация ксенотрансплантированной B7-Н3-положительной опухоли, в то время как в группе отрицательного контроля опухоль не визуализировалась. Высокое накопление $[^{99m}\text{Tc}]$ -Tc-AC12-GGGC отмечено также в таких тканях, как почки и печень.

Oroujeni и соавт. [57] изучали также возможность улучшения детекции сверхэкспрессии B7-Н3 с радиофармацевтическим препаратом $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-AC12-GGGC путем повышения аффинности молекулы аффибоди. С помощью фагового дисплея получили три дочерние молекулы, которые впоследствии пометили технецием-99м и наряду с оригинальной молекулой AC12 исследовали на мышиных моделях. В итоге была выделена молекула SYNT-179, обладающая лучшими характеристиками: более высоким накоплением опухолью, низким – нормальными тканями с улучшением соотношения опухоль/орган,

а также более низким накоплением РФП печенью. Показано, что процесс созревания аффинности молекул приводил к улучшению показателей биораспределения и визуализации, а оптимизированный белок аффибоди обладал улучшенными характеристиками для таргетной диагностики сверхэкспрессии B7-Н3.

В доклиническом исследовании Cai и соавт. [58] изучали возможность применения тримерной молекулы аффибоди, меченной ^{68}Ga ($[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Z_{TRI}), для ПЭТ-диагностики гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Z_{TRI} обладает высокой аффинностью к рецептору тромбоцитарного фактора роста типа бета (PDGFR β), который экспрессируется на поверхности перицитов – клеток, расположенных в толще стенок мелких кровеносных сосудов. В нормальных кровеносных сосудах перициты покрыты интактным эндотелием, однако в опухоли архитектоника сосудистых стенок нарушена, вследствие чего образуются участки перицитов, не покрытые эндотелием, что делает PDGFR β на их поверхности доступным для детекции [59]. Поэтому предположили, что PDGFR β может служить потенциальным биомаркером ГЦК, которая относится к обильно васкуляризованным новообразованиям, соответственно, возможна сверхэкспрессия данного рецептора в ГЦК по сравнению с нормальной тканью печени.

На первом этапе валидировали PDGFR β в качестве биомаркера ГЦК и обнаружили высокую аффинность тримера аффибоди Z_{TRI} к PDGFR β . Также по данным ПЭТ накопление $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Z_{TRI} было прямо пропорционально экспрессии PDGFR β опухолевыми клетками, соответственно, препарат активно накапливался в PDGFR β -положительных клетках ГЦК лабораторных животных. При этом не выявлено накопления $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Z_{TRI} здоровыми тканями печени. Таким образом, показан высокий потенциал радиофармацевтического препарата $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-Z_{TRI} для ПЭТ-диагностики ГЦК и перспективность его дальнейшего изучения и внедрения в клиническую практику.

Аффибоди для выявления HER2-позитивных злокачественных образований

Одной из мишеней для таргетной терапии злокачественных заболеваний является рецептор эпидермального фактора роста человека типа 2 (HER2/neu) – тирозинкиназный рецептор, играющий важную роль в клеточной дифференцировке, пролиферации и апоптозе. Сверхэкспрессия HER2 чаще всего обусловлена амплификацией гена ERBB2 и встречается при раке молочной железы, желудка, поджелудочной железы, легкого, эндометрия, яич-

ника, мочевого пузыря, колоректальном раке и ряде других опухолевых локализаций [60].

Современные подходы к определению HER2-статуса включают методы ИГХ и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). Согласно критериям ASCO/CAP от 2023 года, экспрессия HER2/neu считается отрицательной при отсутствии окрашивания или со слабым, прерывистым мембранным окрашиванием (0 и 1+); положительной – при периферическом мембранным полном интенсивном окрашивании более 10% опухолевых клеток (3+). В сомнительных случаях (2+) результат будет подтверждаться амплификацией гена HER2 методом гибридизации *in situ* (FISH) с использованием ДНК-зонда ERBB2(17q12)/SE17 (Kreatech, США) [61].

В настоящее время внимание ученых направлено на изучение возможностей таргетной радионуклидной детекции с использованием аффибоди для оценки экспрессии рецептора HER2/neu при таких злокачественных новообразованиях, как рак желудка и рак яичников, что обусловлено особенностями их анатомического расположения и поисками дополнительных терапевтических опций при данных онкологических патологиях. Так, рак желудка часто диагностируется на поздних стадиях, когда хирургическое лечение не представляется возможным, что требует определения молекулярно-биологических параметров опухоли для выбора варианта системной терапии. Экспрессию HER2 обнаруживают в 17–20% случаев рака желудка, однако при этом наблюдается очень высокий уровень гетерогенности экспрессии HER2 (14–79% ИГХ и 23–54% ИГХ + FISH). Кроме того, HER2-статус опухоли может меняться в процессе анти-HER2-терапии, что вызывает трудности при оценке эффективности уже проводимого лечения, так как выполнение нескольких биопсий сопряжено с рисками осложнений и не всегда возможно [62, 63].

Нан и соавт. [64] изучали возможности таргетной детекции с использованием препарата [¹⁸F]AlF-NOTA-HER2, где HER2-положительной была клеточная линия NCI-N87, а HER2-отрицательной – MKN74. *In vitro* показано накопление изучаемого РФП в клетках, экспрессирующих HER2. *In vivo* [¹⁸F]AlF-NOTA-HER2 быстро накапливался HER2-положительными ксенографтами и быстро элиминировался из крови преимущественно почками. Среди нормальных тканей самое высокое накопление наблюдалось в костях и почках, что стало существенным недостатком данной молекулы, так как высокий уровень поглощенной радиоактивности требует проведения нефропротекции. При дополнительном сравнении препаратов [¹⁸F]AlF-NOTA-HER2 и ⁶⁸Ga-NOTA-HER2 обнаружено преимущество использо-

вания фтора-18 перед галлием-68, обусловленное более длительным периодом распада (109.8 против 67.7 мин соответственно), что давало больше времени для выполнения исследования. Кроме того, фтор-18 обладает меньшей длиной диффузии позитрона, что обеспечивает более высокое разрешение ПЭТ-визуализации.

Если говорить о раке яичников, то с этой патологией связаны многочисленные диагностические и терапевтические трудности, обусловленные высокой частотой рецидивов и отдаленным метастазированием, а также высоким процентом случаев, выявленных на поздней стадии заболевания [65, 66]. До недавнего времени анти-HER2-терапия при опухолях данной локализации не рассматривалась из-за отрицательного опыта использования трастузумаба. Однако с появлением конъюгатов моноклональных антител с цитостатиками исследования в этом направлении возобновились. Так, в исследовании DESTINY-PanTumor02, посвященном изучению эффективности терапии трастузумабом-дерукстеканом при различных солидных опухолях, сообщалось о частоте объективного ответа (ЧОО) у 63–64% пациентов с HER2-позитивным раком яичников, что делает перспективным определение HER2-статуса при данной онкопатологии [67].

Изучение возможности использования молекул аффибоди при раке яичников с применением препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃Z_{HER2:V2}, проведенное Ни и соавт. [68], выявило высокую аккумуляцию соединения в опухолях, сверхэкспрессирующих HER2/neu, в то время как опухоли, негативные по экспрессии HER2/neu, препарат не накапливали. К недостаткам [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃Z_{HER2:V2}, обнаруженным в ходе исследования, относится его высокая аккумуляция почками, что потенциально может приводить к нефротоксичности. Однако предполагается, что в клинической практике этот недостаток может быть устранен путем повышенной гидратации пациентов.

Аффибоди для диагностики HER2-позитивного рака молочной железы

Сверхэкспрессия рецептора HER2 встречается в 15–20% случаев рака молочной железы (РМЖ) и традиционно ассоциирована с более агрессивным течением и, как следствие, худшим прогнозом. Несмотря на это, использование таргетной анти-HER2-терапии позволило приблизить общую выживаемость пациентов с HER2-положительным РМЖ к прогнозически более благоприятным молекулярно-генетическим подтипам [69]. На сегодняшний день в клинической практике применяются такие препараты, как трастузумаб, пертузумаб, лапатиниб, а также препараты нового класса – конъюгаты

Таблица 2. Радиофармпрепараты на основе аффибоди, находящиеся на разных стадиях клинических и доклинических испытаний

РФП	Метод визуализации	Таргетный рецептор	Этап исследования	Авторы, год
[^{99m} Tc]Tc-PDA-аффибоди	ОФЭКТ	PD-L1	Доклинический	Liang et al., 2022 [53]
[^{99m} Tc]Tc-AC12-GGGC	ОФЭКТ	B7-H3	Доклинический	Oroujeni et al., 2022 [56]
[^{99m} Tc]Tc-SYNT-179	ОФЭКТ	B7-H3	Доклинический	Oroujeni et al., 2023 [57]
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-Z _{TRI}	ПЭТ	PDGFR β	Доклинический	Cai et al., 2023 [58]
[¹⁸ F]AlF-NOTA-HER2	ПЭТ	HER2	Доклинический	Han et al., 2022 [64]
[^{99m} Tc]Tc-(HE) ₃ Z _{HER2-V2}	ОФЭКТ	HER2	Доклинический	Hu et al., 2024 [68]
[¹¹¹ In]In-ABY-002	ОФЭКТ	HER2	Клинический (I фаза)	Baum et al., 2010 [72]
[⁶⁸ Ga]Ga-ABY-002	ПЭТ	HER2	Клинический (I фаза)	Baum et al., 2010 [72]
[¹¹¹ In]In-ABY-025	ОФЭКТ	HER2	Клинический (I фаза)	Sörensen et al., 2014 [73]
[⁶⁸ Ga]Ga-ABY-025	ПЭТ	HER2	Клинический (I фаза)	Sörensen et al., 2016 [74]
[⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-Mal-Cys-MZHer342	ПЭТ	HER2	Клинический (I фаза)	Miao et al., 2022 [75]
[⁶⁸ Ga]Ga-ABY-025	ПЭТ	HER2	Клинический (II фаза)	Alhuseinalkhudhur et al., 2023 [76]
[⁶⁸ Ga]Ga-ABY-025	ПЭТ	HER2	Клинический (II фаза)	Altena et al., 2024 [77]
[^{99m} Tc]Tc-ZHER2:41071	ОФЭКТ	HER2	Клинический (I фаза)	Bragina et al., 2023 [78]

моноклональных антител с цитостатиками (трастузумаб-эмтансин и трастузумаб-дерукстекан) [70, 71].

К настоящему времени проведен ряд испытаний, в которых аффибоди использовали в качестве таргетного агента для радионуклидной диагностики статуса HER2/neu у больных с операбельным, местно-распространенным и метастатическим раком молочной железы.

Первое клиническое исследование молекулы аффибоди ABY-002, меченной индием-111 и галлием-68, было проведено Baum и соавт. [72] в 2005 году с целью изучения безопасности, фармакокинетики и возможности визуализации опухолевых очагов у больных раком молочной железы. Было установлено, что препараты [¹¹¹In]In-ABY-002 и [⁶⁸Ga]Ga-ABY-002 быстро элиминировались из кровотока, что позволяло проводить ОФЭКТ и ПЭТ уже через 2–3 ч после инъекции. Выявлена также эффективность радионуклидной визуализации опухоли с использованием этих препаратов: у всех пациенток отмечалось накопление исследуемых соединений в HER2-положительных опухолях. Кроме того, в одном случае с помощью [⁶⁸Ga]Ga-ABY-002 обнаружен метастаз опухоли в мышцу (квадрицепс), тогда как при ПЭТ с ¹⁸F-ФДГ данное образование не обнаружили. Несмотря на полученные положительные результаты, препараты [¹¹¹In]In-ABY-002 и [⁶⁸Ga]Ga-ABY-002 имеют и недостатки, такие как высокое накопление в печени и почках, что существенно ограничивает визуализацию тканей в соответствующих областях; так, не удалось обнаружить метастатиче-

ское поражение печени у одной из пациенток и метастаз в надпочечник у другой.

Следующим этапом стало изучение молекулы аффибоди второго поколения (ABY-025). В исследование Sörensen и соавт. [73] вошли семь пациенток с метастатическим раком молочной железы: пять – с HER2-положительным и две – с HER2-отрицательным. Как и в исследовании с ABY-002, введение [¹¹¹In]In-ABY-025 было безопасным и не сопровождалось нежелательными явлениями. По данным ОФЭКТ, помимо четкой визуализации HER2-положительных опухолей, наблюдалось слабое накопление изучаемого препарата в HER2-отрицательных очагах, что объяснялось присутствием определенного количества рецептора HER2 на поверхности опухолевых клеток. В ходе исследования были визуализированы метастатические очаги в печени, не выявленные при использовании молекулы ABY-002. Интересной особенностью проведенного анализа стало обнаружение метастаза опухоли в головной мозг, ранее не определяемого с помощью ПЭТ с ¹⁸F-ФДГ, а также выявление HER2-отрицательного метастаза опухоли у больной с положительным HER2-статусом первичной опухоли молочной железы. Основным же выявленным недостатком стала невозможность определения метастатических узлов размером менее 1 см.

Поскольку причиной низкой визуализации малых опухолевых очагов могла быть низкая разрешающая способность ОФЭКТ, проведено исследование препарата [⁶⁸Ga]Ga-ABY-025 с использованием ПЭТ.

Анализ 16 пациенток с метастатическим РМЖ, проведенный Sörensen и соавт. [74], показал хорошую визуализацию очагов небольшого размера, что позволяло обнаружить метастазы опухоли молочной железы в печени, костях, лимфоузлах, головном мозге и других органах. Кроме того, у двух пациенток после исследования с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$ статус HER2 в первичной опухоли молочной железы изменили с отрицательного на положительный. При этом в большинстве случаев обнаружены различия в экспрессии HER2 в первичной опухоли и в метастатических очагах.

Miao и соавт. [75] изучали применение меченной галлием-68 молекулы аффибоди NOTA-Mal-Cys-MZHer342 в клиническом исследовании, в которое вошли 24 больные РМЖ. Важная особенность анализа состояла в проведении ПЭТ/КТ «по требованию» врачей-онкологов для решения трудных диагностических случаев: у шести пациенток с целью дифференцировки метастазов из двух синхронных РМЖ либо синхронного ЗНО другой локализации; у 13 пациенток – для определения HER2-статуса образований, недоступных для биопсии; у шести – для оценки HER2-статуса первичной опухоли и метастазов и у четырех – для оценки HER2-статуса в разных метастатических очагах. Во всех случаях сопоставляли SUVmax препарата $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Mal-Cys-MZHer342}$ в опухолевых очагах с результатами иммуногистохимического исследования. Проведенный анализ показал, что использование препарата $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Mal-Cys-MZHer342}$ позволяло определять сверхэкспрессию HER2 в опухолевой ткани со специфичностью 91.7% и отрицательную экспрессию HER2 со специфичностью 84.6%, изменение статуса HER2/neu с положительного на отрицательный отмечено у семи пациенток.

В исследование II фазы, проведенном Alhuseinalkhudhur и соавт. [76], вошли 19 пациенток с первичным РМЖ II–III стадии, которым запланировано проведение неoadъювантной терапии с двойной таргетной анти-HER2-блокадой, а также 21 пациентка с метастатическим раком молочной железы на фоне системной терапии. Предпосылкой к проведению этого анализа послужило предположение о том, что накопление $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$ может быть предиктором раннего ответа опухоли молочной железы на проводимую анти-HER2-терапию. Согласно дизайну исследования, пациенткам для оценки раннего метаболического ответа проводили ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ до и после двух курсов химио/таргетной терапии и ПЭТ/КТ с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$ до лечения.

Во всех случаях для оценки HER2-статуса на фоне проводимого лечения выполняли повторную биопсию одного из опухолевых очагов. Сравнение

результатов ПЭТ с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$ и данных биопсии у 12 пациенток выявили несоответствие статуса HER2/neu, что было объяснено рядом причин. В число таких причин вошли трудности забора опухолевого материала (отрицательная экспрессия HER2 при положительном ПЭТ-исследовании чаще встречалась при заборе материала из печени или костей), межопухолевая гетерогенность, проблемы связывания препарата с HER2-рецепторами, что представляло особый интерес, так как положительный результат биопсии при низком накоплении $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$ был ассоциирован с худшим прогнозом в группе метастатического РМЖ. Кроме того, в ходе исследования выявлена обратная корреляция между числом предыдущих линий лечения и метаболическим ответом на текущую линию терапии: чем больше линий лечения получено, тем больший уровень накопления РФП требовался для метаболического ответа. Тем не менее, учитывая, что данная корреляция наблюдалась только в 30% случаев, а также то, что не обнаружено значимого соответствия ПЭТ с аффибоди и результатами биопсии, исследование III фазы с препаратом $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$ решили не проводить.

Altena и соавт. [77] провели первое клиническое исследование $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$, направленное на возможность визуализации метастатического РМЖ с HER2-low-опухолями. В исследование вошли восемь пациенток с отрицательным (ИГХ 1+) и неопределенным (ИГХ 2+, FISH отрицательный) HER2-статусом, а также две пациентки с отсутствием экспрессии HER2 (ИГХ 0), ранее определенным по результатам биопсии первичной опухоли молочной железы. У одной пациентки отсутствие экспрессии HER2 сопровождалось минимальным накоплением $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$, что коррелировало с результатами ИГХ-исследования. В другом случае накопление препарата было выше и не соответствовало статусу, определенному по данным биопсии HER2. Детальное изучение опухолевого очага выявило гетерогенность экспрессии HER2 с более высоким накоплением РФП по периферии и низким в центре. Таким образом, вероятнее всего, биопсийный материал был взят из «холодного» центрального участка, тогда как основной массив опухоли имел HER2-low-статус. Еще в двух случаях наблюдалось высокое накопление в ранее не верифицированных очагах, что могло бы свидетельствовать о сверхэкспрессии HER2 и потенциальной возможности назначения первой линии анти-HER2-терапии. В остальных восьми случаях отмечено пропорциональное HER2-статусу накопление $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-ABY-025}$, что соответствовало результатам многочисленных исследований данного РФП. Таким

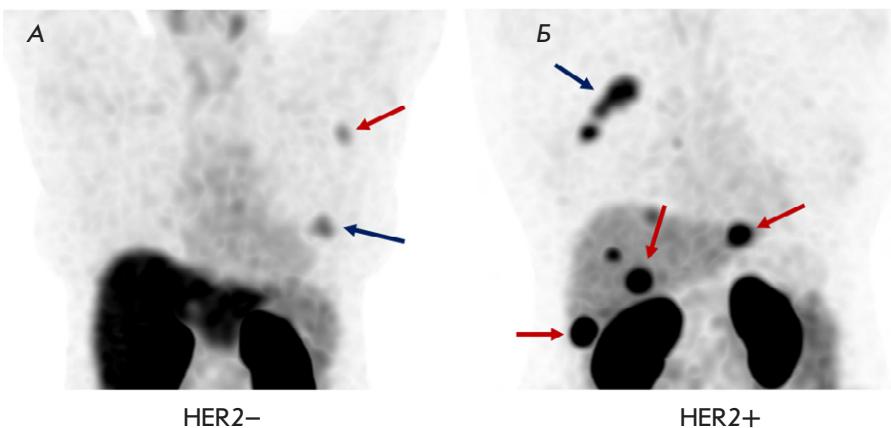


Рис. 2. Накопление препарата $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-ZHER2:41071 у больных раком молочной железы через 2 ч после его введения в дозе 1000 мкг: А – пациентка с HER2-отрицательным раком молочной железы (синей стрелкой указана опухоль молочной железы, красной – метастатический аксилярный лимфатический узел); Б – пациентка с HER2-положительным раком молочной железы (синей стрелкой указана опухоль молочной железы, красной – метастазы в печень)

образом, ПЭТ с применением $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-ABY-025 может служить дополнительным методом диагностики для отбора пациентов, которым показана терапия конъюгатами моноклональных антител с цитостатиками.

Первое клиническое исследование молекул аффиди для таргетной радионуклидной диагностики HER2-позитивного рака молочной железы на территории Российской Федерации было проведено Bragina и соавт. [78] с использованием радиофармацевтического препарата $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-ZHER2:41071. В исследование вошла 31 больная РМЖ, не получавшая какого-либо локального/системного лечения. У всех больных оценивали безопасность, переносимость, фармакокинетику препарата, а также сопоставляли накопление РФП опухолью с результатами ИГХ/FISH. Пациентки были поделены на три когорты в зависимости от введенной дозы $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-ZHER2:41071: 500, 1000 и 1500 мкг. У всех больных отмечена хорошая переносимость РФП на всех этапах динамического наблюдения. При этом препарат в дозе 1000 мкг показал не только лучшие фармакокинетические параметры спустя 2 ч после введения, но и лучшие показатели разделения опухолей молочной железы в зависимости от статуса HER2/neu. Отличительной особенностью препарата $[^{99m}\text{Tc}]$ Tc-ZHER2:41071 стало достаточно низкое его накопление нормальной тканью печени, что позволило визуализировать у одной из пациенток метастаз в печень, позднее подтвержденный данными компьютерной томографии с контрастированием. Клинический пример использования РФП представлен на рис. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественные опухоли уверенно занимают одни из лидирующих позиций по показателям заболеваемости и смертности по всему миру. В связи с этим

для определения оптимальной тактики локального и системного лечения особую роль играет диагностический этап, включающий изучение клинико-инструментальных, морфологических и молекулярных параметров [6]. Учитывая объективные сложности, обусловленные невозможностью одномоментной оценки распространенности опухолевого процесса, необходимостью многочисленных инвазивных манипуляций, дополнительными финансовыми затратами и порой субъективной оценкой полученных результатов, особенно актуальным представляется внедрение дополнительных методов обследования больных со злокачественными заболеваниями [7–10]. Многообещающим представляется развитие таргетной радионуклидной визуализации, совмещающей не только возможность анатомического стадирования, но и оценки молекулярного профиля опухолевых узлов, что в совокупности приводит к оптимизации обследования и сокращает количество инвазивных вмешательств [23, 24].

Как показано в данном обзоре, аффиди являются перспективными агентами для использования в различных областях биотехнологии и клинической медицины, в частности, для применения в биолюминесцентной ультразвуковой визуализации и создании противовирусных и таргетных терапевтических препаратов [38–40]. При этом к настоящему времени основное количество исследований посвящено изучению радиоконъюгатов аффиди с различными изотопами для таргетной визуализации злокачественных образований различной локализации. Проведенные доклинические испытания во всех случаях показали высокую аффинность аффиди к таким молекулярным мишениям, как рецептор эпидермального фактора роста типа 2 (HER2/neu) [59], лиганд рецептора программируемой гибели клеток (PD-L1) [52], рецептора B7-H3 (CD276) [58], рецептора тромбоцитарного фактора роста типа бета

(PDGFR β) и пр., а также возможность их опухолевой визуализации с использованием методов ПЭТ и ОФЭКТ.

Убедительно выглядят результаты многочисленных клинических испытаний аффибоди для HER2-позитивного рака молочной железы у человека, которые показали хорошую переносимость радиофармацевтических препаратов и отсутствие нежелательных явлений на всех этапах динамического наблюдения [71–75]. С клинических позиций особую важность имеет возможность анатомической визуализации опухолевых структур в молочной железе, регионарных лимфатических узлах, удаленных

органах и тканях, а также молекулярная визуализация экспрессии HER2/neu в выявленных структурах, сопоставимая с данными иммуногистохимического и FISH-анализа [76, 77]. Проведенный анализ однозначно свидетельствует о высокой перспективности использования альтернативных каркасных белков неиммуноглобулиновой природы, к которым относятся молекулы аффибоди, для клинической медицины. ●

Работы поддержаны грантом
Министерства науки и высшего образования
РФ № 075-15-2024-536.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–263. doi: 10.3322/caac.21834
- Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024.
- Cai A, Chen Y, Wang LS, et al. Depicting Biomarkers for HER2-Inhibitor Resistance: Implication for Therapy in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2024;16(15):2635. doi: 10.3390/cancers16152635
- Cai M, Song XL, Li XA, et al. Current therapy and drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Resist Updat.* 2023;68:100962. doi: 10.1016/j.drup.2023.100962
- Wang L, Wang X, Zhu X, et al. Drug resistance in ovarian cancer: from mechanism to clinical trial. *Mol Cancer.* 2024;23(1):66. doi: 10.1186/s12943-024-01967-3
- Passaro A, Al Bakir M, Hamilton EG, et al. Cancer biomarkers: Emerging trends and clinical implications for personalized treatment. *Cell.* 2024;187(7):1617–1635. doi: 10.1016/j.cell.2024.02.041
- Chae KJ, Hong H, Yoon SH, et al. Non-diagnostic Results of Percutaneous Transthoracic Needle Biopsy: A Meta-analysis. *Sci Rep.* 2019;9(1):12428. doi: 10.1038/s41598-019-48805-x
- Laurent F, Montaudon M, Latrabe V, Bégueret H. Percutaneous biopsy in lung cancer. *Eur J Radiol.* 2003;45(1):60–68. doi: 10.1016/s0720-048x(02)00286-3
- Kemeny MM, Busch-Devereaux E, Merriam LT, O’Hea BJ. Cancer surgery in the elderly. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2000;14(1):169–192. doi: 10.1016/s0889-8588(05)70283-5
- Nicolò E, Serafini MS, Munoz-Arcos L, et al. Real-time assessment of HER2 status in circulating tumor cells of breast cancer patients: Methods of detection and clinical implications. *J Liq Biopsy.* 2023;2:100117. doi: 10.1016/j.jlb.2023.100117
- Hou Y, Nitta H, Li Z. HER2 Intratumoral Heterogeneity in Breast Cancer, an Evolving Concept. *Cancers (Basel).* 2023;15(10):2664. doi: 10.3390/cancers15102664
- Hamilton E, Shastry M, Shiller SM, Ren R. Targeting HER2 heterogeneity in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2021;100:102286. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102286
- Laprovitera N, Rieffoli M, Ambrosini E, et al. Cancer of Unknown Primary: Challenges and Progress in Clinical Management. *Cancers (Basel).* 2021;13(3):451. doi: 10.3390/cancers13030451
- Harms PW, Frankel TL, Moutafi M, et al. Multiplex Immunohistochemistry and Immunofluorescence: A Practical Update for Pathologists. *Mod Pathol.* 2023;36(7):100197. doi: 10.1016/j.modpat.2023.100197
- Lino-Silva LS, Gamboa-Domínguez A, Zúñiga-Tamayo D, López-Correa P. Interobserver variability in colorectal cancer and the 2016 ITBCC consensus. *Mod Pathol.* 2019;32(1):159–160. doi: 10.1038/s41379-018-0027-5
- Wu Q, Xu L. Challenges in HER2-low breast cancer identification, detection, and treatment. *Transl Breast Cancer Res.* 2024;5:3. doi: 10.21037/tbcr-23-48
- Rulten SL, Grose RP, Gatz SA, et al. The Future of Precision Oncology. *Int J Mol Sci.* 2023;24(16):12613. doi: 10.3390/ijms24162613
- Langbein T, Weber WA, Eiber M. Future of Theranostics: An Outlook on Precision Oncology in Nuclear Medicine. *J Nucl Med.* 2019;60(2):13S–19S. doi: 10.2967/jnumed.118.220566
- Idée JM, Louquet S, Ballet S, Corot C. Theranostics and contrast-agents for medical imaging: a pharmaceutical company viewpoint. *Quant Imaging Med Surg.* 2013;3(6):292–297. doi: 10.3978/j.issn.2223-4292.2013.12.06
- Klain M, Nappi C, Zampella E, et al. Ablation rate after radioactive iodine therapy in patients with differentiated thyroid cancer at intermediate or high risk of recurrence: a systematic review and a meta-analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2021;48(13):4437–4444. doi: 10.1007/s00259-021-05440-x
- Bauckneht M, Ciccarese C, Laodicella R, et al. Theranostics revolution in prostate cancer: Basics, clinical applications, open issues and future perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2024;124:102698. doi: 10.1016/j.ctrv.2024.102698
- Kasi PB, Mallela VR, Ambroziewicz F, Trailin A, Liška V, Hemminki K. Theranostics Nanomedicine Applications for Colorectal Cancer and Metastasis: Recent Advances. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):7922. doi: 10.3390/ijms24097922
- Song Y, Zou J, Castellanos EA, et al. Theranostics – a sure cure for cancer after 100 years? *Theranostics.* 2024;14(6):2464–2488. doi: 10.7150/thno.96675
- Burkett BJ, Bartlett DJ, McGarrah PW, et al. A Review of Theranostics: Perspectives on Emerging Approaches and Clinical Advancements. *Radiol Imaging Cancer.* 2023;5(4):e220157. doi: 10.1148/rycan.220157
- Bodei L, Herrmann K, Schöder H, et al. Radiotheranostics in oncology: current challenges and emerging opportunities. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(8):534–550. doi: 10.1038/s41571-022-00652-y

26. Wei Z, Li B, Wen X, et al. Engineered Antibodies as Cancer Radiotheranostics. *Adv Sci (Weinh)*. 2024;11(30):e2402361. doi: 10.1002/advs.202402361
27. Bragina OD, Chernov VI, Garbukov EYu, et al. Possibilities of radionuclide diagnostics of Her2-positive breast cancer using technetium-99m-labeled target molecules: the first experience of clinical use. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021;20(1):23-30. doi: 10.20538/1682-0363-2021-1-23-30
28. Tolmachev V, Vorobyeva A. Radionuclides in Diagnostics and Therapy of Malignant Tumors: New Development. *Cancers (Basel)*. 2022;14(2):297. doi: 10.3390/cancers14020297
29. Bragina OD, Deyev SM, Chernov VI, Tolmachev VM. The Evolution of Targeted Radionuclide Diagnosis of HER2-Positive Breast Cancer. *Acta Naturae*. 2022;14(2):4-15. doi: 10.32607/actanaturae.11611
30. Luo R, Liu H, Cheng Z. Protein scaffolds: antibody alternatives for cancer diagnosis and therapy. *RSC Chem Biol*. 2022;3(7):830-847. doi: 10.1039/d2cb00094f
31. Tolmachev V, Orlova A, Sørensen J. The emerging role of radionuclide molecular imaging of HER2 expression in breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2021;72:185-197. doi: 10.1016/j.semancer.2020.10.005
32. Shipunova VO, Deyev SM. Artificial Scaffold Polypeptides As an Efficient Tool for the Targeted Delivery of Nanostructures In Vitro and In Vivo. *Acta Naturae*. 2022;14(1):54-72. doi: 10.32607/actanaturae.11545
33. Liu J, Cui D, Jiang Y, et al. Selection and characterization of a novel affibody peptide and its application in a two-site ELISA for the detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein. *Int J Biol Macromol*. 2021;166:884-892. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.245
34. Zhu J, Kamara S, Cen D, et al. Correction: Generation of novel affibody molecules targeting the EBV LMP2A N-terminal domain with inhibiting effects on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Death Dis*. 2020;11(6):494. doi: 10.1038/s41419-020-2692-9
35. Liu S, Gao C, Tong Z, et al. A highly sensitive electrochemiluminescence method for abrin detection by a portable biosensor based on a screen-printed electrode with a phage display affibody as specific labeled probe. *Anal Bioanal Chem*. 2022;414(2):1095-1104. doi: 10.1007/s00216-021-03735-4
36. Barozzi A, Lavoie RA, Day KN, et al. Affibody-Binding Ligands. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3769. doi: 10.3390/ijms21113769
37. DiRusso CJ, Dashtiahangar M, Gilmore TD. Scaffold proteins as dynamic integrators of biological processes. *J Biol Chem*. 2022;298(12):102628. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102628
38. Ståhl S, Gräslund T, Eriksson Karlström A, et al. Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications. *Trends Biotechnol*. 2017;35(8):691-712. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.04.007
39. Hersh J, Yang YP, Roberts E, et al. Targeted Bioluminescent Imaging of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Using Nanocarrier-Complexed EGFR-Binding Affibody-Gaussia Luciferase Fusion Protein. *Pharmaceutics*. 2023;15(7):1976. doi: 10.3390/pharmaceutics15071976
40. Du W, Jiang P, Li Q, et al. Novel Affibody Molecules Specifically Bind to SARS-CoV-2 Spike Protein and Efficiently Neutralize Delta and Omicron Variants. *Microbiol Spectr*. 2023;11(1):e0356222. doi: 10.1128/spectrum.03562-22
41. Gabriele F, Palerma M, Ippoliti R, Angelucci F, Pitari G, Ardin M. Recent Advances on Affibody- and DARPin-Conjugated Nanomaterials in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10):8680. doi: 10.3390/ijms24108680
42. Cai W, Lv W, Meng L, Duan Y, Zhang L. The Combined Effect of Nanobubble-IR783-HPPH-Affibody Complex and Laser on HER2-Positive Breast Cancer. *Int J Nanomedicine*. 2023;18:339-351. doi: 10.2147/IJN.S387409
43. Wu Y, Li H, Yan Y, et al. Affibody-Modified Gd@C-Dots with Efficient Renal Clearance for Enhanced MRI of EGFR Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:4691-4703. doi: 10.2147/IJN.S244172
44. Zhou H, Liu H, Zhang Y, et al. «PFH/AGM-CBA/HSV-TK/LIPOSOME-Affibody»: Novel Targeted Nano Ultrasound Contrast Agents for Ultrasound Imaging and Inhibited the Growth of ErbB2-Overexpressing Gastric Cancer Cells. *Drug Des Devel Ther*. 2022;16:1515-1530. doi: 10.2147/DDDT.S351623
45. Pinto Salgueiro G, Yilmaz O, Nogueira M, Torres T. Interleukin-17 Inhibitors in the Treatment of Hidradenitis Suppurativa. *BioDrugs*. 2025;39(1):53-74. doi: 10.1007/s40259-024-00687-w
46. Kerschbaumer A, Smolen JS, Ferreira RJO, et al. Efficacy and safety of pharmacological treatment of psoriatic arthritis: a systematic literature research informing the 2023 update of the EULAR recommendations for the management of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2024;83(6):760-774. doi: 10.1136/ard-2024-225534
47. Ahmadzadehfar H, Seifert R, Afshar-Oromieh A, et al. Prostate Cancer Theranostics With ¹⁷⁷Lu-PSMA. *Semin Nucl Med*. 2024;54(4):581-590. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2024.02.007
48. Salih S, Alkatheeri A, Alomaim W, Elliyanti A. Radiopharmaceutical Treatments for Cancer Therapy, Radionuclides Characteristics, Applications, and Challenges. *Molecules*. 2022;27(16):5231. doi: 10.3390/molecules27165231
49. Zhang L, Zhang H. Recent advances of affibody molecules in biomedical applications. *Bioorg Med Chem*. 2024;113:117923. doi: 10.1016/j.bmc.2024.117923
50. Rouanne M, Radulescu C, Adam J, Allory Y. PD-L1 testing in urothelial bladder cancer: essentials of clinical practice. *World J Urol*. 2021;39(5):1345-1355. doi: 10.1007/s00345-020-03498-0
51. Mucileanu A, Chira R, Mircea PA. PD-1/PD-L1 expression in pancreatic cancer and its implication in novel therapies. *Med Pharm Rep*. 2021;94(4):402-410. doi: 10.15386/mpr-2116
52. Lin KX, Istl AC, Quan D, et al. PD-1 and PD-L1 inhibitors in cold colorectal cancer: challenges and strategies. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(12):3875-3893. doi: 10.1007/s00262-023-03520-5
53. Liang Z, Hu X, Hu H, et al. Novel small ^{99m}Tc-labeled affibody molecular probe for PD-L1 receptor imaging. *Front Oncol*. 2022;12:1017737. doi: 10.3389/fonc.2022.1017737
54. Zhao B, Li H, Xia Y, et al. Immune checkpoint of B7-H3 in cancer: from immunology to clinical immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):153. doi: 10.1186/s13045-022-01364-7
55. Getu AA, Tigabu A, Zhou M, et al. New frontiers in immune checkpoint B7-H3 (CD276) research and drug development. *Mol Cancer*. 2023;22(1):43. doi: 10.1186/s12943-023-01751-9
56. Oroujeni M, Bezverkhnia EA, Xu T, et al. Evaluation of an Affibody-Based Binder for Imaging of Immune Check-Point Molecule B7-H3. *Pharmaceutics*. 2022;14(9):1780. doi: 10.3390/pharmaceutics14091780
57. Oroujeni M, Bezverkhnia EA, Xu T, et al. Evaluation of affinity matured Affibody molecules for imaging of the immune checkpoint protein B7-H3. *Nucl Med Biol*. 2023;124-125:108384. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2023.108384
58. Cai H, Li Z, Shi Q, et al. Preclinical evaluation of ⁶⁸Ga-

- radiolabeled trimeric affibody for PDGFR β -targeting PET imaging of hepatocellular carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2023;50(10):2952-2961. doi: 10.1007/s00259-023-06260-x
59. Papadopoulos N, Lennartsson J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Mol Aspects Med*. 2018;62:75-88. doi: 10.1016/j.mam.2017.11.007
60. Ivanova M, Porta FM, D'Ercole M, et al. Standardized pathology report for HER2 testing in compliance with 2023 ASCO/CAP updates and 2023 ESMO consensus statements on HER2-low breast cancer. *Virchows Arch*. 2024;484(1):3-14. doi: 10.1007/s00428-023-03656-w
61. Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2023;41(22):3867-3872. doi: 10.1200/JCO.22.02864
62. Giugliano F, Carnevale Schianca A, Corti C, et al. Unlocking the Resistance to Anti-HER2 Treatments in Breast Cancer: The Issue of HER2 Spatial Distribution. *Cancers (Basel)*. 2023;15(5):1385. doi: 10.3390/cancers15051385
63. Schrijver WAME, Suijkerbuijk KPM, van Gils CH, et al. Receptor Conversion in Distant Breast Cancer Metastases: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(6):568-580. doi: 10.1093/jnci/djx273
64. Han J, Chen Y, Zhao Y, et al. Pre-Clinical Study of the [^{18}F]AlF-Labeled HER2 Affibody for Non-Invasive HER2 Detection in Gastric Cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:803005. doi: 10.3389/fmed.2022.803005
65. Stewart D, Cristea M. Antibody-drug conjugates for ovarian cancer: current clinical development. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2019;31(1):18-23. doi: 10.1097/GCO.0000000000000515
66. Luo H, Xu X, Ye M, et al. The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191972. doi: 10.1371/journal.pone.0191972
67. Murciano-Goroff YR, Suehnholz SP, Drilon A, Chakravarty D. Precision Oncology: 2023 in Review. *Cancer Discov*. 2023;13(12):2525-2531. doi: 10.1158/2159-8290.CD-23-1194
68. Hu X, Hu H, Li D, et al. Affibody-based molecular probe $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(HE)₃Z_{HER2:V2} for non-invasive HER2 detection in ovarian and breast cancer xenografts. *Open Med (Wars)*. 2024;19(1):20241027. doi: 10.1515/med-2024-1027
69. Swain SM, Shastry M, Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov*. 2023;22(2):101-126. doi: 10.1038/s41573-022-00579-0
70. Dowling GP, Keelan S, Toomey S, et al. Review of the status of neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer. *Front Oncol*. 2023;13:1066007. doi: 10.3389/fonc.2023.1066007
71. Zimmerman BS, Esteva FJ. Next-Generation HER2-Targeted Antibody-Drug Conjugates in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2024;16(4):800. doi: 10.3390/cancers16040800
72. Baum RP, Prasad V, Müller D, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic ^{111}In - or ^{68}Ga -labeled affibody molecules. *J Nucl Med*. 2010;51(6):892-897. doi: 10.2967/jnunmed.109.073239
73. Sørensen J, Sandberg D, Sandström M, et al. First-in-human molecular imaging of HER2 expression in breast cancer metastases using the ^{111}In -ABY-025 affibody molecule. *J Nucl Med*. 2014;55(5):730-735. doi: 10.2967/jnunmed.113.131243
74. Sørensen J, Velikyan I, Sandberg D, et al. Measuring HER2-Receptor Expression In Metastatic Breast Cancer Using $[^{68}\text{Ga}]$ ABY-025 Affibody PET/CT. *Theranostics*. 2016;6(2):262-271. doi: 10.7150/thno.13502
75. Miao H, Sun Y, Jin Y, et al. Application of a Novel ^{68}Ga -HER2 Affibody PET/CT Imaging in Breast Cancer Patients. *Front Oncol*. 2022;12:894767. doi: 10.3389/fonc.2022.894767
76. Alhuseinalkhudhur A, Lindman H, Liss P, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Targeting $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-ABY-025 PET/CT Predicts Early Metabolic Response in Metastatic Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2023;64(9):1364-1370. doi: 10.2967/jnunmed.122.265364
77. Altena R, Burén SA, Blomgren A, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) PET Imaging of HER2-Low Breast Cancer with $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-ABY-025: Results from a Pilot Study. *J Nucl Med*. 2024;65(5):700-707. doi: 10.2967/jnunmed.123.266847
78. Bragina O, Chernov V, Larkina M, et al. Phase I clinical evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled Affibody molecule for imaging HER2 expression in breast cancer. *Theranostics*. 2023;13(14):4858-4871. doi: 10.7150/thno.86770

УДК 616-006.04

Персонализированные мРНК-вакцины в онкологии: возможности, сложности и перспективы

А. А. Ибрагимова¹, А. А. Федоров¹, К. М. Кириленко², Е. Л. Чойнзонов¹, Е. В. Денисов¹,
М. Р. Патышева^{1*}

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634009 Россия

²Центр системной биоинформатики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

*E-mail: patysheva_mr@onco.tnimc.ru

Поступила в редакцию 31.05.2025

Принята к печати 06.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27707

РЕФЕРАТ Противоопухолевые вакцины на основе мРНК представляют собой инновационный подход к лечению онкологических заболеваний. Противоопухолевые мРНК-вакцины структурно основаны на специфических опухолевых антигенах, что позволяет активировать иммунную систему пациента для борьбы с раковыми клетками. На сегодняшний день проводятся клинические испытания мРНК-вакцин против различных типов опухолей, включая меланому, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак молочной железы и другие. Благодаря безопасности и гибкости применения, эти препараты имеют значительный потенциал для повышения эффективности лечения злокачественных новообразований и увеличения продолжительности жизни пациентов. В обзоре представлена информация о развитии технологии производства препаратов на основе мРНК, алгоритме создания персонализированных противоопухолевых мРНК-вакцин, практических аспектах их применения, а также рассмотрены актуальные клинические исследования персонализированных мРНК-вакцин в онкологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА мРНК-вакцина, рак, иммунотерапия, неоантигены, липосомы, клинические исследования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЗНО – злокачественные новообразования; АПК – антигенпрезентирующие клетки; ЛНЧ – липидные наночастицы; ЛПП – липополиплексы; ПЭГ – полиэтиленгликоль; СрG-ОДН – СрG-олигодезоксинуклеотиды; БТЛП – биотехнологические лекарственные препараты; CTLA-4 – цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4; РD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели; РD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день онкологические заболевания остаются одной из важнейших медико-социальных проблем. Актуальность проблемы злокачественных новообразований (ЗНО) обусловлена их высокой распространенностью, а также сложностью профилактики и лечения [1]. Несмотря на значительный прогресс в разработке и оптимизации методов лечения ЗНО, показатели общей и безрецидивной выживаемости пациентов остаются неудовлетворительными [1]. Так, продолжительность жизни более 50% пациентов в одном из наиболее распространенных типов ЗНО – рак легкого – не превышает 3.5 лет после установления диагноза [2].

Для повышения эффективности лечения и увеличения продолжительности и качества жизни па-

циентов необходимы разработка и внедрение новых терапевтических подходов. В этом контексте особый интерес представляет модуляция противоопухолевого иммунного ответа. Так, включение иммунотерапии ингибиторами иммунных контрольных точек в клинические рекомендации значительно повысило эффективность лечения меланомы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников и других типов ЗНО [3, 4]. Одним из перспективных направлений иммунотерапии является применение противоопухолевых вакцин на основе нуклеиновых кислот (ДНК и мРНК).

Использование мРНК в качестве привлекательной платформы для создания противоопухолевых вакцин основано на ее способности доставлять специфические транскрипты, несущие информацию

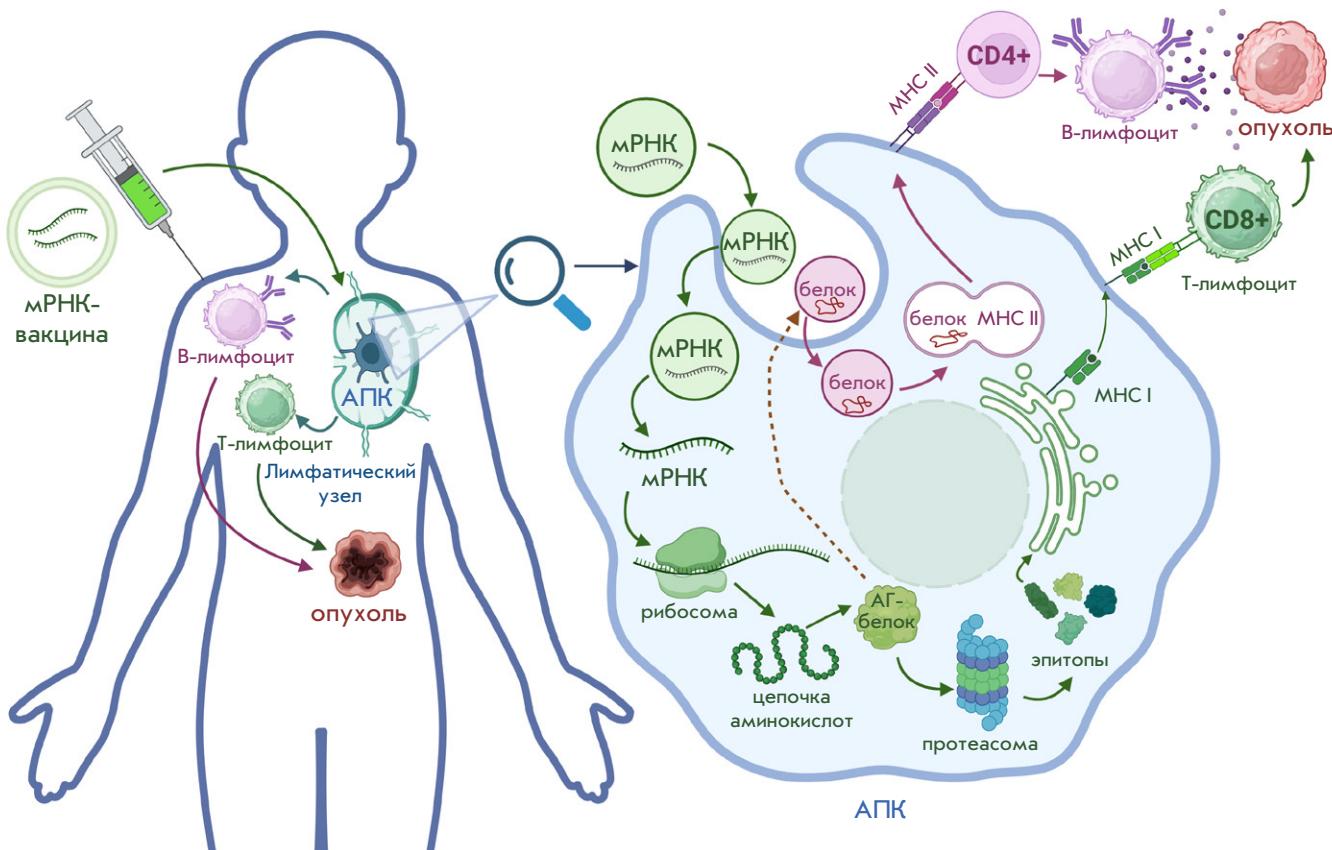


Рис. 1. Механизм действия противоопухолевой мРНК-вакцины. мРНК – матричная РНК, АПК – антигенпрезентирующая клетка, АГ-белок – антигенный белок

об опухолевых антигенах, в цитоплазму антиген-презентирующих клеток (АПК) пациента для последующей экспрессии целевого антигена. После процессинга ассоциированные с целевым антигеном белки (эпитопы) могут быть представлены на поверхности АПК путем связывания с молекулами главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов – МНС I и МНС II соответственно (рис. 1). Это запускает активацию иммунной системы, включая реакцию CD4+ Т-хеллеров, гуморальный ответ В-клеток и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов [5]. Вакцины платформы на основе мРНК имеют такие преимущества, как:

- 1) Улучшенная стабильность и трансляция. Современные методы модификации нуклеотидных последовательностей и совершенствования систем доставки делают мРНК более устойчивой к деградации и обеспечивают высокий уровень трансляции в клетках [6].
- 2) Иммуностимулирующие свойства мРНК. Сама молекула мРНК обладает способностью активировать врожденный иммунный ответ, что усиливает эффективность вакцины [7].

3) Безопасность. В отличие от ДНК-вакцин и вирусных векторов, мРНК не интегрируется в геном клетки-хозяина, что исключает риск инсерционного мутагенеза [8].

4) Относительная доступность производства персонализированных препаратов. На основании информации о целевой последовательности мРНК необходимо синтезировать только ДНК-матрицу, которая обеспечивает получение многих копий мРНК с помощью транскрипции *in vitro*. Это делает создание мРНК-вакцины значительно более дешевым, чем вакцин на основе ДНК или вирусных векторов.

В обзоре рассмотрены возможности терапевтических мРНК-вакцин в случае солидных опухолей, акцентируя внимание на синтез мРНК, системы доставки мРНК к антигенпрезентирующим клеткам и текущее состояние клинических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ ЭТАПЫ В РАЗВИТИИ МРНК-ТЕХНОЛОГИЙ

Несмотря на то, что мРНК и процесс транскрипции были открыты в 60-х годах XX века, мало кто воспринимал возможность создания медицинских препаратов на их основе. Ситуация измени-



Рис. 2. История развития технологии производства и применения мРНК-вакцин. РЭА – раково-эмбриональный антиген, ДК – дендритные клетки, мРНК – матричная РНК

лась в 1984 году с получением биологически активной синтетической мРНК, которую в дальнейшем смогли использовать для регуляции экспрессии целевых генов с целью лечения заболеваний [9] (рис. 2). Дальнейшему изучению мРНК в качестве терапевтического агента препятствовала ее физическая нестабильность, а также плохое проникновение в клетки [10]. Однако в 1989 году была описана первая успешная трансфекция синтезированной мРНК люциферазы *Photinus pyralis* в клетки мыши с использованием катионного липида N-[1-(2,3-диолейлокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония хлорида, встроенного в липосому [11]. В 90-е годы почти все компании, занимающиеся разработкой мРНК-вакцин, предпочитали вкладывать ресурсы в другие направления, поскольку производство стабильной липосомной мРНК обходилось слишком дорого. Тем не менее исследования продолжались, и в 1990 году введение мРНК мышам показало возможность экспрессии синтетической мРНК в условиях *in vivo*

[12, 13]. А через три года была получена первая профилактическая мРНК-вакцина, кодирующая нуклеопротеин вируса гриппа для активации цитотоксических Т-клеток мышей [14].

Первый опыт формирования противоопухолевого иммунитета у мышей после внутримышечного введения мРНК, кодирующей ген эмбрионального опухолевого антигена (СЕА), был описан в 1995 году [15]. Позднее, в 1999 году на модели меланомы мыши показали, что введение в селезенку мРНК gp100, кодирующей гликопротеин матрикса меланосомы, тормозит опухолевый рост [16]. В это же время было инициировано клиническое исследование 1 фазы по активации антигенной презентации аутологичных дендритных клеток пациентов с раком предстательной железы с помощью синтетической мРНК, кодирующей простатспецифический антиген (PSA) [17]. В 2000 году Ингмар Хоэрр и соавт. установили, что прямые инъекции мРНК могут вызывать иммунный ответ у мышей [18], а затем, учи-

тывая перспективность разработки мРНК-вакцин, была создана компания CureVAC (Германия), которая по сей день входит в перечень ведущих компаний-разработчиков мРНК-вакцин [19].

Значительная часть фундаментальных идей по разработке мРНК-вакцин принадлежит Каталин Кариоко и Дрю Вайсману. В 1997 году, разрабатывая вакцину от ВИЧ на основе мРНК, исследователи отметили воспалительные реакции при введении вакцины мышам, когда мРНК связывалась в организме с Toll-подобными рецепторами, отвечающими за обнаружение чужеродных молекул [20]. Ученым удалось найти решение, которое легло в основу разработки следующего поколения мРНК-вакцин. Так, в 2005 году была опубликована ключевая работа и запатентован способ модификации одного из компонентов мРНК – уридуна в псевдоуридин – вследствие чего иммунная система переставала воспринимать мРНК как чужеродную, и синтез белка в клетке шел гораздо эффективнее [21, 22]. Кроме того, такая мРНК была стабильнее немодифицированной. В 2023 году Кариоко и Вайсман были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие, касающееся способа модификации нуклеозидных оснований [23].

Совершенствование технологий на основе мРНК позволило разработать эффективные мРНК-вакцины против COVID-19 таким фармацевтическим компаниям, как Moderna и Pfizer-BioNTech [6]. Успешное и широкое применение таких препаратов привело к быстрому развитию и оптимизации производственной цепочки мРНК-вакцин [24]. При этом мРНК-технологии подходят для создания препаратов не только против инфекционных заболеваний (вирусов бешенства, гриппа, Эпштейна–Барр, Зика, Нипах и др.), но и против онкологических заболеваний, например, рака предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы и немелкоклеточного рака легкого, привлекая внимание ученых и биотехнологических и фармацевтических компаний России, США, Германии, Китая и других стран [24]. В связи с этим в 2013 году было начато первое клиническое исследование персонализированной мРНК-вакцины против меланомы (NCT02035956) [25].

Перспективой современной противоопухолевой терапии является индивидуализация лечения. Показана высокая эффективность противоопухолевых мРНК-вакцин, направленных против опухолевых неоантител, которые образуются в злокачественных клетках в результате различных мутационных событий. Неоантитела можно разделить на две категории: общие и персонализированные [26, 27]. Первые являются общими у раз-

ных онкобольных, отсутствуют в нормальном геноме и потенциально могут использоваться в качестве терапевтических противоопухолевых вакцин широкого спектра действия [28, 29]. Персонализированные неоантитела уникальны для опухоли каждого отдельного пациента, они показали большую терапевтическую эффективность [30–32]. Процесс изготовления персонализированной противоопухолевой мРНК-вакцины начинается с определения спектра неоантителов опухоли с последующим расчетом конструкции молекулы мРНК, синтезом ДНК-матрицы и самой молекулы мРНК, а также упаковки молекулы в систему доставки.

Определение неоантителов опухоли

Одним из ключевых этапов в создании персонализированных мРНК-вакцин является определение неоантителов, то есть уникальных антигенов, возникающих вследствие соматических мутаций в клетках опухоли. Неоантитела идентифицируют с использованием комплекса методов, включающего полногеномное или полноэкзомное секвенирование, РНК-секвенирование и специализированные биоинформационные пайплайны, позволяющие отобрать наиболее перспективные мишени для иммунотерапии [33, 34]. При этом ДНК-секвенирование дает возможность выявлять соматические мутации (миссенс, нонсенс, делеции, инсерции и др.), потенциально кодирующие неоэпипотопы, а РНК-секвенирование подтверждает факт их экспрессии, что служит важным критерием отбора неоантителов [35]. Кроме того, использование РНК-секвенирования позволяет исключить ложноположительные варианты, обнаруженные при анализе результатов ДНК-секвенирования, но не экспрессирующиеся в действительности [35]. Именно сопоставление данных ДНК- и РНК-секвенирования на практике дает более надежные результаты при формировании пула потенциальных неоантителов [34].

После получения «сырых» данных проводится их предварительная обработка, включающая контроль качества (с помощью FastQC¹), фильтрацию и триммирование некорректных участков (Trimmomatic или Cutadapt) и выравнивание прочтений на референсный геном (Bowtie 2) [36–38]. Следующим шагом является детекция соматических мутаций в опухоли по сравнению с нормальными образцами, где применяются такие инструменты, как MuTect2 (из пайплайна GATK), Strelka или VarScan2 [39–41]. При этом рассчитывают частоту аллельных вари-

¹ Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. In: Babraham Bioinformatics [Internet]. Cambridge: Babraham Institute; 2004-. [cited 2024 Dec 15]. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

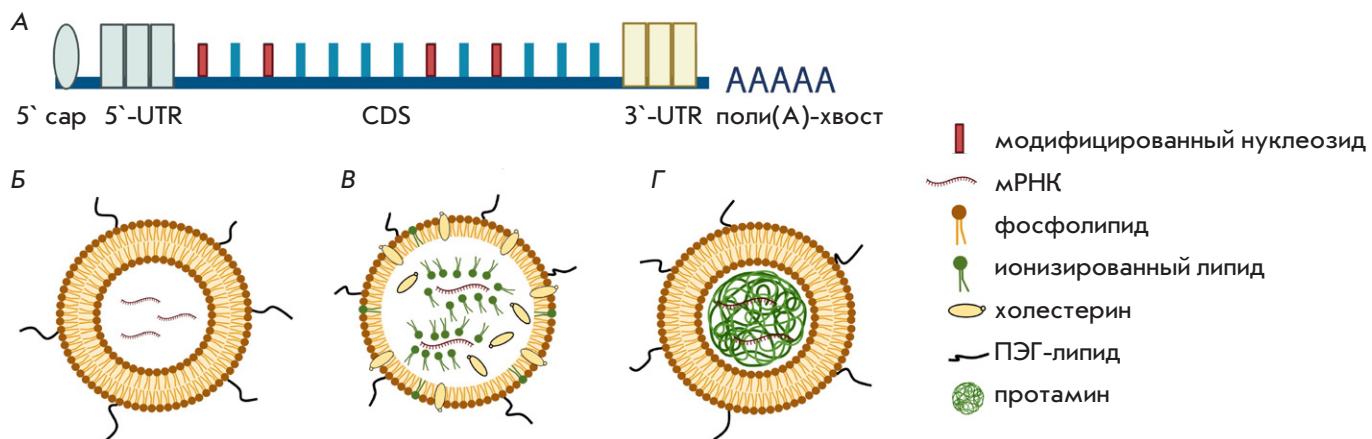


Рис. 3. Структурные компоненты мРНК-вакцины. А – композиция молекулы мРНК; Б – строение липосомы; В – строение липидной наночастицы; Г – строение липополиплекса. 5' кап – кэп, 5'-UTR и 3'-UTR – нетранслирующие участки, CDS – кодирующая последовательность

антов (VAF), отражающую долю мутаций в геноме опухолевых клеток [42]. Параллельно данные РНК-секвенирования анализируют при помощи пайплайнов STAR+RSEM, Salmon или Kallisto [43–46], что позволяет получить количественные показатели экспрессии – TPM (Transcripts Per Million) и FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads). Последние учитывают длину транскрипта и глубину секвенирования и применяются для корректного сравнения уровня экспрессии между транскриптами и образцами, что важно для оценки потенциальной иммуногенности [34].

На следующем этапе предсказывают неоэпипитопы и оценивают их иммуногенность. Большое значение имеет определение HLA-генотипа пациента с использованием, например, алгоритма OptiTupe [47]. Также оценивается аффинность связывания мутантных пептидов с молекулами МНС I/II с помощью различных инструментов, среди которых наиболее популярны NetMHC и NetMHCpan, MHCflurry и IEDB [48–50]. Эти инструменты вычисляют IC50, или процентильный ранг, позволяющий отобрать эпипитопы с высокой предсказанной аффинностью ($IC50 < 500$ нМ). Для более точной приоритизации учитывают уровень экспрессии мутантного транскрипта, частоту аллельных вариантов (VAF), уникальность мутантного пептида по сравнению с нативным белком и стабильность комплекса пептид–МНС [34]. В ряде случаев для валидации найденных неоантителогенов применяют иммунопептидомику: прямое выделение комплексов пептид–МНС из опухолевых клеток с последующей масс-спектрометрией [51]. Этот подход более трудоемок, однако подтверждает реальное представление пеп-

тида на поверхности клеток. На практике же чаще используют *in silico* анализ, поскольку он дешевле и быстрее, что особенно важно в контексте персонализированных мРНК-вакцин [52]. Включение данных иммунопептидомики и интеграция функциональных тестов (таких, как активация Т-клеток *in vitro*) позволяет повысить объективность оценки иммуногенности [51].

Несмотря на сохраняющиеся сложности с предсказанием неоэпипитопов, интеграция данных ДНК- и РНК-секвенирования с современными биоинформационическими и машинными алгоритмами создает надежную основу для их выявления и разработки эффективных персонализированных мРНК-вакцин [34].

Структура молекулы мРНК

Современные мРНК-вакцины разрабатываются с учетом оптимизации структуры молекулы мРНК, что обеспечивает ее высокую стабильность, эффективность и минимизацию нежелательных иммунных реакций [53]. При этом молекула мРНК имеет несколько обязательных элементов (5'-кэп, 5'-UTR, кодирующая последовательность, 3'-UTR и поли(A)-хвост), каждый из которых играет ключевую роль (рис. 3А) [53].

Для рационального проектирования структуры мРНК все шире применяются специальные вычислительные программы. Эти инструменты позволяют учитывать вторичную и третичную структуры мРНК, которые влияют на ее стабильность, иммуногенность и эффективность трансляции целевого антигена в АПК. Среди таких программ можно отметить RNAfold, NUPACK и mfold, обеспечивающие

прогнозирование энергетически стабильных структур и подбор оптимальных участков для включения модифицированных нуклеозидов [54–56].

Важнейшим элементом мРНК служит 5'-конец, снабженный кэпом (Cap), который защищает ее от деградации и способствует инициации трансляции (рис. 3А). Различают несколько типов кэпов: Cap0, Cap1, Cap2, m6Am Cap. Современные технологии, например, CleanCap, позволяют достичь степени кэпирования до 99%, что критически важно для синтеза целевого белка в АПК [53]. При производстве мРНК часто используют модифицированные нуклеозиды (псевдоуридин, 5'-метилцитидин, N1-метилпсевдоуридин), которые повышают уровень экспрессии и снижают врожденную иммуногенность. За кэпом следует 5'-нетранслируемый регион (5'-UTR), влияющий на стабильность и эффективность трансляции.

Кодирующая последовательность (CDS), расположенная в центральной части молекулы, содержит информацию о целевом антигене. В противораковых мРНК-вакцинах это могут быть опухолеассоциированные антигены (TAA) или неоантигены (TSA). Возможно кодирование сразу нескольких антигенов, что усиливает иммунный ответ [57, 58]. Оптимизация кодонов позволяет повысить скорость и точность трансляции, тем самым усиливая эффективность вакцины [57]. Заключительной частью структуры мРНК является 3'-нетранслируемая область (3'-UTR), регулирующая время «жизни» мРНК, и поли(A)-хвост, способствующий стабильности и продлению периода трансляции (рис. 3А) [53].

В дополнение к линейным молекулам мРНК разрабатывают самореплицирующиеся мРНК, которые включают элементы репликации вирусов, повышающие их копийность в клетках и тем самым уменьшающие необходимую дозу препарата мРНК [53]. Альтернативой являются кольцевые мРНК с замкнутой структурой, позволяющей мРНК дольше сохраняться в организме и обеспечивать более продолжительную экспрессию антигена [58]. Оба направления активно разрабатывают, учитывая возможность повышения эффективности и безопасности мРНК-вакцин [53, 58].

Системы доставки противоопухолевых мРНК-вакцин

Введенная в организм пациента молекула мРНК должна быть доставлена к АПК без потери своей целостности. Выбор оптимальной системы доставки мРНК является важным этапом производства мРНК-вакцин. К наиболее распространенным системам доставки мРНК относятся липидные платформы, которые включают липосомы, липидные

nanoчастицы (ЛНЧ) и липополиплексы (ЛПП), отличающиеся по структуре и функциональным особенностям (рис. 3Б–Г).

Липосомы состоят из билипидного слоя, формирующего внешнюю оболочку, внутри которой инкапсулируется мРНК. На поверхности липосом могут находиться молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), обеспечивающие стерическую стабилизацию и увеличение времени циркуляции в крови. ЛНЧ представляют собой более сложные и оптимизированные структуры, включающие ионизируемые липиды, фосфолипиды, холестерин и ПЭГ-липиды, что позволяет не только эффективно инкапсулировать мРНК, но и защищать ее от деградации и обеспечивать доставку в цитоплазму клеток [59]. ЛНЧ успешно применяются в противораковых мРНК-вакцинах, демонстрируя высокую стабильность и эффективность доставки [53, 60].

Эффективность липидных платформ доставки зависит от ряда факторов, таких как размер, заряд, липидный состав, фазовое состояние мембранны, способ локализации антигена и наличие иммуномодулирующих компонентов.

Размер частиц влияет на характер транспорта в лимфоузлы и тип иммунного ответа: мелкие частицы (<200 нм для липосом и до 100 нм для ЛНЧ) быстрее проникают в лимфоидные органы и активируют резидентные дендритные клетки, способствуя Th2-ответу, тогда как крупные (>500 нм для липосом и >100 нм для ЛНЧ) дольше задерживаются в месте инъекции, формируя депо и стимулируя Th1-ответ [60–63].

Заряд частиц также играет важную роль: катионные частицы, например, на основе диоктадецилдиметиламмония бромида (DDA), активно поглощаются АПК, способствуют кросс-презентации и активации CD8⁺ Т-лимфоцитов, тогда как нейтральные и анионные липосомы преимущественно индуцируют гуморальный иммунитет [64, 65]. В ЛНЧ ионизируемые липиды при низких значениях pH в эндосомах приобретают положительный заряд, облегчая выход мРНК в цитоплазму [66].

Фазовое состояние билипидного слоя определяет способность липосом к слиянию с клеточными мембранами и внутриклеточному высвобождению антигена. Жидкокристаллические липосомы облегчают кросс-презентацию через МНС I, тогда как более жесткие липосомы вызывают выраженный Th1-ответ *in vivo* [66–68]. Холестерин, входящий в состав мембранны, повышает стабильность липосом и может усиливать или снижать активацию комплемента в зависимости от заряда и размера [66, 69].

Добавление в состав частиц иммуномодулирующих компонентов, таких как лиган-

ды Toll-подобных рецепторов, например, CpG-олигодезоксинуклеотиды (CpG-ОДН), полиг(I:C), синтетические гликолипиды и цитокины, позволяет направить иммунный ответ по нужному типу воспаления. Так, CpG-ОДН, распознаваемые TLR9 и трегалоза-6,6'-дигексаном (TDB), способствуют индукции Th1-ответа, сопровождающегося продукцией IFN- γ [70–73]. Полиг(I:C), имитирующий вирусную двухцепочечную РНК и активирующий TLR3, усиливает перекрестную презентацию антигена и стимулирует развитие ответа цитотоксических Т-лимфоцитов [74, 75]. Кроме того, комбинация TDB с липидами, такими как DDA, может приводить к активации Th17-ответа и продукции IL-17 [67, 76–78].

Показано, что инкапсулированные антигены эффективно поступают во внутриклеточные компартменты АПК, где подвергаются обработке и представлению через молекулы МНС как класса I, так и класса II, обеспечивая активацию CD8 $^{+}$ и CD4 $^{+}$ Т-лимфоцитов [68]. В то же время антигены, ассоциированные с поверхностью липосом, обладают меньшей способностью к внутриклеточной обработке, но могут быть доступны для прямого распознавания В-лимфоцитами через BCR-рецепторы, способствуя формированию гуморального ответа [68, 79].

Липополиплексы (ЛПП) представляют собой гибридные системы, комбинирующие катионные липиды, такие как DOTAP (1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан), и полимеры, такие как протамин, для формирования стабильных комплексов с мРНК [80]. Липиды обеспечивают защиту мРНК и способствуют ее доставке через клеточные мембранны, а полимеры усиливают компактизацию мРНК, повышая стабильность комплекса. ЛПП обладают высокой стабильностью *in vitro* и эффективно доставляют мРНК, включая самореплицирующиеся, к дендритным клеткам, вызывая сильный иммунный ответ. Показано, что ЛПП, используемые для доставки мРНК, кодирующих неоантигены, индуцируют мощные Т-клеточные ответы и проявляют противоопухолевую активность в мышиных моделях [80].

Помимо липидных платформ, для доставки мРНК в АПК применяют полимерные наночастицы, дендримеры, пептидные комплексы, струйную инжекцию, электропорацию и вирусные векторы.

Полимерные наночастицы, такие как полиг(β-аминоэфиры), представляют собой биодеградируемые полимеры, содержащие амино- и эфирные группы в своей структуре, что обеспечивает их способность связывать мРНК через электростатические взаимодействия. Гибкость в модификации полимер-

ных наночастиц позволяет варьировать молекулярную массу, степень разветвленности и химический состав полимера, оптимизируя заряд, размер частиц и их способность защищать мРНК от ферментативной деградации [53].

Дендримеры – это высокоразветвленные полимерные молекулы с древовидной структурой. В центре дендримера находится небольшое ядро, представляющее собой небольшую молекулу или ион, от которого начинают отходить повторяющиеся мономерные звенья, формируя несколько слоев ветвления. На наружной поверхности дендримера расположены функциональные группы, такие как амины или гидроксильные группы, которые обеспечивают возможность связывать и защищать мРНК [53]. Пептидные комплексы состоят из мРНК, связанной с катионными пептидами, такими как протамин, которые образуют плотные наночастицы за счет электростатического взаимодействия между положительно заряженными пептидами и отрицательно заряженной мРНК, защищая ее от деградации и способствуя проникновению в клетки [53].

Струйная инжекция позволяет доставлять «голую» мРНК без носителей, используя такие струйные инжекторы, как PharmaJet или Bioject. Устройства лишены игл и под высоким давлением (до 1000 бар) пропускают мРНК через кожу в подкожно-жировую клетчатку или мышечную ткань. Механизм проникновения мРНК в клетки основан на временном нарушении целостности клеточных мембран за счет механического стресса, вызванного высокоскоростной струей, что позволяет мРНК достигать цитоплазмы АПК [81]. Исследования показывают, что введение мРНК этим методом может вызывать врожденный иммунный ответ, сопоставимый с тем, что индуцируют ЛНЧ [81].

Электропорация используется преимущественно для *ex vivo* доставки мРНК в дендритные клетки или другие иммунные клетки, которые затем вводятся в организм. Этот метод предполагает применение электрических импульсов для временного повышения проницаемости клеточных мембран, что облегчает проникновение мРНК. Электропорация эффективна для активации иммунного ответа, но ее применение *in vivo* ограничено из-за риска повреждения тканей и сложности реализации [53].

Вирусные векторы, чаще используемые для доставки самореплицирующейся мРНК, состоят из модифицированного вирусного генома, содержащего мРНК или самореплицирующуюся мРНК, а также белкового капсида или липидной оболочки, которые обеспечивают проникновение в клетки. Часто

используются адено-вирусы, лентивирусы или альфа-вирусы, модифицированные для экспрессии опухолевых антигенов. Самореплицирующаяся мРНК включает элементы вирусной репликации, усиливающие трансляцию антигенов в клетках, снижая необходимую дозу мРНК-вакцины и повышая иммунный ответ. Вакцины на основе вирусных векторов разрабатываются для лечения различных видов рака, включая HPV-ассоциированные опухоли, и показывают высокую эффективность в доклинических исследованиях [82].

Хранение и транспортировка препаратов с мРНК

Иммунобиологические лекарственные препараты, к которым относятся все известные вакцины, хранят при температуре от +2°C до +8°C¹. Исключение составляют вакцины на основе мРНК, которые относятся к биотехнологическим лекарственным препаратам (БТЛП), имеющим свои особенности хранения и транспортировки². К примеру, мРНК-вакцина компании Pfizer стабильна в течение 6 месяцев при температуре -80°C и только 5 дней при температуре +2... +8°C. Вакцина компании Moderna может храниться на протяжении 6 месяцев при температуре -20°C и 30 дней при 2-8°C [83].

Для хранения и транспортировки мРНК-вакцин необходим строгий контроль температуры, установленный производителем, и специальное оборудование, такое как холодильные и морозильные камеры, холодильные боксы и переноски вакцин, способные держать температуру -80°C и соответствующие стандартам эффективности, определенным Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) [84].

Одним из новейших вариантов доставки мРНК в организм пациента является использование чипов с микроиглами [84]. Этот способ позволяет хранить и транспортировать препарат с мРНК при комнатной температуре в течение нескольких месяцев. Однако такой способ пока апробирован только для противо-инфекционных мРНК-вакцин, а сложность технологии производства чипов создает трудности при разработке индивидуальных противоопухолевых вакцин.

¹ Общая фармакопейная статья (ОФС) 1.7.1.0018.18, утвержденная Приказом Минздрава России № 749 от 31.10.2018. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/1/1-7/1-7-1/> Дата обращения: 25.02.2024.

² Постановление Правительства РФ № 213 от 24.02.2025 г. «О биотехнологических лекарственных препаратах, предназначенных для применения в соответствии с индивидуальным медицинским назначением и специально изготовленных для конкретного пациента непосредственно в медицинской организации, в которой применяется такой биотехнологический лекарственный препарат, имеющих в своем составе соединения, синтезированные по результатам генетических исследований материала, полученного от пациента, для которого изготовлен такой биотехнологический лекарственный препарат». Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/157884/> Дата обращения: 25.02.2025.

Все перечисленные особенности транспортировки приводят к определенным сложностям дальнейшей реализации мРНК-вакцин, однако не делают их применение невозможным в клинической практике. Одним из путей разрешения может стать производство и применение препарата на территории одного учреждения, что в настоящее время регламентируется на территории Российской Федерации постановлением о БТЛП, предназначенных для применения в соответствии с индивидуальным медицинским назначением, от 24 февраля 2025 года № 213.

Способы введения противоопухолевых мРНК-вакцин

Выбор способа введения важен для терапевтической эффективности и безопасности мРНК-вакцины для организма в целом. Пути введения имеют разные характеристики и влияют на распределение вакцины в организме, тип активируемых иммунных клеток и, как следствие, на силу и продолжительность ответа. Введение мРНК-вакцин может быть внутрикожным, подкожным, интраназальным, интранодальным, внутрибрюшинным, внутримышечным и внутривенным. В современных клинических испытаниях наиболее часто применяют внутривенное, внутримышечное и подкожное введение мРНК-вакцин.

При внутривенном введении препарат попадает в системный кровоток, распространяясь по органам и тканям, быстро достигая АПК. Этот способ обеспечивает возможность введения значительных объемов вакцины и допускает повторные процедуры для поддержания высокого уровня противоопухолевого иммунитета [58]. Данные клинических исследований вакцины цевумеран компании BioNTech SE, вводимой внутривенно, подтвердили безопасность, хорошую переносимость и эффективность стимуляции иммунного ответа, направленного против раковых клеток [32, 85]. Тем не менее при этом способе введения возможно развитие лихорадочного генерализованного синдрома и гриппоподобных явлений, а также существует риск системной токсичности, который важно учитывать при планировании исследований. В силу специфического строения сосудистой сети печени и механизма рецепторопосредованного захвата гепатоцитами мРНК-вакцины обладают повышенной тропностью к этому органу, что может привести к иммуноопосредованному гепатиту или гепатотоксичности [86]. При таком способе введения препарата необходимо учитывать соотношение вред-польза лечения, что накладывает ограничения на применение мРНК-вакцин.

Внутримышечное введение вакцин переносится легче, чем при внутривенном способе введения.

Благодаря хорошей васкуляризации мышечной ткани и наличию мигрировавших в ходе онтогенеза и привлеченных в место инъекции предшественников АПК, внутримышечного введения достаточно для индукции противоопухолевого иммунного ответа. К другим плюсам этого способа относятся гибкость в подборе вводимой дозы, возможность повторного введения для поддержания активности противоопухолевого иммунитета и сниженный риск побочных реакций в месте инъекции [87]. Единственными побочными эффектами при этом способе могут быть лихорадочные и гриппоподобные явления, которые корректируются противовоспалительными препаратами. Инкапсулированную в липидные наночастицы вакцину мРНК-4157 компании Moderna во всех клинических испытаниях вводили внутримышечно, показав при этом достаточную безопасность, а также вызывав клинические ответы у пациентов с меланомой и солидными опухолями [88, 89]. Внутримышечный путь, учитывая его многочисленные достоинства, широко используется для введения уже одобренных противоинфекционных мРНК-вакцин, в том числе и профилактических препаратов против SARS-CoV-2 [90–93].

Внутрикожный и подкожный способы введения мРНК могут быть реализованы как с помощью классического способа с помощью шприца, так и с использованием микрочипов или струйной инъекции [81, 84]. Введение мРНК-вакцин внутрикожно стимулирует иммунный ответ типа Th1, что объясняется высокой концентрацией АПК в слоях дермы и эпидермиса и благоприятным микроокружением для переноса антигенов [94]. Хотя данный способ позволяет использовать меньшие объемы препарата, он нередко приводит к местным нежелательным реакциям, таким как припухлость, болезненность, гиперемия и зуд [95, 96]. В отличие от этого, подкожный метод введения характеризуется меньшим количеством АПК в подкожной жировой клетчатке, что требует увеличения дозировки и использования нескольких точек инъекции. Однако медленная скорость всасывания при подкожном введении может способствовать разрушению молекул мРНК, снижая эффективность лечения [97]. Тем не менее данный путь введения применялся в испытаниях вакцин на основе мРНК ранее и активно используется в клинических исследованиях, проводимых в Китае (NCT03908671, NCT05949775, NCT05761717) [80, 98, 99].

ИнTRANАЗАЛЬНЫЙ путь доставляет молекулу мРНК в АПК периферических лимфатических сосудов, а внутринодальный – в лимфатические АПК. При этом реализация этих методов сложна и имеет ограничения по объемам вводимого препарата [100].

Внутрибрюшинный способ имеет аналогичные ограничения и чаще используется для доставки мРНК-вакцин, кодирующих костимулирующие молекулы иммунитета [101].

При выборе способа введения необходимо принимать во внимание тип мРНК-вакцины. К примеру, для обеспечения эффективности доставки нативной мРНК *in vivo* чаще используют внутрикожный или интранодальный путь из-за предположения о способности незрелых дендритных клеток, локализованных в дерме и лимфатических узлах, поглощать мРНК путем микропиноцитоза [102].

Липидные наночастицы как популярный инструмент доставки совместимы практически со всеми известными способами введения. Тем не менее при внутримышечном и внутрикожном введении трансляция мРНК продолжается дольше всего – период полураспада превышает 20 ч, а при внутривенном составляет 7 ч [103]. Для определения наилучшего способа доставки вакцины Фан и соавт. сравнили противоопухолевый эффект и иммуногенность внутримышечного, внутрикожного и подкожного введения препарата LPP-CT26 на мышах CT26-luc с метастазами в легкие [80]. Мыши, получавшие препарат подкожно, имели меньше метастатических очагов в легких, повышенный уровень секреции IFN- γ и большую противоопухолевую эффективность при увеличении места введения без изменения дозы по сравнению с двумя другими группами. Это еще раз доказывает влияние оптимизации способа введения мРНК-вакцины на противоопухолевый ответ.

Таким образом, способ введения мРНК-вакцины является одним из ключевых факторов, определяющих ее эффективность и безопасность. Каждый путь введения обладает своими преимуществами и недостатками, влияя на распределение препарата в организме, активацию иммунных клеток и, как следствие, силу и продолжительность иммунного ответа. Внутривенное введение обеспечивает системное распределение, но сопряжено с риском токсичности и высокой тропностью к печени. Внутримышечное введение, благодаря своей простоте и безопасности, остается наиболее популярным, обеспечивая гибкость в дозировании и возможность повторных инъекций. Внутрикожное введение стимулирует мощный иммунный ответ типа Th1, но может вызывать местные реакции. Подкожный путь, напротив, требует увеличения дозы из-за медленной абсорбции. Оптимизация способа, дозы и кратности введения с учетом типа мРНК-вакцины и системы доставки является необходимым условием для достижения максимального противоопухолевого эффекта и минимизации побочных реакций.

Доклинические испытания

Оценка безопасности и иммунологических свойств на клеточных культурах, животных моделях и при помощи компьютерного моделирования.

Клинические испытания

Фаза I

до 100 человек

Определение безопасности и переносимости препарата, лимитирующей дозы, проведение исследования с многократными нарастающими дозами. Предварительная оценка эффективности.

Несколько групп пациентов с разными типами рака.

Фазы I и IIa часто объединяют

Фаза II: а и б

100–800 человек

а: краткосрочная безопасность, фармакокинетика и фармакодинамика, подбор режима дозирования, определение зависимости «доза–ответ» и критерии оценки эффективности.
б: определение эффективности, долгосрочной безопасности, рандомизация и «двойное ослепление».

2 группы пациентов с одним типом рака: **контрольная** (стандартное лечение) и **экспериментальная** (исследуемый препарат в монотерапии или в комбинации).

Регистрация препарата

Фаза III

Свыше 1000 человек

Рандомизированное контролируемое – случайное распределение участников группы с различным лечением и сравнение результатов лечения;
двойное слепое – отсутствие информации о варианте терапии как у врача, так и у пациента;
многоцентровое исследование – клиническое исследование, в котором участвует более чем одно независимое медицинское учреждение.

2 группы пациентов с одним типом рака: **контрольная** (стандартное лечение) и **экспериментальная** (исследуемый препарат в монотерапии или в комбинации).

Фаза IV

Дополнительная проверка безопасности и эффективности зарегистрированных препаратов.

Общая продолжительность: 10–15 лет

Рис. 4. Этапы испытаний противоопухолевой мРНК-вакцины, необходимые для регистрации препарата

Дальнейшие исследования в этой области позволяют разработать персонализированные стратегии вакцинации, направленные на получение клинического ответа и сведение к минимуму побочных реакций.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ МРНК-ВАКЦИН

Противоопухолевые мРНК-вакцины разрабатывают в настоящее время во многих странах и большинство исследований успешно перешли от доклинических испытаний к клиническим (табл. 1). Для регистрации противоопухолевой мРНК-вакцины в качестве препарата для лечения рака необходимо успешно пройти три фазы клинических испытаний, последняя из которых самая продолжительная (рис. 4).

Доклинические испытания мРНК-вакцин включают оценку безопасности и иммунологических свойств в условиях *in vitro* и/или *ex vivo* и *in vivo* на животных моделях. Успех доклинических исследований позволяет перейти к I фазе клинических испытаний, где определяется терапевтическая доза и оценивается предварительная эффективность препарата при лечении пациентов. Эта фаза обычно проводится на здоровых добровольцах, но в случае

противоопухолевых мРНК-вакцин исследования начинают сразу с целевых пациентов, что приводит к объединению фаз I и IIa (NCT06307431, NCT06305767), а также к появлению стадий увеличения и расширения дозы [104, 105]. В фазе II можно выделить пилотную IIa фазу, в рамках которой оценивают краткосрочную безопасность, устанавливают режим дозирования, выясняют зависимость эффекта от дозы и определяют критерии оценки эффективности, и контролируемую более обширную IIb фазу, нужную для определения эффективности, безопасности и оптимального уровня доз препарата, а также принятия решения о переходе на следующую фазу. На втором этапе необходима группа сравнения, получающая стандартную терапию. Самая длительная и дорогостоящая III фаза представляет собой рандомизированное контролируемое двойное слепое многоцентровое исследование с обязательным наличием контрольной группы, что позволяет оценивать эффективность и безопасность на большом числе пациентов. Успешное завершение этого этапа позволяет направить досье препарата в уполномоченный орган для регистрации. При этом в случае персонализированных мРНК-вакцин регистрируют не каждый конкретный препарат, а технологию его производства. Более того, в Российской

Таблица 1. Клинические испытания персонализированных противоопухолевых мРНК-вакцин за 2021–2025 гг.

Название препарата	Страна, спонсоры	Идентификатор исследования	Фаза	Статус, годы исследования	Локализация опухоли	Применяемое лечение	Результаты исследования
mPHK-4157 (V940)	США, Moderna, MSD	NCT03313778 (KEYNOTE-603)	I	Открыто, набор активен 2017–2025 гг.	Любые злокачественные новообразования с MSI-H или другими dMMR	Три группы: монотерапия мРНК-4157, комбинация с пембролизумабом, комбинация с пембролизумабом и химиотерапией	У всех пациентов (n=33) были зарегистрированы неантитело-специфические Т-клеточные ответы; отсутствовали побочные реакции ≥ 3-й степени
		NCT03897881 (KEYNOTE-942)	II	Открыто, набор активен 2019–2029 гг.	Меланома высокого риска (стадии III–D или IV)	Две группы: комбинация мРНК-вакцины с пембролизумабом, монотерапия пембролизумабом (группа контроля)	При медиане наблюдения 18 мес. безрецидивная выживаемость составила 79% (комбинированная терапия, n=107) против 62% (монотерапия, n=50)
		NCT06307431 (INTerpath-004)	I–II	Открыто, набор активен 2024–2032 гг.	Почекочно-клеточная карцинома после хирургической резекции	Три группы: монотерапия мРНК-4157, комбинация с пембролизумабом (группа контроля)	Нет
		NCT06305767 (INTerpath-005)	I–II	Открыто, набор активен 2024–2031 гг.	Мышечно-инвазивная уротелиальная карцинома после хирургической резекции	Три группы: комбинация мРНК-4157 с пембролизумабом, монотерапия пембролизумабом (группа контроля), комбинация с пембролизумабом, эндрогрумаб ведотином и операцией	Нет
		NCT06295809 (INTerpath-007)	III	Открыто, набор активен 2024–2033 гг.	Резектабельный местно-распространенный операбельный плоскоклеточный рак кожи	Три группы: комбинация мРНК-4157 с пембролизумабом и операцией, операция и лучевая терапия, монотерапия пембролизумабом с операцией	Нет
		NCT05933577 (INTerpath-001)	III	Активно, без набора 2023–2030 гг.	Меланома II–IV стадии	Две группы: комбинация мРНК-4157 с пембролизумабом, монотерапия пембролизумабом (группа контроля)	Нет
		NCT06077760 (INTerpath-002)	III	Открыто, набор активен 2023–2035 гг.	Резектированный немелкоклеточный рак легкого II, IIIA, IIIB (N2) стадий	Последовательное лечение: цевумеран, атезолизумаб и затем химиотерапия по схеме mFOLFIRINOX	Ответ на лечение наблюдался у 50% пациентов (n=8). Безрецидивная выживаемость у 75% (n=6) ответивших на лечение превышала 38 мес.
		США, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Genentech	I	Активно, без набора 2019–2025 гг.	Рак поджелудочной железы после хирургической резекции	Медиана безрецидивной выживаемости не отмечена	Медиана безрецидивной выживаемости не отмечена (n=8) составила 13,4 мес.
Цезумеран (RO7198457)							

Название препарата	Страна, спонсоры	Идентификатор исследования	Фаза	Статус, годы исследования	Локализация опухоли	Применяемое лечение	Результаты исследования
Цевумеран (ROT198457)	США, BioNTech	NCT03289962 (GO39733)	I	Активно, без набора 2017–2025 гг.	Местно-распространенные или метастатические солидные опухоли	Две группы: монотерапия цевумераном, комбинация с агезолизумабом	У 71% пациентов были зарегистрированы неонантенные специфические Т-клеточные ответы; у 90% пациентов, получавших монотерапию, и 92% пациентов, получавших комбинированную терапию, отсутствовали побочные реакции ≥ 3 -й степени
		NCT03815058 (IMCODE001)	II	Активно, без набора 2019–2025 гг.	Метастатическая или неоперабельная местнораспространенная меланома III/IV стадии	Две группы: комбинация цевумерана с пембролизумабом, монотерапия пембролизумабом (группа контроля)	Нет
		NCT05968326 (IMCODE003)	II	Открыто, набор активен 2023–2029 гг.	Протоколовидная аденокарцинома поджелудочной железы после хирургической резекции	Две группы: комбинация цевумерана с атезолизумабом и химиотерапией mFOLFIRINOX, химиотерапия mFOLFIRINOX	Нет
		NCT06534983 (IMCODE004)	II	Открыто, набор активен 2024–2034 гг.	Мышечно-инвазивная уротелиальная карцинома высокого риска после хирургической резекции	Две группы: комбинация цевумерана с ниволумабом, монотерапия ниволумабом	Нет
		NCT04486378 (BNT122-01)	II	Открыто, набор активен 2021–2030 гг.	Рак прямой кишки III/IV стадии или рак толстой кишки II/III стадии	Две группы: монотерапия цевумераном, без лечения (выжидательная тактика)	Нет
STZD-1801		NCT03908671	I	Открыто, набор активен 2019–2025 гг.	Распространенный рак гиппцевода (IIIС, IV) и немелкоклеточный рак легкого (стадии IIIВ–IV)	Монотерапия мРНК-вакциной	Нет
SW1115C3	Китай, Stemirna Therapeutics	NCT05198752 (SWP1001-06)	I	Неизвестен 2022–2024 гг.	Радиоактивные солидные опухоли	У всех пациентов ($n=2$) наблюдался ответ на лечение. Безрецидивная выживаемость первого пациента 8,4 мес., второго – более 12 мес.	
2020-06-mRNA-COM		NCT05949775	Нет	Открыто, нет набора 2023–2026 гг.	Распространенные солидные опухоли	Комбинация мРНК-вакцины с стинтилимабом	Нет
2021-10-mRNA-COM		NCT05761717	Нет	Открыто, нет набора 2023–2025 гг.	Гепатоцеллюлярная карцинома в послеоперационном рецидиве	Комбинация мРНК вакцины с стинтилимабом	Нет

Название препарата	Страна, спонсоры	Идентификатор исследования	Фаза	Статус, годы исследования	Локализация опухоли	Применяемое лечение	Результаты исследования
PGV002	Китай, NeoCura	NCT05192460 (XXY-1005)	Ранняя I	Открыто, набор активен 2022–2025 гг.	Распространенный рак желудка, панкреатита или печени	Две группы: монотерапия мРНК-вакциной, комбинация с PD-1/L1-антителом	Нет
Personalized neoantigen tumor vaccine		NCT05359354 (XXY-1007)	Нет		Распространенные солидные опухоли		Нет
iNeo-Vac-R01	Китай, Hangzhou Neoantigen Therapeutics Co., Ltd.	NCT06019702 (SRRSH2023-755-01) NCT06026800 (SRRSH2023-755-02) NCT06026774 (SRRSH2023-755-03)	I	Открыто, набор активен 2023–2027 гг.	Распространенные новообразования пищеварительной системы	Монотерапия мРНК-вакциной Стандартная терапия первой линии, затем – монотерапия мРНК-вакциной	Нет
EVM16	Китай, Everest Medicines	NCT06541639 (EVIM16CX01)	I	Открыто, набор активен 2023–2027 гг.	Любые распространенные или рецидивирующие солидные опухоли	Две группы: монотерапия мРНК-вакциной, комбинация с тиселлизумабом	Нет
S.J-Neo006	Китай, Jiangsu Synthgene Biotechnology	NCT06326736	Ранняя I	Открыто, набор активен 2024–2026 гг.	Резектабельная проктовая аденоокарцинома полипузуточной железы	Комбинация с камрелизумабом и химиотерапией	Нет
mRNA tumor vaccines	Китай, Shanghai Regenelead Therapies	NCT06156267 NCT06735508 (NSCLC-IT-RGL)	Ранняя I	Открыто, нет набора 2024–2027 гг.	Аденокарцинома полипузуточной железы после хирургической резекции	Комбинация с адебрелимабом и химиотерапией mOLFIRINOX	Нет
XP-004	Китай, Shanghai Xinpra BioTechnology Company Limited	NCT06496373 (2023PCV004)	I	Открыто, набор активен 2024–2027 гг.	Немелкоклеточный рак легкого после хирургической резекции	Комбинация с адебрелимабом	Нет
Personalized mRNA Tumor Vaccine						Репардивирующий рак поджелудочной железы	Комбинация с PD1-антителом

Таблица 2. Ингибиторы иммунных контрольных точек, применяемые в клинической практике

Молекула, на которую направлен препарат	Международное название препарата	Торговое название препарата	Онкологические заболевания
CTLA-4	Ипилимумаб	Ервой	Неоперабельная или метастатическая меланома, почечно-клеточный рак, колоректальный рак, гепатоцеллюлярный рак, немелкоклеточный рак легкого
	Тремелимумаб	Имджудо	
	Нурулимаб	Нурдати	
PD-1	Пролголимаб	Фортека	Меланома, немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак желудка, рак молочной железы, рак предстательной железы, опухоли головы и шеи, рак яичников
	Пембролизумаб	Китруда, Пемброриа	
	Ниволумаб	Опдиво	
PD-L1	Камрелизумаб	Арейма	Рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, метастатическая меланома, карцинома Меркеля, уротелиальный и почечно-клеточный рак
	Атезолизумаб	Тецентринк	
	Авелумаб	Бавенсио	
	Дурвалумаб	Имфинзи	

Федерации допустимо клиническое испытание персонализированных противоопухолевых мРНК-вакцин, относящихся к БТЛП, после доказательства их эффективности и безопасности и без проведения доклинических исследований¹.

Персонализированные мРНК-вакцины в современных исследованиях применяют в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунитета (ИКТ), поскольку они помогают активированным Т-лимфоцитам распознавать неоантигены опухолевых клеток и реализовывать полноценный противоопухолевый иммунный ответ. Сегодня класс препаратов ИКТ, достаточно распространенный в практике онкологов, включает моно-клональные антитела против цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена-4 (CTLA-4), рецептора программируемой клеточной гибели (PD-1) и его лиганда (PD-L1) (табл. 2). CTLA-4, PD-1 и PD-L1 – это поверхностные рецепторы Т-клеток, необходимые для их негативной регуляции [106]. Опухолевые клетки используют эти молекулы для истощения Т-клеток и «усколзания» от иммунного ответа. ИКТ направлены на блокировку этого механизма и восстановления подавленного опухолью иммунного ответа [107, 108].

¹Постановление Правительства РФ № 213 от 24.02.2025 г. «О биотехнологических лекарственных препаратах, предназначенных для применения в соответствии с индивидуальным медицинским назначением и специально изготовленных для конкретного пациента непосредственно в медицинской организации, в которой применяется такой биотехнологический лекарственный препарат, имеющих в своем составе соединения, синтезированные по результатам генетических исследований материала, полученного от пациента, для которого изготовлен такой биотехнологический лекарственный препарат». Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/157884/> Дата обращения: 25.02.2025.

Монотерапия ИКТ выступает в качестве группы сравнения при исследованиях комбинации мРНК-вакцин с ИКТ (NCT03897881, NCT05933577, NCT03289962, NCT03815058) или монотерапии мРНК-вакциной (NCT03289962, NCT05192460, NCT05359354, NCT06541639). Существует также сравнение монотерапии мРНК-вакциной с группами, где пациенты получают стандартную конвенциональную терапию, соответствующую выбранному типу рака (NCT06295809, NCT04486378, NCT06026800). Потенциальный успех комбинации ИКТ с мРНК-вакцинами ожидают в клинических исследованиях, проводящихся на пациентах с терминальной стадией заболевания, у которых традиционные методы лечения оказались неэффективными (NCT03815058, NCT03289962, NCT05949775, NCT05192460, NCT05359354, NCT06541639).

Исследования, проводимые в странах Евросоюза и США

Вакцина мРНК-4157. В 2017 году компания Moderna (США) запустила фазу I клинического испытания персонализированной вакцины мРНК-4157 (NCT03313778) (рис. 2). На первом этапе пациенты с резецированными (часть А) и неоперабельными (часть В) солидными опухолями получали четыре дозы монотерапии мРНК-4157 внутримышечно или комбинированной терапии с пембролизумабом по схемам постепенного повышения дозы с 0.04 до 1 мг. В ходе этапа расширения дозы группа была поделена на три части: участники с неоперабельными, местнораспространенными или метастатическими солидными опухолями (части В и С) и резецирован-

ной меланомой кожи (часть D). Им было рекомендовано применение 1 мг мРНК-4157 в комбинации с пембролизумабом и/или химиотерапией. В 2019 году были опубликованы первые результаты, согласно которым безопасность препарата подтверждалась отсутствием у всех 33 пациентов краткосрочных тяжелых побочных реакций (≥ 3 -й степени), а иммуногенность – наличием у каждого пациента полифункциональных неоантител-специфических Т-клеток в ответ на целевые неоантителы. Из 13 пациентов, получавших адъювантную монотерапию мРНК-4157, 92.3% не имели признаков заболевания при медиане наблюдения 8 месяцев. Оставшиеся 20 пациентов получали комбинированное лечение, состоящее из мРНК-вакцины и пембролизумаба, и 14 из них ответили на комбинированную терапию: в половине случаев регистрировалась частичная ремиссия или стабилизация заболевания, в другой половине наблюдали прогрессирование заболевания или иммуносупрессию. Таким образом, мРНК-4157 была безопасна и хорошо переносилась при всех протестированных уровнях дозы. Представленные результаты показали эффективность алгоритма подбора целевых неоантител и акцентировали внимание на перспективности клинического использования стратегии индивидуализированной терапии неоантителной мРНК-вакциной, что подтвердило возможность перехода мРНК-4157 ко II фазе клинических испытаний [109].

На конференции Общества иммунотерапии опухолей (Сан-Диего, Калифорния, США), прошедшей в ноябре 2023 года, результаты применения мРНК-4157 были дополнены. При оценке безопасности и переносимости у всех пациентов наблюдалось ≥ 1 нежелательное явление, возникшее в процессе лечения; нежелательных явлений четвертой или пятой степени тяжести, ограничивающих дозу, зафиксировано не было. Самыми частыми побочными явлениями были усталость (67%), лихорадка (60%) и боль в месте инъекции (40%). У всех пациентов были зарегистрированы Т-клеточные ответы, 85% которых идентифицированы как ответы *de novo*. Причем наибольшая амплитуда таких ответов наблюдалась после начала комбинированной терапии с пембролизумабом. Также отметили, что высокий процент иммунных ответов на комбинацию мРНК-4157 с пембролизумабом у пациентов ассоциирован с активированным фенотипом Т-клеток, а низкий – с распространностью фенотипа наивных Т-клеток [89]. Исследование мРНК-4157 продолжается и является основой для этапов, включающих группы больных с опухолями других локализаций.

В 2019 году было запущено исследование KEYNOTE-942 (фаза II) эффективности индиви-

дуализированной вакцины мРНК-4157 у пациентов с меланомой стадий III–IV после полной хирургической резекции с высоким риском рецидива (NCT03897881). Пациенты получали комбинированную терапию мРНК-4157 с пембролизумабом ($n = 107$) или монотерапию пембролизумабом ($n = 50$). Вакцину мРНК-4157 (1 мг) вводили внутримышечно 9 раз с периодичностью в 3 недели, а пембролизумаб (200 мг) – внутривенно каждые 3 недели на протяжении 18 циклов. При минимальном сроке наблюдения 14 месяцев в группе пациентов, прошедших полный курс лечения, у 22% (24/107) пациентов в группе комбинированного лечения и у 40% (20/50) пациентов на монотерапии зафиксированы неблагоприятные исходы (рецидивы или смерть). Безрецидивная выживаемость в группе комбинированной терапии была лучше, чем в группе, получавшей монотерапию (83 против 77% в течение 12 месяцев и 79 против 62% в течение 18 месяцев). Случаи отдаленного рецидива или смерти через 24 месяца отмечены у 8% пациентов после комбинированной терапии и 24% пациентов на монотерапии [110].

Обнадеживающие результаты применения вакцины мРНК-4157 компаний Moderna и Merck & Co (США) позволили перейти к исследованиям NCT06307431 и NCT06305767, начатым в 2024 году. Предполагается, что терапия мРНК-4157 в комбинации с пембролизумабом будет эффективнее монотерапии пембролизумабом при почечно-клеточном раке (NCT06307431) и стандартного лечения при мышечно-инвазионном уротелиальном раке (NCT06305767). Эти испытания охватывают от 8 до 15 стран и продолжаются до 2031–2032 годов. Кроме того, в начале 2025 года компания Moderna в партнерстве с Merck & Co (США) начала проведение III фазы клинических испытаний вакцины мРНК-4157 в комбинации с пембролизумабом для лечения плоскоклеточного рака кожи (NCT06295809), меланомы (NCT05933577) и немелкоклеточного рака легкого (NCT06077760). В каждом исследовании принимает участие от 20 до 33 стран, а количество пациентов составляет от 868 до 1089 человек.

Цевумеран. Компаниями BioNTech (Германия) и Genentech (США) в 2017 году были запущены клинические испытания фазы I мРНК-препарата цевумеран (NCT03289962) для лечения пациентов с меланомой, раком головы и шеи, колоректальным раком, немелкоклеточным раком легкого, раком мочевого пузыря и другими прогрессирующими солидными опухолями (рис. 2). Оценивали безопасность, иммуногенность и предварительную эффективность монотерапии ($n = 30$) и комбинации с атезолизумабом.

бом ($n = 183$) у пациентов, получавших предшествующую терапию. Согласно данным по безопасности, 9 из 30 пациентов, получавших монотерапию цевумераном, и 47 из 183 пациентов, получавших комбинированную терапию с атезолизумабом, прекратили лечение в связи с прогрессированием заболевания. У 90% пациентов, получавших монотерапию цевумераном, зафиксированы побочные эффекты: у 3 пациентов они были классифицированы как 3-я степень, у остальных 24 – 1-я или 2-я степень. Отмечено одно явление дозолимитирующей токсичности 3 степени при монотерапии 100 мкг цевумерана, однако пациент после устранения побочных эффектов продолжил участие в исследовании на условии сниженной дозы до прогрессирования заболевания на 82 день. При сочетанном применении цевумерана и атезолизумаба зарегистрированы три нежелательных явления 4-й или 5-й степени, позднее 11 пациентов прекратили лечение из-за нежелательных иммуноопосредованных реакций, преимущественно в группе монотерапии атезолизумабом. У остальных участников лечение проходило с минимальными побочными эффектами, самыми распространенными из которых были инфузионные реакции (56.7 и 59.6% при монотерапии и комбинированной терапии соответственно), синдром высвобождения цитокинов (30 и 20.8%) и гриппоподобные явления (3.3 и 12.6%). При оценке предварительной эффективности у 71% пациентов были зафиксированы полиэпитопные неоантителен-специфические реакции, охватывающие CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки и сохранявшиеся до 23 месяцев. При этом, CD8⁺ Т-клетки, специфичные для нескольких неоантителенов, составляли в среднем 7.3% циркулирующего пула CD8⁺ Т-клеток, а также обнаруживались в опухолевых очагах, составляя до 7.2% от общего числа опухоль-инфильтрирующих Т-клеток. Из-за ограниченного объема и неоднородности выборок по каждому типу опухоли получить статистически значимые результаты о взаимосвязи между клиническим эффектом и иммунным ответом не удалось. У пациента с микросателлитно-стабильным раком прямой кишки (низкий уровень PD-L1) достигнут полный ответ на комбинированную терапию аутологичным цевумераном (9 доз по 38 мкг) и атезолизумабом продолжительностью 8.2 месяца. Пациентка с высокодифференцированным раком молочной железы (высокий уровень PD-L1) по причине прогрессирования опухоли на фоне экспериментального лечения ниволумабом была переведена на аутологичный цевумеран в дозе 38 мкг и атезолизумаб, что привело к частичному ответу с уменьшением размеров метастазов в легких на протяжении 9.9 месяца. Полученные результаты позволили

обосновать целесообразность дальнейшего изучения цевумерана и инициировали новые клинические испытания I-II фаз [111].

В 2019 году BioNTech (Германия) совместно с Genentech (США) запустили I фазу клинических испытаний цевумерана против резецированной аденокарциномы поджелудочной железы (NCT04161755). В исследование вошли 16 пациентов, получавших после операции атезолизумаб и цевумеран, 15 из которых затем прошли курс химиотерапии по схеме mFOLFIRINOX. Профиль безопасности оценивали по количеству и степени нежелательных реакций, а предварительную эффективность – по Т-клеткам, специфичным к неоантителенам вакцины, безрецидивной и общей выживаемости в течение 18 месяцев. У 15 из 16 пациентов аутогенный цевумеран переносился без нежелательных реакций 3–5 степени, у одного пациента наблюдалась лихорадка и артериальная гипертензия, оцененные как нежелательная реакция 3-й степени. Появление специфичных к неоантителенам Т-клеток было зафиксировано у 8 из 16 пациентов, причем они составляли до 10% всех Т-клеток крови, сохраняли функциональность и вырабатывали IFN- γ даже после проведенной химиотерапии, нарабатывались повторно при введении бустерной дозы вакцины и включали до 2.5% сохранившихся в течение 2 лет после операции полифункциональных неоантителен-специфических эфекторных CD8⁺ Т-клеток. При наблюдении в течение 18 месяцев медиана общей и безрецидивной выживаемости у восьми пациентов с Т-клеточным ответом на вакцину превысила 18 месяцев, в то время как у восьми не ответивших пациентов медиана безрецидивной выживаемости равнялась 13.4 месяца. Поскольку активность Т-клеток у пациентов с резецированной аденокарциномой поджелудочной железы коррелировала с отсроченным рецидивом, было начато глобальное рандомизированное исследование фазы II [30].

Несмотря на опубликованные в 2023 году результаты, наблюдение за пациентами фазы I продолжалось и в 2025 году результаты NCT04161755 были дополнены. При медиане наблюдения 3.2 года (2.3–4.0 года) у всех восьми ответивших на терапию пациентов отсутствовал рецидив. Таким образом, шесть из восьми реципиентов остались в ремиссии, в то время как у семи из восьми, не ответивших на терапию, зафиксирован рецидив. Дополнительно изучали происхождение и продолжительность жизни специфических клонов Т-клеток. Установлено, что цевумеран индуцирует клоны CD8⁺ Т-клеток со средней продолжительностью жизни 7 лет. При этом индуцированные вак-

циной клонами не обнаруживаются в тканях до вакцинации, а 86% из них сохраняют цитотоксическое, тканерезидентное состояние Т-клеток памяти на протяжении 3 лет после вакцинации с сохранением неоантител-специфической эффекторной функции. Результатом этого наблюдения стал вывод об устойчивой корреляции между ответом на вакцину и выживаемостью без прогрессии в течение 3.6 лет [32].

В 2023 году началось рандомизированное исследование II фазы препарата цевумеран (NCT05968326). Схема лечения пациентов с протоковой adenокарциномой поджелудочной железы после хирургической резекции включает комбинацию цевумерана, атезолизумаба и химиотерапии mFOLFIRINOX против одиночной химиотерапии. Также в рамках II фазы исследований препарат цевумеран в комбинации с ИКТ получают пациенты с меланомой (NCT03815058) и мышечно-инвазивным уротелиальным раком (NCT06534983), а в качестве монотерапии – больные раком прямой или толстой кишки (NCT04486378). В январе 2025 года завершилось исследование NCT03815058, но результаты пока не доступны. Окончания других исследований следует ожидать не ранее 2029 года.

Исследования, проводимые в Китае

На январь 2025 года в Китае проводятся 14 из представленных на сайте clinicaltrials.gov испытаний ранней I и I фаз, пять – в США (табл. 1). Разработкой мРНК-вакцин занимаются такие китайские компании, как Stemirna Therapeutics, NeoCura, Everest Medicines, Hangzhou Neoantigen Therapeutics, Jiangsu Synthgene Biotechnology, Shanghai Regenelead Therapies и Shanghai Xinpu BioTechnology.

В октябре 2024 года были опубликованы результаты доклинических исследований китайской противоопухолевой вакцины SW1115C3 [112]. Препарата показал эффективность на мышиных моделях опухолей CT26, MC38 и B16F10, активируя неоантител-специфические цитотоксические Т-клетки и вызывая секрецию цитотоксических цитокинов. Это позволило перейти к I фазе клинических испытаний на двух пациентках. Первая пациентка с распространенным раком желудка, множественными метастазами и низкой мутационной нагрузкой достигла безрецидивной выживаемости 8.4 месяца и частичной ремиссии после комбинированного приема SW1115C3 с ведолизумабом и пембролизумабом. Вторая пациентка с люминальным раком молочной железы типа B после неоадъювантной терапии и иммунизации мРНК-вакциной показала устойчи-

вый Т-клеточный ответ на 11 из 20 неоантител. Через год после операции у нее не выявлено рецидива или метастазирования, продолжается мониторинг.

Компания Stemirna Therapeutics начала исследования эффективности монотерапии вакциной STZD-1801 у пациентов с раком пищевода и немелкоклеточным раком легкого (NCT03908671) и комбинированной терапии мРНК-вакциной и стинтилимабом распространенных солидных опухолей (NCT05949775) и гепатоцеллюлярной карциномы (NCT05761717) [80]. Компания NeoCura запустила исследование эффективности монотерапии мРНК-вакцины и в комбинации с ИКТ у пациентов с распространенными солидными опухолями (NCT05359354), выделяя в отдельное исследование больных раком желудка, пищевода или печени (NCT05192460). Противоопухолевая мРНК-вакцина iNeo-Vac-R01 от компании Hangzhou Neoantigen Therapeutics (Китай) направлена на распространенные новообразования пищеварительной системы и изучается в рамках трех параллельных исследований с целью выбора наиболее эффективной тактики лечения (NCT06019702, NCT06026800, NCT06026774). На фазе I клинических испытаний находится мРНК-вакцина EVM16 от компании Everest Medicines с включением пациентов с рецидивирующими или распространенными солидными опухолями, получающими монотерапию вакциной или комбинированную терапию с тислелизумабом (NCT06541639). Эффективность различных комбинаций противоопухолевой мРНК-вакцины с химиотерапией и ИКТ оценивают в исследованиях, инициированных компаниями Jiangsu Synthgene Biotechnology, Shanghai Regenelead Therapies и Shanghai Xinpu BioTechnology Company Limited. В группы исследований вошли пациенты с раком поджелудочной железы (NCT06326736, NCT06156267, NCT06496373) и немелкоклеточным раком легкого (NCT06735508). Однако результаты всех описанных исследований еще не опубликованы.

Исследования, проводимые в Российской Федерации

В сентябре 2024 года НМИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи заявил о завершении доклинических испытаний отечественной мРНК-вакцины против меланомы, созданной совместно с НМИЦ радиологии Минздрава России¹ (рис. 2). Согласно официальному сайту НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина набор пациентов для проведения

¹ ria.ru [интернет]. Российская вакцина от рака прошла доклинические испытания. 2014–2025. Режим доступа: <https://ria.ru/20240906/vaktsina-1971091162.html>. Дата обращения: 06.09.2024.

I фазы клинических испытаний стартует не ранее второй половины 2025 года¹.

Согласно распоряжению Правительства Российской Федерации от 3 февраля 2025 г. № 195-р создан научно-технологический центр развития мРНК-технологий. Функции головной научной организации возложены на ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации².

¹ www.ronc.ru [интернет]. НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина: главное о противоопухолевой мРНК-вакцине. 2024–2025. Режим доступа: <https://www.ronc.ru/about/press-tsentr/glavnoe-o-protivoopukholevoy-mrnk-vaktsine/> Дата обращения: 05.02.2025.

² Распоряжение Правительства Российской Федерации № 195-р от 3 февраля 2025 г. «О создании центра развития мРНК-технологий». Режим доступа: <http://government.ru/docs/54127/> Дата обращения: 05.02.2025.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клинические испытания мРНК-вакцин, структурно основанных на специфических опухолевых антигенах, показывают высокую эффективность как в монорежиме, так и в комбинации с ИКТ в отношении широкого спектра онкологических заболеваний. При этом гибкость мРНК-технологии позволяет учитывать множество вариантов мишени (неантителенов), использовать различные конструкции молекулы мРНК и способы доставки препаратов на ее основе, а их доступность способствует быстрому внедрению в практическую онкологию. ●

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 075-00490-25-04 (регистрационный номер темы 125042105351-3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023.
2. Shah A, Apple J, Belli AJ, et al. Real-world study of disease-free survival & patient characteristics associated with disease-free survival in early-stage non-small cell lung cancer: a retrospective observational study. *Cancer Treat Commun.* 2023;36:100742. doi: 10.1016/j.ctarc.2023.100742
3. Garg P, Pareek S, Kulkarni P, et al. Next-Generation Immunotherapy: Advancing Clinical Applications in Cancer Treatment. *J Clin Med.* 2024;13(21):6537. doi: 10.3390/jcm13216537
4. Parvez A, Choudhary F, Mudgal P, et al. PD-1 and PD-L1: architects of immune symphony and immunotherapy breakthroughs in cancer treatment. *Front Immunol.* 2023;14:1296341. doi: 10.3389/fimmu.2023.1296341
5. Yuan Y, Gao F, Chang Y, et al. Advances of mRNA vaccine in tumor: a maze of opportunities and challenges. *Biomark Res.* 2023;11(1):6. doi: 10.1186/s40364-023-00449-w
6. Fang E, Liu X, Li M, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):94. doi: 10.1038/s41392-022-00950-y
7. Mu X, Hur S. Immunogenicity of in vitro-transcribed RNA. *Acc Chem Res.* 2021;54(21):4012–4023. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00521
8. Gao M, Zhang Q, Feng XH, et al. Synthetic modified messenger RNA for therapeutic applications. *Acta Biomater.* 2021;131:1–15. doi: 10.1016/j.actbio.2021.06.020
9. Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, et al. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(18):7035–7056. doi: 10.1093/nar/12.18.7035
10. Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, et al. Nanomedicines to deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(2):364. doi: 10.3390/nano10020364
11. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(16):6077–6081. doi: 10.1073/pnas.86.16.6077
12. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990;247(4949 Pt 1):1465–1468. doi: 10.1126/science.1690918
13. Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, et al. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science.* 1992;255(5047):996–998. doi: 10.1126/science.1546298
14. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol.* 1993;23(7):1719–1722. doi: 10.1002/eji.1830230749
15. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res.* 1995;55(7):1397–1400.
16. Zhou WZ, Hoon DS, Huang SK, et al. RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization. *Hum Gene Ther.* 1999;10(16):2719–2724. doi: 10.1089/10430349950016762
17. Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest.* 2002;109(3):409–417. doi: 10.1172/jci14364
18. Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, et al. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol.* 2000;30(1):1–7. doi: 10.1002/1521-4141(200001)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-#
19. Probst J, Weide B, Scheel B, et al. Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther.* 2007;14(15):1175–1180. doi: 10.1038/sj.gt.3302964
20. Karikó K, Kuo A, Barnathan E. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following

- administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. *Gene Ther.* 1999;6(6):1092–1100. doi: 10.1038/sj.gt.3300930
21. Karikó K, Ni H, Capodici J, et al. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12542–12550. doi: 10.1074/jbc.M310175200
22. Karikó K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity.* 2005;23(2):165–175. doi: 10.1016/j.jimmuni.2005.06.008
23. Krammer F, Palese P. Profile of Katalin Karikó and Drew Weissman: 2023 Nobel laureates in Physiology or Medicine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2024;121(9):e2400423121. doi: 10.1073/pnas.2400423121
24. Szabó GT, Mahiny AJ, Vlatkovic I. COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments. *Mol Ther.* 2022;30(5):1850–1868. doi: 10.1016/j.molther.2022.02.016
25. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature.* 2017;547(7662):222–226. doi: 10.1038/nature23003
26. Sahin U, Türeci Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy. *Science.* 2018;359(6382):1355–1360. doi: 10.1126/science.aar7112
27. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015;348(6230):69–74. doi: 10.1126/science.aaa4971
28. Zhao W, Wu J, Chen S, Zhou Z. Shared neoantigens: ideal targets for off-the-shelf cancer immunotherapy. *Pharmacogenomics.* 2020;21(9):637–645. doi: 10.2217/pgs-2019-0184
29. Klebanoff CA, Wolchok JD. Shared cancer neoantigens: Making private matters public. *J Exp Med.* 2018;215(1):5–7. doi: 10.1084/jem.20172188
30. Rojas LA, Sethna ZM, Soares KC, et al. Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature.* 2023;618:144–150. doi: 10.1038/s41586-023-06063-y
31. Weber J, Luke JJ, Carlino MS, et al. INTerpath-001: Pembrolizumab with V940 (mRNA-4157) versus pembrolizumab with placebo for adjuvant treatment of high-risk stage II–IV melanoma. *Lancet.* 2024;403(10427):632–644. doi: 10.1016/S0140-6736(23)02268-7
32. Sethna Z, Guasp P, Reiche C, et al. RNA neoantigen vaccines prime long-lived CD8⁺ T cells in pancreatic cancer. *Nature.* 2025;639(8056):1042–1051. doi: 10.1038/s41586-024-08508-4
33. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol.* 2019;30(1):44–56. doi: 10.1093/annonc/mdy495
34. Richters MM, Xia H, Campbell KM, et al. Best practices for bioinformatic characterization of neoantigens for clinical utility. *Genome Med.* 2019;11(1):56. doi: 10.1186/s13073-019-0666-2
35. Nguyen BQT, Tran TPD, Nguyen HT, et al. Improvement in neoantigen prediction via integration of RNA sequencing data for variant calling. *Front Immunol.* 2023;14:1251603. doi: 10.3389/fimmu.2023.1251603
36. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
37. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 2011;17(1):10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200
38. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9(4):357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
39. Benjamin D, Sato T, Cibulskis K, et al. Calling Somatic SNVs and Indels with Mutect2. *bioRxiv.* 2019. doi: 10.1101/861054
40. Saunders CT, Wong WS, Swamy S, et al. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinformatics.* 2012;28(14):1811–1817. doi: 10.1093/bioinformatics/bts271
41. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012;22(3):568–576. doi: 10.1101/gr.129684.111
42. Wood DE, White JR, Georgiadis A, et al. A machine learning approach for somatic mutation discovery. *Sci Transl Med.* 2018;10(457):eaar7939. doi: 10.1126/scitranslmed.aar7939
43. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
44. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
45. Patro R, Duggal G, Love MI, et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14(4):417–419. doi: 10.1038/nmeth.4197
46. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, et al. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* 2016;34(5):525–527. doi: 10.1038/nbt.3519
47. Szolek A, Schubert B, Mohr C, et al. OptiType: precision HLA typing from next-generation sequencing data. *Bioinformatics.* 2014;30(23):3310–3316. doi: 10.1093/bioinformatics/btu548
48. Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics.* 2016;32(4):511–517. doi: 10.1093/bioinformatics/btv639
49. O'Donnell TJ, Rubinsteyn A, Bonsack M, et al. MHCflurry: Open-Source Class I MHC Binding Affinity Prediction. *Cell Syst.* 2018;7(1):129–132.e4. doi: 10.1016/j.cels.2018.05.014
50. Fleri W, Paul S, Dhanda SK, et al. The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Front Immunol.* 2017;8:278. doi: 10.3389/fimmu.2017.00278
51. Abelin JG, Keskin DB, Sarkizova S, et al. Mass Spectrometry Profiling of HLA-Associated Peptidomes in Mono-allelic Cells Enables More Accurate Epitope Prediction. *Immunity.* 2017;46(2):315–326. doi: 10.1016/j.jimmuni.2017.02.007
52. Yu W, Yu H, Zhao J, et al. NeoDesign: a computational tool for optimal selection of polyvalent neoantigen combinations. *Bioinformatics.* 2024;40(10): btae585. doi: 10.1093/bioinformatics/btae585
53. Lu RM, Hsu HE, Perez S, et al. Current landscape of mRNA technologies and delivery systems for new modality therapeutics. *J Biomed Sci.* 2024;31(1):89. doi: 10.1186/s12929-024-01080-z
54. Lorenz R, Bernhart SH, Höner Zu Siederdissen C, et al. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol.* 2011;6:26. doi: 10.1186/1748-7188-6-26
55. Zadeh JN, Steenberg CD, Bois JS, et al. NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. *J Comput Chem.* 2011;32(1):170–173. doi: 10.1002/jcc.21596
56. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3406–3415. doi: 10.1093/nar/gkg595
57. Ni L. Advances in mRNA-Based Cancer Vaccines.

- Vaccines.* 2023;11(10):1599. doi: 10.3390/vaccines11101599
58. Fu Q, Zhao X, Hu J, et al. mRNA vaccines in the context of cancer treatment: from concept to application. *J Transl Med.* 2025;23(1):12. doi: 10.1186/s12967-024-06033-6
59. Kraft JC, Freeling JP, Wang Z, et al. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci.* 2014;103(1):29–52. doi: 10.1002/jps.23773
60. Tenchov R, Bird R, Curtze AE, et al. Lipid Nanoparticles – From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano.* 2021;15(11):16982–17015. doi: 10.1021/acsnano.1c04996
61. Bartlett S, Skwarczynski M, Toth I. Lipids as activators of innate immunity in peptide vaccine delivery. *Curr Med Chem.* 2020;27(17):2887–2901. doi: 10.2174/0929867325666181026100849
62. Brewer JM, Pollock KG, Tetley L, et al. Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles. *J Immunol.* 2004;173(10):6143–6150. doi: 10.4049/jimmunol.173.10.6143
63. Ghaffar KA, Giddam AK, Zaman M, et al. Liposomes as nanovaccine delivery systems. *Curr Top Med Chem.* 2014;14(9):1194–1208. doi: 0.2174/1568026614666140329232757
64. Henriksen-Lacey M, Christensen D, Bramwell VW, et al. Liposomal cationic charge and antigen adsorption are important properties for the efficient deposition of antigen at the injection site and ability of the vaccine to induce a CMI response. *J Control Release.* 2010;145(2):102–108. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.03.027
65. Miller CR, Bondurant B, McLean SD, et al. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry.* 1998;37(37):12875–12883. doi: 10.1021/bi980096y
66. Swetha K, Kotla NG, Tunki L, et al. Recent advances in the lipid nanoparticle-mediated delivery of mRNA vaccines. *Vaccines.* 2023;11(3):658. doi: 10.3390/vaccines11030658
67. Christensen D, Henriksen-Lacey M, Kamath AT, et al. A cationic vaccine adjuvant based on a saturated quaternary ammonium lipid have different in vivo distribution kinetics and display a distinct CD4 T cell-inducing capacity compared to its unsaturated analog. *J Control Release.* 2012;160(3):468–476. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.016
68. Tanaka Y, Taneichi M, Kasai M, et al. Liposome-coupled antigens are internalized by antigen-presenting cells via pinocytosis and cross-presented to CD8 T cells. *PLoS One.* 2010;5(12):e15225. doi: 10.1371/journal.pone.0015225
69. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, et al. The interaction of liposomes with the complement system: in vitro and in vivo assays. *Methods Enzymol.* 2003;373:136–154. doi: 10.1016/S0076-6879(03)73010-9
70. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408(6813):740–745. doi: 10.1038/35047123
71. Henriksen-Lacey M, Devitt A, Perrie Y. The vesicle size of DDA:TDB liposomal adjuvants plays a role in the cell-mediated immune response but has no significant effect on antibody production. *J Control Release.* 2011;154(2):131–137. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.05.019
72. Lee Y, Lee YS, Cho SY, Kwon HJ. Perspective of peptide vaccine composed of epitope peptide, CpG-DNA, and liposome complex without carriers. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2015;99:75–97. doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.03.004
73. Vabulas RM, Pircher H, Lipford GB, et al. CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol.* 2000;164(5):2372–2378. doi: 10.4049/jimmunol.164.5.2372
74. Schulz O, Diebold SS, Chen M, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature.* 2005;433(7028):887–892. doi: 10.1038/nature03326
75. Zaks K, Jordan M, Guth A, et al. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol.* 2006;176(12):7335–7345. doi: 10.4049/jimmunol.176.12.7335
76. Jin B, Sun T, Yu XH, et al. Immunomodulatory effects of dsRNA and its potential as vaccine adjuvant. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:690438. doi: 10.1155/2010/690438
77. Liu Y, Janeway CA Jr. Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4 T-cell growth. *Int Immunol.* 1991;3(4):323–332. doi: 10.1093/intimm/3.4.323
78. Werninghaus K, Babiak A, Gross O, et al. Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRy-Syk-Card9-dependent innate immune activation. *J Exp Med.* 2009;206(1):89–97. doi: 10.1084/jem.20081445
79. Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater.* 2021;6(12):1078–1094. doi: 10.1038/s41578-021-00358-0
80. Fan T, Xu C, Wu J, et al. Lipopolyplex-formulated mRNA cancer vaccine elicits strong neoantigen-specific T cell responses and antitumor activity. *Sci Adv.* 2024;10(41):eadn9961. doi: 10.1126/sciadv.adn9961
81. Kisakov DN, Karpenko LI, Kisakova LA, et al. Jet injection of naked mRNA encoding the RBD of the SARS-CoV-2 spike protein induces a high level of a specific immune response in mice. *Vaccines.* 2025;13(1):65. doi: 10.3390/vaccines13010065
82. Ramos da Silva J, Bitencourt Rodrigues K, Formoso Pelegrin G, et al. Single immunizations of self-amplifying or non-replicating mRNA-LNP vaccines control HPV-associated tumors in mice. *Sci Transl Med.* 2023;15(686):eabn3464. doi: 10.1126/scitranslmed.abn3464
83. Cao Y, Gao GF. mRNA vaccines: a matter of delivery. *EClinicalMedicine.* 2021;32:100746. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100746
84. Pambudi NA, Sarifudin A, Gandidi IM, et al. Vaccine cold chain management and cold storage technology to address the challenges of vaccination programs. *Energy Rep.* 2022;8:955–972. doi: 10.1016/j.egyr.2021.12.039
85. Schmidt M IV, Derhovanessian E, Omokoko T, et al. 88MO T-cell responses induced by an individualized neoantigen specific immune therapy in post (neo)adjuvant patients with triple negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2020;31(4):S276. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.209
86. Chen J, Ye Z, Huang C, et al. Lipid nanoparticle-mediated lymph node-targeting delivery of mRNA cancer vaccine elicits robust CD8⁺ T cell response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2022;119(34):e2207841119. doi: 10.1073/pnas.2207841119
87. Ols S, Yang L, Thompson EA, et al. Route of vaccine administration alters antigen trafficking but not innate or adaptive immunity. *Cell Rep.* 2020;30(12):3964–3971.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.111
88. Weber JS, Carlino MS, Khattak A, et al. Individualised neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) plus pembrolizumab versus pembrolizumab monotherapy in resected melanoma (KEYNOTE-942): a randomised, phase 2b study. *Lancet.* 2024;403(10427):632–644. doi: 10.1016/S0140-6736(23)02268-7

89. Gainor JF, Patel MR, Weber JS, et al. T-cell responses to individualized neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) alone or in combination with pembrolizumab in the phase 1 KEYNOTE-603 study. *Cancer Discov.* 2024;14(11):2209–2223. doi: 10.1158/2159-8290.CD-24-0158
90. Cafri G, Gartner JJ, Zaks T, et al. mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *J Clin Invest.* 2020;130(11):5976–5988. doi: 10.1172/JCI134915
91. Islam MA, Rice J, Reesor E, et al. Adjuvant-pulsed mRNA vaccine nanoparticle for immunoprophylactic and therapeutic tumor suppression in mice. *Biomaterials.* 2021;266:120431. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120431
92. Wang QT, Nie Y, Sun SN, et al. Tumor-associated antigen-based personalized dendritic cell vaccine in solid tumor patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(7):1375–1387. doi: 10.1007/s00262-020-02496-w
93. Thomas KS. Intramuscular injections for COVID-19 vaccinations. *J Nucl Med Technol.* 2021;49(1):11–12. doi: 10.2967/jnmt.121.262049
94. Persano S, Guevara ML, Li Z, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination. *Biomaterials.* 2017;125:81–89. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.019
95. Rini BI, Stenzl A, Zdrojowy R, et al. IMA901, a multipeptide cancer vaccine, plus sunitinib versus sunitinib alone, as first-line therapy for advanced or metastatic renal cell carcinoma (IMPRINT): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(11):1599–1611. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30408-9
96. Wang B, Pei J, Xu S, et al. Recent advances in mRNA cancer vaccines: meeting challenges and embracing opportunities. *Front Immunol.* 2023;14:1246682. doi: 10.3389/fimmu.2023.1246682
97. Gradel AKJ, Porsgaard T, Lykkesfeldt J, et al. Factors affecting the absorption of subcutaneously administered insulin: effect on variability. *J Diabetes Res.* 2018;1205121. doi: 10.1155/2018/1205121
98. Oberli MA, Reichmuth AM, Dorkin JR, et al. Lipid nanoparticle assisted mRNA delivery for potent cancer immunotherapy. *Nano Lett.* 2017;17(3):1326–1335. doi: 10.1021/acs.nanolett.6b03329
99. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature.* 2017;547(7662):217–221. doi: 10.1038/nature22991
100. Lorentzen CL, Haanen JB, Met Ö, et al. Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2022;23(10):e450–e458. doi: 10.1016/S1470-2045(22)00372-2
101. Haabeth OAW, Blake TR, McKinlay CJ, et al. Local delivery of Ox40l, Cd80, and Cd86 mRNA kindles global antineoplastic immunity. *Cancer Res.* 2019;79(7):1624–1634. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2867
102. Diken M, Kreiter S, Selmi A, et al. Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation. *Gene Ther.* 2011;18(7):702–708. doi: 10.1038/gt.2011.17
103. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines – a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261–279. doi: 10.1038/nrd.2017.243
104. Choueiri TK, Powles T, Braun D, et al. 45 INTerpath-004: a phase 2, randomized, double-blind study of pembrolizumab with V940 (mRNA-4157) or placebo in the adjuvant treatment of renal cell carcinoma. *Oncologist.* 2024;29(1):S15. doi: 10.1093/oncolo/oyae181.022
105. Sonpavde GP, Valderrama BP, Chamie K, et al. Phase 1/2 INTerpath-005 study: V940 (mRNA-4157) plus pembrolizumab with or without enfortumab vedotin (EV) for resected high-risk muscle-invasive urothelial carcinoma (MIUC). *J Clin Oncol.* 2025;43(5):TPS893. doi: 10.1200/JCO.2025.43.5_suppl.TPS893
106. Sadeghi RH, Monkman J, Warkiani ME, et al. Understanding the tumor microenvironment for effective immunotherapy. *Med Res Rev.* 2021;41(3):1474–1498. doi: 10.1002/med.21765
107. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol.* 2018;8:86. doi: 10.3389/fonc.2018.00086
108. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, et al. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Curr Oncol.* 2022;29(5):3044–3060. doi: 10.3390/curoncol29050247
109. Burris HA, Patel MR, Cho DC, et al. A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors. *J Clin Oncol.* 2019;37(15):2523. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2523
110. Khattak A, Weber JS, Meniawy TM, et al. Distant metastasis-free survival results from the randomized, phase 2 mRNA-4157-P201/KEYNOTE-942 trial. *J Clin Oncol.* 2023;41(17):LBA9503–LBA9503. doi: 10.1200/JCO.2023.41.17_suppl.LBA9503
111. Lopez J, Powles T, Braiteh F, et al. Autogene cevumab with or without atezolizumab in advanced solid tumors: a phase 1 trial. *Nat Med.* 2025;31(1):152–164. doi: 10.1038/s41591-024-03334-7
112. Chen JK, Eisenberg E, Krutchkoff DJ, et al. Changing trends in oral cancer in the United States, 1935 to 1985: a Connecticut study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991;49(11):1152–1158. doi: 10.1016/0278-2391(91)90406-C

УДК 616.348-002-053.3

Кишечная микробиота и короткоцепочечные жирные кислоты в патогенезе некротизирующего энтероколита у глубоко недоношенных новорожденных

Е. Н. Кукаев^{1,2*}, А. О. Токарева¹, О. А. Крог-Йенсен^{1,3}, А. А. Лёнюшкина¹,
Н. Л. Стародубцева^{1,4}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФГБУН Федерального исследовательского центра химической физики имени Н.Н. Семёнова РАН, Москва, 119991 Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, 119048 Россия

⁴Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Московская область, 141701 Россия

*E-mail: e_kukaev@oparina4.ru

Поступила в редакцию 29.01.2025

Принята к печати 25.06.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27623

РЕФЕРАТ Формирование симбиотической кишечной экосистемы – необходимый этап адаптации новорожденного ребенка. Микробиом кишечника глубоко недоношенных новорожденных характеризуется нестабильностью, снижением микробного разнообразия с преобладанием грамотрицательных *Proteobacteria*, что сопряжено с одним из ключевых патогенетических механизмов развития некротизирующего энтероколита (НЭК). Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) представляют собой основные бактериальные метаболиты, играющие важную роль в поддержании целостности кишечного барьера и регуляции иммунологической реактивности кишечника. В обзоре обсуждается роль кишечной микробиоты и КЦЖК при некротизирующем энтероколите у новорожденных в аспекте потенциальных диагностических и терапевтических возможностей. В клинических исследованиях содержания КЦЖК в кале недоношенных новорожденных с НЭК обнаружено выраженное снижение общего уровня КЦЖК и большинства бактериальных метаболитов в отдельности, что подтверждено в ряде модельных экспериментов. Для уточнения роли КЦЖК в развитии НЭК, определения их диагностического потенциала и возможностей создания комплексных про- и постбиотических формул необходимо проведение многоцентровых мультиомиксных исследований на большой выборке глубоко недоношенных новорожденных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА некротизирующий энтероколит, глубоко недоношенные новорожденные, диагностика, газовая хроматография с масс-спектрометрией, короткоцепочечные жирные кислоты, микробиота.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГХ – газовая хроматография; ЖХ – жидкостная хроматография; КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты; МС – масс-спектрометрия; НЭК – некротизирующий энтероколит; ОРИТН – отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

Некротизирующий энтероколит (НЭК) – тяжелое заболевание желудочно-кишечного тракта новорожденных, в основе которого лежит выраженное воспаление стенки кишечника с последующим некрозом и возможной перфорацией. НЭК является наиболее часто встречающимся серьезным желудочно-кишечным осложнением недоношенных детей и редко встречается у детей, рожденных после 32 недель [1]. Основными предрасполагающими факторами развития чрезмерного воспаления в кишечнике являются незрелость желудочно-кишечного тракта, нарушение процесса бактериальной колонизации и отсутствие энтерального питания грудным молоком [2]. Заболеваемость НЭК обратно пропорциональна гестационному возрасту, составляя от 2 до 10% у глубоко недоношенных детей (28–32 недели гестации) и достигая 55% среди экстремально недоношенных новорожденных [3].

Несмотря на достижения современной медицины, на протяжении многих лет заболеваемость НЭК остается относительно стабильной среди детей с очень низкой массой тела при рождении и является одной из основных причин неблагоприятных исходов в этой когорте детей. Необходимость хирургического вмешательства по поводу перфорации кишечника или подозрения на нее при НЭК составляет от 20 до 52%. Летальность у детей очень низкой массы тела при развитии хирургического НЭК в развитых странах составляет в среднем 30%, достигая 50–72% среди новорожденных с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) [4, 5]. Клинические наблюдения также демонстрируют крайне неблагоприятное течение НЭК при сочетании таких факторов, как врожденная пневмония, гемодинамически значимый артериальный проток и экстремально низкая масса тела при рождении [6]. У 22.7–35% новорожденных, перенесших хирургическую стадию НЭК, развивается синдром кишечной недостаточности – снижение функции кишечника ниже уровня, необходимого для абсорбции макронутриентов и/или воды и электролитов [7]. Помимо поражения желудочно-кишечного тракта, реализация НЭК значительно повышает риск неблагоприятных неврологических исходов. Воспаление в кишечнике, как в органе с поверхностью большой площади, обширной васкуляризацией и высокой степенью концентрации иммунных клеток, может способствовать не только перфорации кишечной стенки, но и развитию системных эффектов заболевания, оказывающих влияние на другие ткани и органы [8]. Согласно проспективным когортным исследованиям, изучавшим отдаленные исходы НЭК, задержка нейропсихического развития отмечается у 37.6–56.8%

недоношенных массой менее 1000 г при рождении, что значительно превышает показатели у детей без НЭК [9].

С учетом высокой распространенности НЭК и значительного риска неблагоприятных исходов одним из приоритетных направлений в изучении этого заболевания является разработка инновационных предиктивных и диагностических методов. Идентификация ранних специфичных биомаркеров НЭК открывает возможность выявления чрезмерного воспалительного процесса в кишечнике еще до появления клинических симптомов [10]. Такой подход позволит своевременно выделять группы наибольшего риска, что, в свою очередь, обеспечит раннее начало консервативного лечения и перспективное внедрение таргетных инновационных методов терапии. Особенно важным представляется использование неинвазивных методов предикции и диагностики, которые исключают флегботомические потери и болевые раздражители, что критично для новорожденных с очень низкой массой тела. Одним из таких методов считается определение уровня фекального кальпротектина как потенциального раннего биомаркера НЭК у недоношенных детей. Однако его диагностическая ценность остается предметом научных дискуссий [11].

В последние два десятилетия микробиом кишечника стал объектом интенсивного изучения благодаря его ключевой роли в поддержании здоровья и ассоциации с различными патологиями, такими как сахарный диабет, астма, воспалительные заболевания кишечника, включая НЭК [12]. Пониженная частота воспалительных заболеваний у людей с высоким содержанием бактерий-продуцентов КЦЖК и, соответственно, с более высокими концентрациями КЦЖК стимулировала активное развитие исследований в этой области [13]. В то время как анализ состава микробиоты кишечника требует применения дорогостоящих и затратных по времени исполнения методов, таких как секвенирование 16S рРНК, которое предоставляет большой массив данных, сложный для интерпретации врачом-клиницистом, количественный анализ метаболической активности микроорганизмов по уровням КЦЖК в кале методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) заслуживает особого внимания [14, 15]. Этот метод является быстрым, точным и неинвазивным, что делает его оптимальным для использования в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН), особенно у глубоко недоношенных детей с высоким риском развития НЭК.

Целью данного обзора является обобщение и анализ современных данных о патогенетической роли

КЦЖК, ключевых метаболитов микробиоты кишечника, в развитии НЭК у глубоко недоношенных новорожденных (менее 32 недель гестации). Это направление представляется перспективным как для понимания патогенеза заболевания, так и для разработки новых диагностических и профилактических стратегий.

МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА В ПАТОГЕНЕЗЕ НЭК

Бактериальное сообщество желудочно-кишечного тракта представляет собой огромную популяцию микроорганизмов (около 10^{12} – 10^{14} клеток), которые относятся к 100–1000 видов. Это экосистема, которую часто называют «вторым геномом» или даже «вторым мозгом», из-за ее способности влиять на различные функции организма, высвобождая в кровоток тысячи веществ [14].

У новорожденного микробиом начинает формироваться с самого рождения и зависит от множества факторов, таких как способ родоразрешения (естественные роды или кесарево сечение), режим питания (грудное или искусственное вскармливание) и окружающая среда [16]. Поначалу состав микробиоты новорожденного очень пластичен и изменчив, но стабилизируется в раннем детстве [17]. Длительное пребывание в медицинских учреждениях, антибактериальная терапия, питание через оро- или назогастральный зонд, отсутствие контакта с материнской микрофлорой, а также недостаток материнского молока являются ключевыми факторами, влияющими на особенности формирования микробиоты кишечника у недоношенных детей, микробный профиль которой отличается от профиля у доношенных новорожденных [18]. Считается, что колонизация желудочно-кишечного тракта младенцев в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТН) приводит к снижению альфаразнообразия микробного сообщества с одновременным обогащением генами, отвечающими за устойчивость к антибиотикам [19–22].

Кишечник глубоко недоношенных новорожденных преимущественно колонизируется условно патогенными факультативными анаэробами, такими как представители типов *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Это происходит одновременно со снижением численности комменсальных бактерий, например, типов *Actinobacteria* и *Bacteroidota* [23, 24]. В частности, бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, к которому относятся представители *Enterobacter*, *Escherichia* и *Klebsiella* (тип *Proteobacteria*), обладают значительно более высокой относительной численностью. Напротив, полезные бактерии рода *Bifidobacterium* (тип *Actinobacteria*) представлены в значительно меньшем объеме, чем у доношенных

детей [23, 24]. Интересно, что при развитии микробного сообщества у глубоко недоношенных новорожденных часто происходит переход от доминирования одного рода бактерий к другому, что отражает большую динамичность и неустойчивость микробиоты у таких младенцев [22, 25, 26]. Подобные изменения могут быть связаны с воздействием внешних факторов, например, с использованием антибиотиков и особенностями питания [22]. Высокая индивидуальная вариабельность микробиома кишечника недоношенных новорожденных, а также малые численности исследуемых групп затрудняют выделение бактерий, ответственных за развитие НЭК [26].

Ранее обнаружили снижение разнообразия кишечного микробиома у глубоко недоношенных детей, а при этом показано, что уменьшение этого разнообразия еще более выражено у младенцев, у которых развивается НЭК [27]. Следует отметить, что снижение количества комменсальных бактерий, в частности, представителей рода *Bifidobacterium* (тип *Actinobacteria*) и *Bacteroides* (тип *Bacteroidota*), и увеличение численности условно-патогенных микроорганизмов типа *Proteobacteria* (в особенности, семейства *Enterobacteriaceae*) и *Firmicutes* (роды *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus* и *Blautia*) становится все более выраженным [27–31]. Связь класса *Gammaproteobacteria*, включающего семейство *Enterobacteriaceae*, с развитием НЭК показана в одном из крупнейших продольных исследований среди недоношенных детей с массой тела менее 1500 г при рождении [31]. Повышение численности потенциально патогенных *Gammaproteobacteria* при одновременном снижении численности *Bacteroides* еще до манифестации НЭК подтверждено и в других работах [27, 32, 33].

Группа под руководством Stewart C.J. и соавт. (2016) предложила рассматривать в аспекте патогенеза НЭК у глубоко недоношенных не отдельные микроорганизмы как потенциальные патогены, а нестабильность формирующегося кишечного микробиома [25]. Эта нестабильность проявляется в частых переходах между доминирующими бактериальными сообществами. В продольном исследовании микробиома кишечника 35 глубоко недоношенных новорожденных НЭК наблюдался исключительно при доминировании бактерий родов *Klebsiella* и *Escherichia* (семейство *Enterobacteriaceae*, тип *Proteobacteria*), либо *Staphylococcus* и *Enterococcus* (тип *Firmicutes*). При этом НЭК не возникал при большем разнообразии бактериального сообщества с высоким относительным содержанием *Bifidobacterium*. Эти данные свидетельствуют о том, что в патогенезе НЭК следует рассматривать не только и не столько фактор

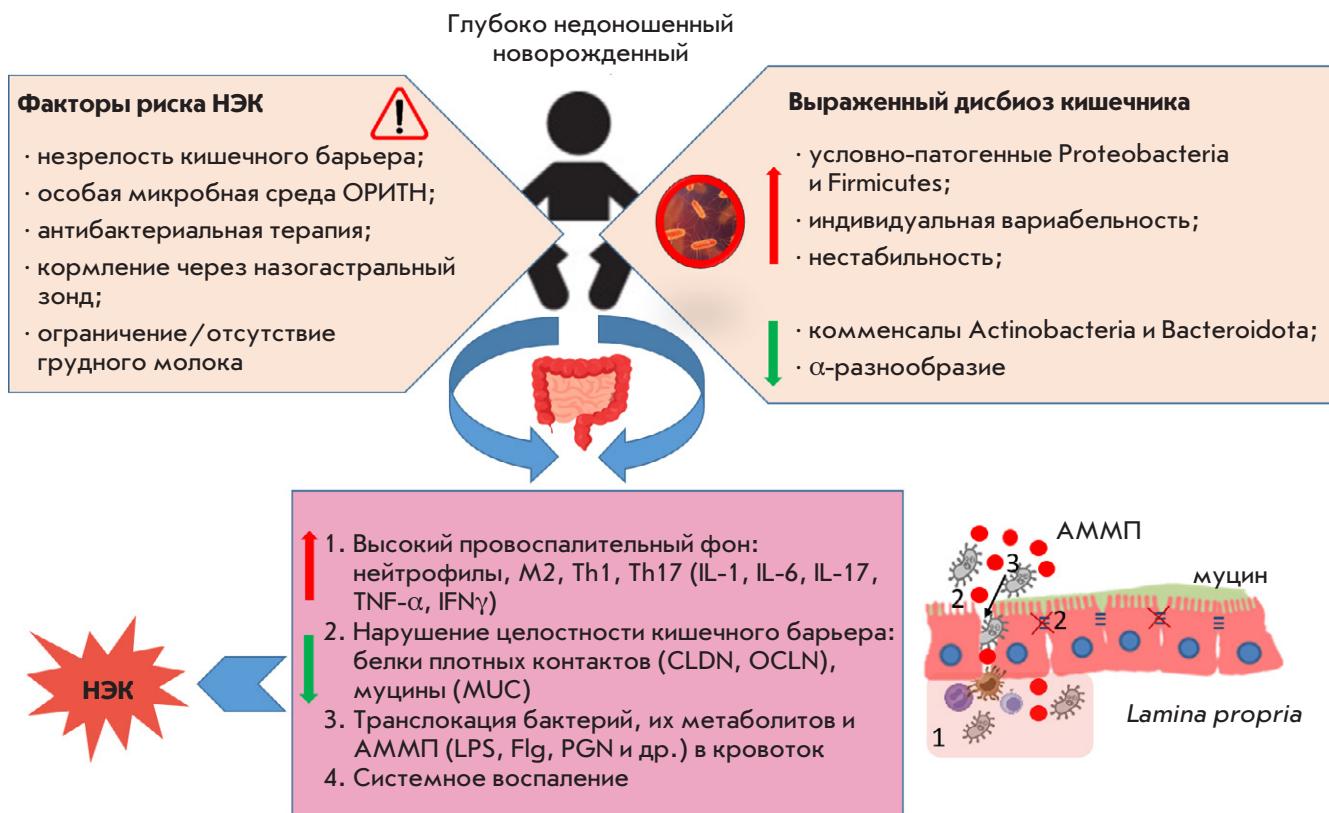


Рис. 1. Схема патогенеза НЭК у глубоко недоношенных новорожденных

колонизации кишечника тем или иным видом патогенных бактерий, а более широко – фактор стабильности и разнообразия микробиома, что подчеркивает многофакторную природу данной патологии [25].

Функциональная незрелость кишечника у глубоко недоношенных новорожденных проявляется в ограниченной способности эпителиальных клеток к полной дифференцировке и снижении количества клеток Панета, что сопровождается уменьшением синтеза защитной слизи [34]. Недостаточное образование кишечной слизи, незрелый иммунитет кишечника, снижение эндогенной продукции antimикробных факторов могут привести к усилиению бактериальной адгезии и повышенному воздействию бактериального эндотоксина (липополисахарида, ЛПС) грамотрицательных бактерий (в частности, превалирующего у таких детей типа *Proteobacteria*), стимулирующему Toll-4-рецепторы (TLR4) эпителиальных клеток, приводя к их апоптозу и нарушению целостности эпителиального барьера кишечника, а также вызывая выраженную воспалительную реакцию, опосредованную TNF α , IL-1 β и другими провоспалительными цитокинами [35]. В конечном итоге, эти процессы повышают риск развития неонатального сепсиса или локально-го воспаления (рис. 1) [6, 36, 37].

При НЭК патоген может и не быть идентифицирован [25]. Диагностика основана на клинических и рентгенологических признаках и не требует выделения конкретного микроорганизма. Тем не менее изучение роли нарушений микробиома в патогенезе НЭК необходимо для того, чтобы профилирование микробиома стало частью клинической практики. Раннее выявление избыточного роста бактерий, особенно видов, связанных с НЭК и поздним началом сепсиса, а также анализ временных изменений структуры микробиома могут быть перспективными подходами к лечению глубоко недоношенных детей [36]. Особое значение придается микробиологическому исследованию отделяемого со слизистой верхних дыхательных путей и ЖКТ в первые сутки жизни как фактору, ассоциированному с реализацией раннего неонатального сепсиса и НЭК у глубоко недоношенных детей [38]. Однако интеграция информации о микробиоте кишечника и ее изменениях в рутинную клиническую практику сталкивается с рядом препятствий, включая значительное разнообразие и сложность состава микробиоты, а также отсутствие стандартных методов и пайплайнов для анализа. Эти факторы значительно усложняют интерпретацию полученных данных и требуют дальнейших исследований.

Культуральные методы традиционно используются для изучения микробиоты через выращивание микроорганизмов на различных питательных средах. Такие методы позволяют детально изучать живые культуры бактерий и проводить функциональные тесты, например, на чувствительность к антибиотикам. Однако они имеют серьезные ограничения: только небольшая часть микроорганизмов кишечника может культивироваться в лабораторных условиях, и процесс культивирования может занимать значительное время. В результате культуральные методы ограниченно отражают видовой состав микробиоты и предоставляют качественные, а не количественные данные [39].

Для амплификации и выявления определенных участков ДНК используется полимеразная цепная реакция (ПЦР) – мощный высокочувствительный молекулярный инструмент, позволяющий быстро обнаруживать присутствие определенных микроорганизмов. Однако ПЦР преимущественно используется для поиска известных видов и не позволяет судить о видовом разнообразии и богатстве состава микробиоты [40].

Метод секвенирования нового поколения (NGS) 16S рРНК приобрел широкую популярность для изучения микробиоты благодаря возможности анализа генетического материала как культивируемых, так и некультивируемых микроорганизмов [40]. Этот метод позволяет идентифицировать видовую принадлежность бактерий, оценивать их относительное количество и потенциальную метаболическую активность. Однако NGS 16S рРНК имеет свои недостатки, такие как сложность в дифференциации близкородственных видов, отсутствие детальной информации о функциональных аспектах бактериальных сообществ, высокая стоимость и временные затраты на анализ, а также сложность обработки и интерпретации данных (табл. 1) [41].

Даже зная состав микробного сообщества и его генетический профиль, 16S рРНК-секвенирование

не позволяет полностью раскрыть функциональную роль каждого вида в микробиоме. Микроорганизмы способны адаптироваться, изменяя уровень синтеза ферментов и их активность, что позволяет им влиять на окружающую среду, членов сообщества, клетки и сам организм хозяина. Для решения этих задач разрабатываются мультиомиксные подходы, объединяющие метагеномику, метатранскриптомику, протеомику и метаболомику. Они предоставляют более полную информацию о выраженности дисбактериоза кишечника, уровнях взаимодействия и метаболической активности микробного сообщества, что может быть особенно полезно в клинических исследованиях и при лечении сложных заболеваний, связанных с изменениями микробиома [42].

КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ – КЛЮЧЕВЫЕ МЕТАБОЛИТЫ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

Бактерии способны синтезировать около 15000 молекул, уникальных для организма человека, к которым иммунные клетки и клетки кишечника экспрессируют специфические рецепторы [43]. Бактериальные метаболиты могут проникать через кишечный барьер и оказывать системное воздействие [44, 45]. Среди таких биоактивных соединений микробного происхождения выделяются антимикробные пептиды, конъюгированная линолевая кислота, гамма-аминомасляная кислота и КЦЖК [45].

В организме человека эти соединения выполняют множество важных функций, включая ингибирование синтеза провоспалительных цитокинов, поддержание целостности эпителиального барьера кишечника, а также стимуляцию пролиферации и дифференцировки колоноцитов [45]. КЦЖК являются универсальными энергетическими субстратами для различных клеток, причем масляная кислота выступает в качестве предпочтительного источника энергии для колоноцитов, обеспечивая 60–70% их энергетических потребностей [46]. Как конечные продукты бактериального метаболизма, КЦЖК

Таблица 1. Сравнение основных методов исследования состава микробиоты: преимущества и ограничения

Метод	Преимущества	Ограничения
Культуральные методы	Позволяют получать живые культуры; возможно проведение функциональных тестов, включая тесты на чувствительность к антибиотикам	Ограниченоное число культивируемых видов; трудоемкость и длительность; данные в основном качественные [39]
ПЦР	Высокая чувствительность; быстрое выявление известных микроорганизмов	Определяет только заранее известные микроорганизмы; не позволяет оценить общее видовое разнообразие [40]
Секвенирование 16S рРНК	Анализ культивируемых и некультивируемых видов; оценка относительного количества; профиль микробиоты	Не различает близкородственные виды; ограниченная функциональная информация; высокая стоимость; сложности интерпретации [40, 41]

представляют собой более информативный индикатор состояния кишечника, чем отдельные микроорганизмы или их комбинации. Раскрытие механизмов действия этих метаболитов является ключевым для идентификации потенциальных биомаркеров НЭК и разработки новых терапевтических мишеней.

Только 5% КЦЖК, продуцируемых в кишечнике, обнаруживаются в фекалиях, поскольку основная часть поглощается колоноцитами [47]. В среднем уровни КЦЖК в фекалиях составляют единицы–десятки ммоль/кг [48]. Лишь небольшая часть (около 1%) КЦЖК в виде солей всасывается в воротную вену [49]. Уксусная кислота (ацетат) является одним из ключевых конечных продуктов гликолиза у множества комменсальных микроорганизмов, включая представителей *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Blautia* (тип Firmicutes), *Bacteroides* и *Prevotella* (тип Bacteroidota), а также *Bifidobacterium* (тип Actinobacteria) [30]. Пропионовая кислота (пропионат) синтезируется ограниченным числом бактерий кишечника через метаболизм сукцината, акрилата и пропандиола. К этим микроорганизмам относятся представители рода *Clostridium*, *Veillonella* (тип Firmicutes), *Propionibacterium* (тип Actinobacteria) и *Bacteroides* (тип Bacteroidota) [4]. Бактерии, производящие масляную кислоту (бутират), в основном относятся к типу Firmicutes, включая семейства *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae* и *Clostridiaceae* [50]. Особенно много производителей бутиратов у видов класса Clostridia [51]. Кроме того, в кишечнике присутствуют бактерии, которые используют конечные продукты метаболизма других микроорганизмов для синтеза масляной кислоты, что предотвращает накопление лактата и ацетата [5]. Например, ацетат, производимый *Bifidobacterium*, преобразуется в бутират бактериями класса Clostridia [52].

Уксусная кислота служит субстратом для биосинтеза жирных кислот, участвует в цикле Кребса [53] и обладает противовоспалительными свойствами [54]. Пропионат способствует улучшению барьерной функции и целостности кишечного эпителия, а также играет важную роль в регуляции гомеостаза глюкозы и липидов в печени [55]. Масляная кислота (бутират) является ключевым источником энергии для эпителиальных и иммунных клеток толстого кишечника [56, 57], повышает экспрессию белков плотных контактов, способствуя поддержанию целостности кишечного барьера [56], и обладает выраженным противовоспалительным эффектом [58].

Для определения взаимосвязи между микробиотой кишечника и состоянием здоровья необходимо обладать надежными количественными методами

определения концентраций метаболитов в различных биологических матрицах, таких как плазма и сыворотка крови, моча, а также фекалии. В современных исследованиях используются подходы, основанные на технике капиллярного электрофореза (КЭ), ядерного магнитного резонанса (ЯМР), жидкостной и газовой хроматографии, соединенных с масс-спектрометрией (ЖХ-МС и ГХ-МС) [59–64]. Методы масс-спектрометрии считаются наиболее предпочтительными для количественного анализа низкомолекулярных соединений благодаря их высокой чувствительности и специфичности [59, 60, 63–66]. Однако применение этих методов к анализу КЦЖК в фекалиях сопряжено с определенными трудностями. Во-первых, высокий уровень содержания липидов в фекалиях снижает эффективность экстракции водорастворимых соединений. Во-вторых, летучие и частично гидрофильные свойства КЦЖК значительно усложняют их анализ методом ЖХ-МС, который требует многоступенчатой пробоподготовки, включая этапы экстракции и дериватизации [67]. Это не только усложняет и удлиняет анализ, но и повышает техническую вариабельность [68]. ГХ-МС является надежным методом количественного определения низкомолекулярных соединений [64, 69, 70]. Благодаря летучей природе КЦЖК их анализ методом ГХ-МС может быть выполнен без дериватизации, если используются хроматографические колонки с высокополярными фазами и особые условия жидкостно-жидкостной экстракции [59, 69].

Что касается анализа фекальных образцов новорожденных, то точность и воспроизводимость количественных исследований могут быть снижены по сравнению с анализом образцов, полученных от взрослых. Это связано с высокой вариабельностью содержания воды, сложностью нормирования массы образца, использованием подгузников и стимуляторов дефекации в ОРИТН, а также с ограниченным объемом доступного биологического материала.

Сравнительная характеристика наиболее часто используемых аналитических методов для определения КЦЖК в фекалиях приведена в табл. 2. Показаны основные подходы, применяемые в клинических и исследовательских условиях, с акцентом на их применимость к анализу фекальных образцов новорожденных. Особое внимание удалено таким параметрам, как чувствительность, специфичность, требования к пробоподготовке и потенциальные ограничения каждого метода. Учитывая летучую природу КЦЖК, ГХ-МС при правильной настройке может представлять собой оптимальный выбор, несмотря на требования к подготовке образца.

Таблица 2. Сравнительная характеристика методов количественного определения КЦЖК в фекалиях

Метод анализа	Принцип	Преимущества	Ограничения
Капиллярный электрофорез [61]	Разделение ионов в электрическом поле в капилляре	<ul style="list-style-type: none"> - Простота метода - Низкий расход реагентов - Возможность одновременного анализа нескольких соединений 	<ul style="list-style-type: none"> - Низкая чувствительность - Требуется высокая степень очистки образца
ЯМР-спектроскопия [62]	Регистрирует магнитные свойства ядер атомов	<ul style="list-style-type: none"> - Неразрушающий метод - Одновременный анализ многих метаболитов - Не требует дериватизации 	<ul style="list-style-type: none"> - Низкая чувствительность - Высокая стоимость оборудования
ЖХ-МС [60, 63, 65, 66]	Разделение соединений в жидкой фазе с последующим ионным анализом	<ul style="list-style-type: none"> - Высокая чувствительность и специфичность - Широкий диапазон определяемых КЦЖК - Возможность изотопного нормирования 	<ul style="list-style-type: none"> - Многоступенчатая пробоподготовка - Необходима дериватизация и/или использование внутренних стандартов - Трудности с летучими соединениями
ГХ-МС [59, 62, 64, 69, 71]	Разделение летучих соединений в газовой фазе и их масс-спектрометрический анализ	<ul style="list-style-type: none"> - Высокая точность и чувствительность - Подходит для анализа летучих КЦЖК - Возможность анализа без дериватизации (при оптимальных условиях) 	<ul style="list-style-type: none"> - Длительная пробоподготовка - Необходима дериватизация для нелетучих соединений - Варьирующая воспроизводимость при анализе фекалий новорожденных

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ КЦЖК

Ключевой функцией КЦЖК является обеспечение энергией клеток кишечника, включая колоноциты и клетки иммунной системы, что способствует активации их метаболизма, пролиферации и дифференцировки [72, 73]. Масляная кислота (бутират), один из ключевых представителей КЦЖК, устраниет дефицит митохондриального дыхания и предотвращает аутофагию в безмикробных колоноцитах, испытывающих дефицит энергии [74].

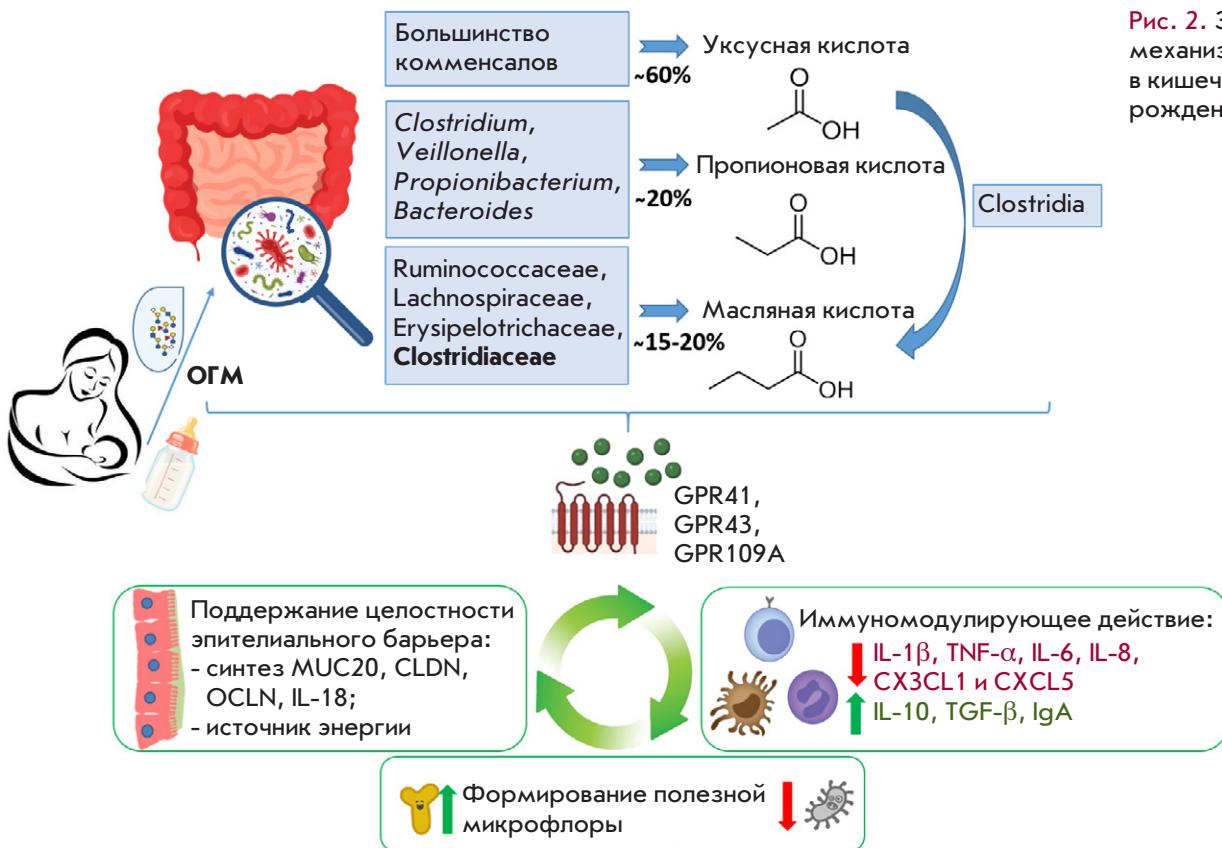
КЦЖК играют решающую роль в поддержании целостности кишечного барьера, препятствуя развитию синдрома повышенной кишечной проницаемости, известного как «дырявый кишечник». Этот синдром облегчает бактериальную транслокацию, усиливает воспалительные процессы и может стать причиной системных осложнений [75]. Добавление бутирата к эпителиальным клеткам нейроглиомы (H4) и включение его в рацион питания мышей увеличивает локальное потребление кислорода, что стабилизирует фактор, индуцируемый гипоксией (HIF). В результате активируется транскрипция генов, участвующих в синтезе ключевых компонентов плотных контактов, таких как муцин (MUC20), клаудины (CLDN2, 4, 11 и 15) и окклюдин (OCLN) [76]. Эти изменения способствуют укреплению межклеточных контактов и предотвращают проникновение патогенов через кишечный барьер.

КЦЖК играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа в кишечнике, что делает их важными медиаторами взаимодействия между микробиотой и иммунной системой [45]. Бутират стимулирует синтез колоноцитами противовоспалительного цито-

кина IL-18, который не только способствует продукции муцина, но и активирует синтез антимикробных пептидов, таких как дефензины и кателицидины, активные против широкого спектра патогенов [77]. Одновременно бактериальный метаболит подавляет индуцированную IL-1 экспрессию провоспалительных генов, включая IL-6, CX3CL1 и CXCL5, что позволяет контролировать состав микробиоты и предотвращать развитие дисбиоза [78, 79].

Будучи лигандами рецепторов, связанных с G-белком (GPR43/FFAR2, GPR41/FFAR3), КЦЖК влияют на активацию и дифференцировку клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета [58, 80]. Бутират направляет дифференцировку макрофагов к M2-иммуносупрессивному фенотипу, который участвует в подавлении воспалительных процессов и поддержании тканевого гомеостаза [81]. Уксусная кислота снижает воспаление кишечника за счет активации рецептора GPR43/FFAR2 гранулоцитов, способствуя уменьшению их воспалительной активности [82].

КЦЖК влияют на уровень экспрессии генов в иммунных клетках посредством эпигенетических механизмов. Например, бутират и пропионат ингибируют гистон-деацетилазы (HDAC), что способствует деконденсации хроматина и активации транскрипции генов, ответственных за иммунорегуляцию [72, 83]. Бутират направляет дифференцировку Т-клеток в Foxp3+ регуляторные Т-клетки (Treg) через ингибицию HDAC [84]. Treg играют центральную роль в подавлении чрезмерного иммунного ответа на комменсалные микроорганизмы и в предотвращении развития хронического вос-



паления. Более того, активация рецепторов GPR43 и GPR109A на дендритных клетках под действием бутират способствует дифференцировке Treg через индукцию синтеза противовоспалительного цитокина IL-10 [85].

КЦЖК также влияют на функцию В-клеток. Исследования Kim M. и соавт. (2016) продемонстрировали, что КЦЖК, особенно ацетат, напрямую стимулируют дифференцировку В-клеток в IgA-продуцирующие клетки [86]. Секреция иммуноглобулина A (IgA) обеспечивает защиту слизистой оболочки кишечника, предотвращая избыточный рост патогенных микроорганизмов и защищая комменсальные [86].

КЦЖК ингибируют рост и колонизацию патогенной микрофлоры кишечника, включая микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae, такие как *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* [87]. Они изменяют внутриклеточный уровень pH у патогенов, что создает неблагоприятные условия для их выживания. Это происходит благодаря способности КЦЖК проникать в неионизированной форме внутрь бактериальной клетки, где они диссоциируют, снижая внутриклеточный pH и нарушая метаболические процессы в клетках патогенов [88].

В колоноцитах бутират активирует рецептор-гамма, активируемый пролифераторами пероксисом-

гамма (PPAR γ), который играет важную роль в регуляции метаболизма жирных кислот. Активация PPAR γ индуцирует β -окисление и увеличивает потребление кислорода колоноцитами, что снижает доступность кислорода в просвете кишечника. Такое изменение кислородной среды ограничивает рост аэробных патогенных микроорганизмов, особенно входящих в семейство Enterobacteriaceae, которые нуждаются в кислороде для пролиферации [89].

Таким образом, КЦЖК, особенно масляная кислота, выступают не только универсальными энергетическими субстратами для клеток кишечника, но и мощными регуляторами местного иммунитета, барьерной функции и микробного гомеостаза (рис. 2). Эффекты КЦЖК особенно важны для глубоко недоношенных детей, у которых из-за незрелости кишечного барьера и иммунной системы повышен риск колонизации патогенными микроорганизмами. Это делает данные метаболиты ключевыми компонентами в предотвращении и лечении таких состояний, как НЭК.

КЦЖК В ПАТОГЕНЕЗЕ НЭК

Дисбиоз кишечника признан одним из ключевых факторов патогенеза НЭК [90]. Многочисленные исследования, проведенные на модельных организмах, подтверждают значимость микробиоты и ее мета-

Таблица 3. Особенности микробиома кишечника и КЦЖК при НЭК у недоношенных новорожденных

Ссылка	Клинические группы	Гестационный возраст, недели	Сутки реализации НЭК	Преобладающие микроорганизмы, тип и доля (%), контроль vs НЭК	КЦЖК, направление изменения и кратность
Liu X.C. и соавт., 2022 [30]	НЭК за 7.0 ± 7.6 дней ($n = 17$) и при манифестации ($n = 12$)	30.5 ± 2.1	30.2 ± 15.9	Proteobacteria ↑ (с 40 до 53%) Firmicutes ↓ (с 55 до 35%) Actinobacteriota ↑ (с 5 до 10%) Bacteroidota ↑ (с 0.5 до 4%)	*Уксусная 1.8↓ **Пропионовая 1.2↓ **Масляная 1.1↓ **Изовалериановая 2.3↓ *КЦЖК 2.4↓
	Контроль ($n = 17$)	30.5 ± 1.9	-		
He Y. и соавт., 2021 [15]	НЭК ($n = 81$)	31.0 (29.4–33.7)	15 (12–19)	***Proteobacteria ↑ (с 27 до 55%) ***Firmicutes ↓ (с 57 до 37%) ***Actinobacteriota ↓ (с 4 до 1%) ***Bacteroidota ↓ (с 10 до 3%)	**Масляная 1.4↓
	Контроль ($n = 81$)	31.1 (29.3–33.2)	-		
Xiong J., 2022 [98]	НЭК ($n = 22$)	35.5 ± 2.2	11.6 (6.8–16.0)	Proteobacteria ↓ (с 50 до 37%) Firmicutes ↑ (с 45 до 57%) *Actinobacteriota ↑ (с 3 до 5%) **Bacteroidota ↓ (с 4 до 1%)	**Уксусная 1.5↓ **Пропионовая 2.3↓ **Масляная 2.7↓ **Изовалериановая 2.0↓ **Капроновая 2.7↓ **КЦЖК 1.6↓
	FPIAP ($n = 21$)	36.5 ± 1.4	15.2 (11.0–22.0)		
Casaburi G. и соавт., 2023 [100]	НЭК ($n = 3$)	~29	-	Proteobacteria ↑	*Муравьиная 6.7↑
	Контроль ($n = 10$)	~29	-		
	НЭК, лечение ($n = 3$)	~29	через 3 недели лечения	Proteobacteria ↓ Bacteroidetes ↑ по сравнению с дебютом НЭК	-
Huang H., 2022 [99]	НЭК ($n = 9$)	31.6 (28.35–37.45)		Proteobacteria ↑ (с 30 до 65%) Firmicutes ↓ (с 65 до 30%) Actinobacteriota ↓ (с 5 до 1%) Bacteroidota ↑ (с 0 до 5%)	Не проводилось
	Контроль ($n = 10$)	37.75 (32.03–39.05)			
Pourcyroux M. и соавт., 2014 [101]	Смесь ($n = 9$)	27	-	Не проводилось	**КЦЖК 1.9↑ **Ацетат 3.1↑ **Пропионат 3.4↑
	Сцеженное молоко ($n = 10$)	27	-		

Примечание. Жирным выделены изменения более чем в 2 раза уровней фекальных КЦЖК в группе НЭК по сравнению с группой контроля. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – при парном сравнении группы НЭК и контроля или группы сравнения.

болитов в развитии данного заболевания [91, 92]. В частности, колонизация безмикробных мышей бактериями, выделенными из фекалий пациентов с НЭК, провоцирует НЭК-подобные повреждения кишечника [15].

Дисбиоз кишечника приводит к нарушению синтеза КЦЖК, что особенно актуально для глубоко недоношенных детей [93], минимальный уровень КЦЖК при рождении у которых постепенно увеличивается с постконцептуальным возрастом при отсутствии НЭК [94–97]. Однако метаболизм КЦЖК у глубоко недоношенных новорожденных остается малоизученным.

Клинические исследования микробиоты кишечника и продуцируемых КЦЖК у глубоко недоношенных новорожденных с НЭК остаются весьма

немногочисленными. В работах 2021–2023 гг. (табл. 3) [15, 30, 98–100] результаты 16S рРНК-секвенирования подтвердили данные о доминировании в микробиоте незрелого кишечника протеобактерий, ассоциируемых с развитием НЭК [27–29, 31]. Одновременно выявлено выраженное снижение численности представителей типа Firmicutes, включающего основные штаммы-продуценты бутиратата, еще до манифестации клинических симптомов заболевания [30].

У новорожденных с НЭК обнаружено достоверное снижение уровней КЦЖК ($p < 0.05$), особенно муравьиной, пропионовой, масляной, изовалериановой и капроновой [15, 30, 98, 100]. Примечательно, что у глубоко недоношенных детей, получавших сцеженное грудное молоко, концентрация КЦЖК

в кале оказалась достоверно выше, чем у детей на искусственном вскармливании [101]. Хотя прямая причинно-следственная связь между уровнем КЦЖК и развитием НЭК требует дальнейшего изучения, полученные данные указывают на потенциальную протективную роль этих метаболитов в поддержании целостности кишечного барьера и модуляции воспалительного ответа.

Однако результаты исследований выявляют значительную вариабельность в абсолютных концентрациях КЦЖК. Например, в работе Liu X.C. и соавт. (2022) средний уровень бутиратта в кале детей контрольной группы составил 41 мкг/г [30], в исследовании He Y. и соавт. (2021) этот показатель достигал 225 мкг/г [15]. Подобные расхождения могут быть обусловлены различиями в применяемых аналитических методах, характеристиках когорт и протоколах сбора и хранения биоматериала.

Обзоры Alsharairi N.A. и соавт. (2023), а также Cifuentes M.P. и соавт. (2024) указывают, что роль бутиратта в развитии неонатального НЭК остается неоднозначной [93, 102]. Однако детальный анализ клинических работ (табл. 3) демонстрирует выраженное снижение уровня бутиратта в кале глубоко недоношенных новорожденных за неделю до появления клинических симптомов НЭК и при дебюте заболевания, что подтверждает его потенциальную диагностическую ценность [15, 30]. У взрослых масляная кислота также ассоциируется с уменьшением риска развития воспалительных заболеваний кишечника, таких как язвенный колит и болезнь Крона [103, 104]. Экспериментальные исследования подчеркивают, что бутират способствует укреплению барьерной функции эпителиальных клеток кишечника и снижает воспалительные реакции иммунных клеток.

В то же время в ряде модельных экспериментов была выявлена негативная роль бутиратта при НЭК [92, 105–108]. Неполное переваривание углеводов в тонком кишечнике приводит к их ферментации в толстом кишечнике с образованием КЦЖК, лактата и газов, таких как углекислый газ, метан и водород [109]. У недоношенных поросят, моделирующих НЭК, избыточное образование бактериальных метаболитов вследствие высокого уровня непереваренной лактозы может запускать воспалительную реакцию [108].

Противоречивые эффекты бутиратта могут быть объяснены его дозозависимым действием, впервые описанным Lin и соавт. (2002) [106]. Более поздние исследования подтвердили, что высокие концентрации бутиратта (более 16 мМ) стимулируют синтез провоспалительного цитокина IL-6, в то время как низкие дозы оказывают защитное действие,

снижая экспрессию IL-6 и NF-кВ, усиливая синтез белка плотных контактов клаудина-7 [57, 110]. На модели НЭК у новорожденных мышей показано, что существует оптимальный уровень масляной кислоты, при котором риск развития НЭК минимизируется [111].

Трудности сопоставления данных, полученных в разных исследованиях, обусловлены разнообразием применяемых методов анализа, небольшим размером выборки глубоко недоношенных новорожденных и вариативностью экспериментальных моделей НЭК. Проведение многоцентровых рандомизированных исследований с унифицированным подходом к сбору биоматериала и анализу микробиологических и метаболических данных может помочь в уточнении роли КЦЖК в патогенезе НЭК, а также в определении оптимальных терапевтических доз этих метаболитов. Вместе с тем, использование ГХ-МС для определения концентраций КЦЖК в фекалиях представляет собой точный, неинвазивный, быстрый и экономически эффективный метод, который можно легко внедрить в рутинную неонатальную практику для ранней диагностики и мониторинга метаболической активности кишечной микрофлоры у глубоко недоношенных новорожденных [102].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование симбиотической экосистемы кишечника является ключевым процессом, необходимым для успешной адаптации новорожденного ребенка. Малый гестационный возраст при рождении, врожденная физиологическая незрелость кишечника, высокая частота родоразрешения путем кесарева сечения, длительная госпитализация с пребыванием в микроокружении отделения интенсивной терапии, антибактериальная терапия, отсутствие контакта с материнской микрофлорой, а также отсутствие или недостаток поступления материнского молока являются ключевыми факторами, способствующими формированию дисбиотической микробной сигнатуры. Микробиом кишечника глубоко недоношенных новорожденных характеризуется преобладанием грамотрицательных бактерий типа *Proteobacteria*, снижением микробного разнообразия и общей нестабильностью. Исследования связывают подобные изменения с повышенным риском жизнеугрожающих состояний, таких как НЭК.

Современные данные подчеркивают важность метаболитов микробиоты, таких как КЦЖК, в поддержании метаболического и иммунного гомеостаза кишечника. Однако большая часть данных получена с использованием мышиных моделей и клеточных линий. Кроме того, все больше данных свидетель-

ствует о том, что метаболизм КЦЖК находится в динамическом равновесии, и отклонения в любую сторону – как избыточно высокие, так и низкие уровни – могут негативно сказываться на здоровье.

Для более глубокого понимания роли КЦЖК и микробиома в патогенезе НЭК необходимы многоцентровые исследования, способные охватить достаточное количество случаев редких заболеваний. Интеграция мультиомиксных подходов, таких как метагеномное секвенирование, транскриптомика и таргетная метаболомика, необходима для определения специфических микробных сообществ и метаболических биомаркеров, включая КЦЖК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neu J, Mshvildadze M, Mai V. A roadmap for understanding and preventing necrotizing enterocolitis. *Current Gastroenterology Reports*. 2008;10(5):450–457. doi: 10.1007/s11894-008-0084-x
2. Ahearn-Ford S, Berrington JE, Stewart CJ. Development of the gut microbiome in early life. *Experimental Physiology*. 2022;107(5):415–421. doi: 10.1113/EP089919
3. Thänert R, Sawhney SS, Schwartz DJ, Dantas G. The resistance within: Antibiotic disruption of the gut microbiome and resistome dynamics in infancy. *Cell Host and Microbe*. 2022;30(5):675–683. doi: 10.1016/j.chom.2022.03.013
4. Reichardt N, Duncan SH, Young P, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME Journal*. 2014;8(6):1323–1335. doi: 10.1038/ismej.2014.14
5. Scheiman J, Luber JM, Chavkin TA, et al. Meta'omic analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nature Medicine*. 2019;25(7):1104–1109. doi: 10.1038/s41591-019-0485-4. Meta
6. Nikitina IV, Lenyushkina AA, Krogh-Jensen OA, et al. Recurrent necrotizing enterocolitis: predictors, biological markers, diagnostic signs, and therapeutic approaches – a year-long case study. *Neonatology: News, Opinions, Training*. 2024;12(3):66–77. doi: 10.33029/2308-2402-2024-12-3-66-77
7. Jones IH, Hall NJ. Contemporary Outcomes for Infants with Necrotizing Enterocolitis—A Systematic Review. *Journal of Pediatrics*. 2020;220:86–92.e3. doi: 10.1016/j.jpeds.2019.11.011
8. Scheese DJ, Sodhi CP, Hackam DJ. New insights into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis and the dawn of potential therapeutics. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2023;32(3):151309. doi: 10.1016/j.semepedsurg.2023.151309
9. Zhou Q, Niño DF, Yamaguchi Y, et al. Necrotizing enterocolitis induces T lymphocyte-mediated injury in the developing mammalian brain. *Science Translational Medicine*. 2021;13(575):1–30. doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAY6621
10. Fullerton BS, Hong CR, Velazco CS, et al. Severe neurodevelopmental disability and healthcare needs among survivors of medical and surgical necrotizing enterocolitis: A prospective cohort study. *Journal of Pediatric Surgery*. 2018;53(1):101–107. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.10.029
11. Pupysheva AF, Savelyeva EI, Piskunova VV, et al. Fecal Calprotectin Levels Dynamics in Newborns with High-Risk of Necrotizing Enterocolitis. *Pediatric Pharmacology*. 2023;20(1):51–55. doi: 10.15690/pfv20i1.2529
12. Thakkar HS, Lakhoo K. Necrotizing enterocolitis. *Surgery (United Kingdom)*. 2022;40(11):713–716. doi: 10.1016/j.mp-
- sur.2022.09.007
13. Hsu CY, Khachatrian LG, Younis NK, et al. Microbiota-derived short chain fatty acids in pediatric health and diseases: from gut development to neuroprotection. *Frontiers in Microbiology*. 2024;15(October):1456793. doi: 10.3389/fmicb.2024.1456793
14. Facchin S, Bertin L, Bonazzi E, et al. Short-Chain Fatty Acids and Human Health: From Metabolic Pathways to Current Therapeutic Implications. *Life*. 2024;14(5):1–44. doi: 10.3390/life14050559
15. He Y, Du W, Xiao S, et al. Colonization of fecal microbiota from patients with neonatal necrotizing enterocolitis exacerbates intestinal injury in germfree mice subjected to necrotizing enterocolitis-induction protocol via alterations in butyrate and regulatory T cells. *Journal of Translational Medicine*. 2021;19(1):510. doi: 10.1186/s12967-021-03109-5
16. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe*. 2015;17(5):690–703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004
17. Cuna A, Morowitz MJ, Ahmed I, Umar S, Sampath V. Dynamics of the preterm gut microbiome in health and disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2021;320(4):G411–G419. doi: 10.1152/AJPGI.00399.2020
18. Yao Y, Cai X, Ye Y, Wang F, Chen F, Zheng C. The Role of Microbiota in Infant Health: From Early Life to Adulthood. *Frontiers in Immunology*. 2021;12(October):708472. doi: 10.3389/fimmu.2021.708472
19. Olm MR, Brown CT, Brooks B, et al. Identical bacterial populations colonize premature infant gut, skin, & oral microbiomes & exhibit different in situ growth rates. *Genome Research*. 2017;27(4):601–612. doi: 10.1101/gr.213256.116
20. Gibson MK, Wang B, Ahmadi S, et al. Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome. *Nature Microbiology*. 2016;1:16024. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.24. Developmental
21. Gasparrini AJ, Wang B, Sun X, et al. Metagenomic signatures of early life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome persist long after discharge. *Nature Microbiology*. 2016;4(12):2285–2297. doi: 10.1038/s41564-019-0550-2. Metagenomic
22. Wandro S, Osborne S, Enriquez C, Bixby C, Arrieta A, Whiteson K. The Microbiome and Metabolome of Preterm Infant Stool Are Personalized and Not Driven by Health Outcomes, Including Necrotizing Enterocolitis and Late-Onset Sepsis. *mSphere*. 2018;3(3):e00104–18. doi: 10.1128/mSphere.3.3.e00104-18

Разработка быстрых и неинвазивных методов функционального профилирования микробиома для применения в клинических условиях позволит создать систему оценки риска развития НЭК у глубоко недоношенных новорожденных. Ассоциация микробных метаболитов с патологиями у новорожденных открывает возможности для создания комплексных про- и постбиотических формул. ●

Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда (№ 24-25-00068):
<https://rscf.ru/project/24-25-00068/>.

- msphere.00104-18
23. Young GR, Van Der Gast CJ, Smith DL, Berrington JE, Embleton ND, Lanyon C. Acquisition and Development of the Extremely Preterm Infant Microbiota Across Multiple Anatomical Sites. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2020;70(1):12-19. doi: 10.1097/MPG.0000000000002549
 24. Patel AL, Mutlu EA, Sun Y, et al. Longitudinal Survey of Microbiota in Hospitalized Preterm Very Low Birth Weight Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(2):292-303. doi: 10.1097/MPG.0000000000000913.Longitudinal
 25. Stewart CJ, Embleton ND, Marrs ECL, et al. Temporal bacterial and metabolic development of the preterm gut reveals specific signatures in health and disease. *Microbiome*. 2016;4(1):67. doi: 10.1186/s40168-016-0216-8
 26. Unger S, Stintzi A, Shah P, Mack D, O'Connor DL. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant. *Pediatric Research*. 2015;77(1):205-213. doi: 10.1038/pr.2014.162
 27. Wang Y, Hoenig JD, Malin KJ, et al. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *Isme*. 2009;3(8):944-954. doi: 10.1038/ismej.2009.37.16S
 28. Lemme-Dumit JM, Song Y, Lwin HW, et al. Altered Gut Microbiome and Fecal Immune Phenotype in Early Preterm Infants With Leaky Gut. *Frontiers in Immunology*. 2022;13(February):815046. doi: 10.3389/fimmu.2022.815046
 29. Torrazza RM, Ukhanova M, Wang X, et al. Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2013;8(12):e83304. doi: 10.1371/journal.pone.0083304
 30. Liu XC, Du TT, Gao X, et al. Gut microbiota and short-chain fatty acids may be new biomarkers for predicting neonatal necrotizing enterocolitis: A pilot study. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13(August):969656. doi: 10.3389/fmicb.2022.969656
 31. Warner PBB, Deych E, Zhou Y, et al. Gut bacteria dysbiosis and necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: a prospective case-control study. *Lancet*. 2017;387(10031):1928-1936. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00081-7.Gut
 32. Morrow AL, Lagomarcino AJ, Schibler KR, et al. Early microbial and metabolomic signatures predict later onset of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome*. 2013;1(1):13. doi: 10.1186/2049-2618-1-13
 33. Olm MR, Bhattacharya N, Crits-Christoph A, et al. Necrotizing enterocolitis is preceded by increased gut bacterial replication, Klebsiella, and fimbriae-encoding bacteria. *Science Advances*. 2019;5(12):eaax5727. doi: 10.1126/sciadv.aax5727
 34. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in Immunology*. 2007;19(2):70-83. doi: 10.1016/j.smim.2007.04.002
 35. Mih B, Good M. Impact of Toll-like receptor 4 signaling in necrotizing enterocolitis: The state of the science. *Clinics in Perinatology*. 2019;46(1):145-157. doi: 10.1177/0022146515594631. Marriage
 36. Healy DB, Ryan CA, Ross RP, Stanton C, Dempsey EM. Clinical implications of preterm infant gut microbiome development. *Nature Microbiology*. 2022;7(January):22-33. doi: 10.1038/s41564-021-01025-4 Clinical
 37. Nikitina IV, Donnikov AE, Krogh-Jensen OA, et al. Genetic predictors of necrotizing enterocolitis in neonates. *Obstetrics and Gynecology*. 2020;12(12):150-158. doi: 10.18565/aig.2020.12.150-158
 38. Krogh-Jensen OA, Nikitina IV, Bragina ON, et al. Body surface cultures in preterm neonates on the first day of life: clinical usefulness. *Obstetrics and Gynecology* 2023;(8):108-123. doi: 10.18565/aig.2022.8.108-123
 39. Gupta S, Mortensen MS, Schjørring S, et al. Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing. *Communications Biology*. 2019;2:291. doi: 10.1038/s42003-019-0540-1
 40. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology*. 2017;243:16-24. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.022
 41. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY. Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14(10):908-934. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x
 42. Sher Y, Olm MR, Raveh-Sadka T, et al. Combined analysis of microbial metagenomic and metatranscriptomic sequencing data to assess *in situ* physiological conditions in the premature infant gut. *PLoS One*. 2020;15(3):e0229537. doi: 10.1371/journal.pone.0229537
 43. Wishart DS, Oler E, Peters H, et al. MiMeDB: the Human Microbial Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*. 2023;51(1 D):D611-D620. doi: 10.1093/nar/gkac868
 44. Liu M, Lu Y, Xue G, et al. Role of short-chain fatty acids in host physiology. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2024;(June):641-652. doi: 10.1002/ame.2.12464
 45. Takeuchi T, Nakanishi Y, Ohno H. Microbial Metabolites and Gut Immunology. *Annual review of immunology*. 2024;42(1):153-178. doi: 10.1146/annurev-immunol-090222-102035
 46. Martin-Gallaixaux C, Marinelli L, Blottière HM, Larrauje P, Lapaque N. SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2021;80(1):37-49. doi: 10.1017/S0029665120006916
 47. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*. 2013;54(9):2325-2340. doi: 10.1194/jlr.R036012
 48. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016;7(3):189-200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082
 49. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In: *Advances in Immunology*. Vol 121. 1st ed. Elsevier Inc.; 2014:91-119. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9
 50. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(4):1654-1661. doi: 10.1128/AEM.66.4.1654-1661.2000
 51. Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology*. 2010;12(2):304-314. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x
 52. Turroni F, Milani C, Duranti S, Mahony J, van Sinderen D, Ventura M. Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria. *Trends in Microbiology*. 2018;26(4):339-350. doi: 10.1016/j.tim.2017.10.001
 53. Liu L, Fu C, Li F. Acetate affects the process of lipid metabolism in rabbit liver, skeletal muscle and adipose tissue. *Animals*. 2019;9(10):799. doi: 10.3390/ani9100799

54. Ma J, Liu Z, Gao X, et al. Gut microbiota remodeling improves natural aging-related disorders through Akkermansia muciniphila and its derived acetic acid. *Pharmacological Research*. 2023;189(February):106687. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106687
55. Langfeld LQ, Du K, Bereswill S, Heimesaat MM. A review of the antimicrobial and immune-modulatory properties of the gut microbiota-derived short chain fatty acid propionate - What is new? *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2021;11(2):50-56. doi: 10.1556/1886.2021.00005
56. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(JUN):979. doi: 10.3389/fmicb.2016.00979
57. Liu J, Zhu H, Li B, et al. Beneficial effects of butyrate in intestinal injury. *Journal of Pediatric Surgery*. 2020;55(6):1088-1093. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2020.02.036
58. Liu P, Wang Y, Yang G, et al. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis. *Pharmacological Research*. 2021;165(September 2020):105420. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105420
59. Yao L, Davidson EA, Shaikh MW, Forsyth CB, Prenni JE, Broeckling CD. Quantitative analysis of short-chain fatty acids in human plasma and serum by GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(15):4391-4399. doi: 10.1007/s00216-021-03785-8
60. Saha S, Day-Walsh P, Shehata E, Kroon PA. Development and validation of a lc-ms/ms technique for the analysis of short chain fatty acids in tissues and biological fluids without derivatisation using isotope labelled internal standards. *Molecules*. 2021;26(21):6444. doi: 10.3390/molecules26216444
61. Garcia A, Olmo B, Lopez-Gonzalvez A, Cornejo L, Rupérez FJ, Barbas C. Capillary electrophoresis for short chain organic acids in faeces. Reference values in a Mediterranean elderly population. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;46(2):356-361. doi: 10.1016/j.jpba.2007.10.026
62. Cai J, Zhang J, Tian Y, et al. Orthogonal Comparison of GC-MS and 1 H NMR Spectroscopy for Short Chain Fatty Acid Quantitation. *Analytical Chemistry*. 2017;89(15):7900-7906. doi: 10.1002/hep.30150.Ductular
63. Zheng J, Zheng SJ, Cai WJ, Yu L, Yuan BF, Feng YQ. Stable isotope labeling combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for comprehensive analysis of short-chain fatty acids. *Analytica Chimica Acta*. 2019;1070:51-59. doi: 10.1016/j.aca.2019.04.021
64. Hoving LR, Heijink M, van Harmelen V, van Dijk KW, Giera M. GC-MS analysis of short-chain fatty acids in feces, cecum content, and blood samples. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1730:247-256. doi: 10.1007/978-1-4939-7592-1_17
65. Dei Cas M, Paroni R, Saccardo A, et al. A straightforward LC-MS/MS analysis to study serum profile of short and medium chain fatty acids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2020;1154:1-12. doi: 10.1016/j.jchromb.2020.121982
66. Trivedi N, Erickson HE, Bala V, Chhonker YS, Murry DJ. A Concise Review of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Quantification Methods for Short Chain Fatty Acids as Endogenous Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13486. doi: 10.3390/ijms232113486
67. Primec M, Mičetić-Turk D, Langerholc T. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review. *Analytical Biochemistry*. 2017;526:9-21. doi: 10.1016/j.ab.2017.03.007
68. Tumanov S, Bulusu V, Gottlieb E, Kamphorst JJ. A rapid method for quantifying free and bound acetate based on alkylation and GC-MS analysis. *Cancer & Metabolism*. 2016;4(1):17. doi: 10.1186/s40170-016-0157-5
69. Kim KS, Lee Y, Chae W, Cho JY. An Improved Method to Quantify Short-Chain Fatty Acids in Biological Samples Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Metabolites*. 2022;12(6):4-15. doi: 10.3390/metabo12060525
70. Zhang C, Tang P, Xu H, Weng Y, Tang Q, Zhao H. Analysis of Short-Chain Fatty Acids in Fecal Samples by Headspace-Gas Chromatography. *Chromatographia*. 2018;81(9):1317-1323. doi: 10.1007/s10337-018-3572-7
71. Kukaev E, Kirillova E, Tokareva A, et al. Impact of Gut Microbiota and SCFAs in the Pathogenesis of PCOS and the Effect of Metformin Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(19):10636. doi: 10.3390/ijms251910636
72. Luu M, Visekruna A. Short-chain fatty acids: Bacterial messengers modulating the immunometabolism of T cells. *European Journal of Immunology*. 2019;49(6):842-848. doi: 10.1002/eji.201848009
73. Moffett JR, Puthillathu N, Vengilote R, Jaworski DM, Namboodiri AM. Acetate Revisited: A Key Biomolecule at the Nexus of Metabolism, Epigenetics and Oncogenesis—Part 1: Acetyl-CoA, Acetogenesis and Acyl-CoA Short-Chain Synthetases. *Frontiers in Physiology*. 2020;11(November):580167. doi: 10.3389/fphys.2020.580167
74. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Molecular Cell*. 2012;48(4):611-626. doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.033.The
75. Baldassarre ME, Di Mauro A, Capozza M, et al. Dysbiosis and prematurity: Is there a role for probiotics? *Nutrients*. 2019;11(6):1273. doi: 10.3390/nu11061273
76. Zhao J, Hu J, Ma X. Sodium caprylate improves intestinal mucosal barrier function and antioxidant capacity by altering gut microbial metabolism. *Food and Function*. 2021;12(20):9750-9762. doi: 10.1039/d1fo01975a
77. Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, et al. Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal microenvironment by regulating NLRP6 inflammasome signaling. *Cell*. 2015;163(6):1428-1443. doi: 10.1002/hep.30150.Ductular
78. Tian P, Yang W, Guo X, et al. Early life gut microbiota sustains liver-resident natural killer cells maturation via the butyrate-IL-18 axis. *Nature Communications*. 2023;14(1):1710. doi: 10.1038/s41467-023-37419-7
79. Beisner J, Filipe Rosa L, Kaden-Volynets V, Stolzer I, Günther C, Bischoff SC. Prebiotic Inulin and Sodium Butyrate Attenuate Obesity-Induced Intestinal Barrier Dysfunction by Induction of Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Immunology*. 2021;12(June):678360. doi: 10.3389/fimmu.2021.678360
80. van der Hee B, Wells JM. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends in Microbiology*. 2021;29(8):700-712. doi: 10.1016/j.tim.2021.02.001
81. Schulthess J, Pandey S, Capitani M, et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity*. 2019;50(2):432-445.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.018
82. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and

- chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-1286. doi: 10.1038/nature08530
83. Thomas SP, Denu JM. Short-chain fatty acids activate acetyltransferase p300. *eLife*. 2021;10:e72171. doi: 10.7554/eLife.72171
84. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-450. doi: 10.1038/nature12721
85. Sun M, Wu W, Chen L, et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nature Communications*. 2018;9(1):3555. doi: 10.1038/s41467-018-05901-2
86. Kim M, Qie Y, Park J, Kim CH. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host and Microbe*. 2016;20(2):202-214. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.001
87. Kumar M, Singh P, Murugesan S, et al. Microbiome as an Immunological Modifier. *Methods in Molecular Biology*. 2020;2055(1):595-638. doi: 10.1007/978-1-4939-9773-2
88. Sorbara MT, Dubin K, Littmann ER, et al. Inhibiting antibiotic-resistant Enterobacteriaceae by microbiota-mediated intracellular acidification. *Journal of Experimental Medicine*. 2019;216(1):84-98. doi: 10.1084/jem.20181639
89. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, et al. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science*. 2017;357(6351):570-575. doi: 10.1126/science.aam9949
90. Fundora JB, Guha P, Shores DR, Pammi M, Maheshwari A. Intestinal dysbiosis and necrotizing enterocolitis: assessment for causality using Bradford Hill criteria. *Pediatric Research*. 2020;87(2):235-248. doi: 10.1038/s41390-019-0482-9
91. Jilling T, Simon D, Lu J, et al. The Roles of Bacteria and TLR4 in Rat and Murine Models of Necrotizing Enterocolitis. *Journal of Immunology*. 2006;177(5):3273-3282. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.3273
92. Waligora-Dupriet AJ, Dugay A, Auzeil N, Huerre M, Butel MJ. Evidence for clostridial implication in necrotizing enterocolitis through bacterial fermentation in a gnotobiotic quail model. *Pediatric Research*. 2005;58(4):629-635. doi: 10.1203/01.PDR.0000180538.13142.84
93. Alsharairi NA. Therapeutic Potential of Gut Microbiota and Its Metabolite Short-Chain Fatty Acids in Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *Life*. 2023;13(2):561. doi: 10.3390/life13020561
94. Athalye-Jape G, Esvaran M, Patole S, et al. Effect of single versus multistrain probiotic in extremely preterm infants: A randomised trial. *BMJ Open Gastroenterology*. 2022;9(1):e000811. doi: 10.1136/bmjgast-2021-000811
95. Neumann CJ, Mahnert A, Kumpitsch C, et al. Clinical NEC prevention practices drive different microbiome profiles and functional responses in the preterm intestine. *Nature Communications*. 2023;14(1):1349. doi: 10.1038/s41467-023-36825-1
96. Frau A, Lett L, Slater R, et al. The stool volatile metabolome of pre-term babies. *Molecules*. 2021;26(11):3341. doi: 10.3390/molecules26113341
97. Wang C, Shoji H, Sato H, et al. Effects of oral administration of *Bifidobacterium breve* on fecal lactic acid and short-chain fatty acids in low birth weight infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2007;44(2):252-257. doi: 10.1097/01.mpg.0000252184.89922.5f
98. Xiong J, Liao XS, Yin T, Liu XC, Bao L, Li LQ. Alterations of the gut microbiota and short chain fatty acids in necrotizing enterocolitis and food protein-induced allergic protocolitis infants: A prospective cohort study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12(November):1030588. doi: 10.3389/fcimb.2022.1030588
99. Huang H, Peng Q, Zhang Y, et al. Abnormalities in microbial composition and function in infants with necrotizing enterocolitis: A single-center observational study. *Frontiers in Pediatrics*. 2022;10(October):963345. doi: 10.3389/fped.2022.963345
100. Casaburi G, Wei J, Kazi S, et al. Metabolic model of necrotizing enterocolitis in the premature newborn gut resulting from enteric dysbiosis. *Frontiers in Pediatrics*. 2022;10(August):893059. doi: 10.3389/fped.2022.893059
101. Pourcyrous M, Nolan VG, Goodwin A, Davis SL, Buddington RK. Fecal short-chain fatty acids of very-low-birth-weight preterm infants fed expressed breast milk or formula. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2014;59(6):725-731. doi: 10.1097/MPG.00000000000000515
102. Cifuentes MP, Chapman JA, Stewart CJ. Gut microbiome derived short chain fatty acids: Promising strategies in necrotising enterocolitis. *Current Research in Microbial Sciences*. 2024;6(January):100219. doi: 10.1016/j.crmicr.2024.100219
103. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(34):13780-13785. doi: 10.1073/pnas.0706625104
104. Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low counts of *faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009;15(8):1183-1189. doi: 10.1002/ibd.20903
105. Waligora-Dupriet AJ, Dugay A, Auzeil N, et al. Short-chain fatty acids and polyamines in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis: Kinetics aspects in gnotobiotic quails. *Anaerobe*. 2009;15(4):138-144. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.02.001
106. Lin J, Nafday SM, Chauvin SN, et al. Variable effects of short chain fatty acids and lactic acid in inducing intestinal mucosal injury in newborn rats. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2002;35(4):545-550. doi: 10.1097/00005176-200210000-00016
107. Nafday SM, Chen W, Peng L, Babyatsky MW, Holzman IR, Lin J. Short-chain fatty acids induce colonic mucosal injury in rats with various postnatal ages. *Pediatric Research*. 2005;57(2):201-204. doi: 10.1203/01.PDR.0000150721.83224.89
108. Thymann T, Møller HK, Stoll B, et al. Carbohydrate maldigestion induces necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009;297(6):1115-1125. doi: 10.1152/ajpgi.00261.2009
109. Kien CL. Digestion, absorption, and fermentation of carbohydrates in the newborn. *Clinics in Perinatology*. 1996;23(2):211-228. doi: 10.1016/s0095-5108(18)30239-2
110. Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR, Lin J. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatric Research*. 2007;61(1):37-41. doi: 10.1203/01.pdr.0000250014.92242.f3
111. Vieira ELM, Leonel AJ, Sad AP, et al. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(5):430-436. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.01.007

УДК 577.24

Пептиды EPFL в регуляции развития и стрессовых ответов у растений

А. Д. Майборода¹, А. А. Макеева¹, Р. А. Азаркина¹, А. С. Барашкова^{1,2}, А. С. Мамаева^{1*}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Санкт-Петербург, Пушкин, 196608 Россия

*E-mail: AnnetteSt@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.2025

Принята к печати 01.07.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27675

РЕФЕРАТ Цистеин-богатые пептиды семейства EPF/EPFL (epidermal patterning factor/epidermal patterning factor-like) распространены у растений, начиная со мхов и заканчивая покрытосеменными. EPF/EPFL играют важную роль в морфогенезе – регулируют расположение устьиц, развитие соцветий, функционирование апикальной и латеральной побеговых меристем, закладку проводящих тканей, формирование края листа, а также развитие цветков и плодов. Недавние исследования показали, что EPFL могут быть вовлечены в адаптацию растений к биотическим и абиотическим стрессам. В обзоре рассмотрены структура, механизмы передачи сигнала, филогенетическое распространение и функции пептидов семейства EPF/EPFL.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА регуляторные пептиды растений, цистеин-богатые пептиды, EPF/EPFL.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EPF – epidermal patterning factor; EPFL – epidermal patterning factor-like; АБК – абсцизовая кислота; МАП – митоген-активируемая протеинкиназа; МДА – малоновый диальдегид; МКМ – материнская клетка мегаспоры.

ВВЕДЕНИЕ

Растения, ведущие прикрепленный образ жизни, адаптируются к изменениям окружающей среды с помощью гибкой системы регуляции физиологических процессов. Важную роль в адаптации играют сигнальные пептиды, контролирующие широкий спектр реакций, включая рост и развитие, половое размножение, межклеточную коммуникацию, старение, формирование симбиотических взаимодействий, а также устойчивость к патогенам и абиотическим стрессам [1, 2]. Первый растительный регуляторный пептид – системин – выделили в 1991 году из листьев томата [3]. С тех пор было описано множество семейств пептидов, образующихся либо путем процессинга белков-предшественников, либо в результате трансляции коротких открытых рамок [1, 4].

Пептиды, происходящие из белков-предшественников, делятся на три функционально и структурно различающиеся группы: посттрансляционно модифицированные [5], цистеин-богатые и немодифицированные, не содержащие остатков цистеина [6, 7]. Цистеин-богатые пептиды содержат четное число остатков цистеина, формирующих дисульфидные

связи, которые обеспечивают стабильность пространственной структуры. Среди представителей этой группы первыми были обнаружены и описаны антимикробные пептиды [8]. Первоначально считалось, что функции цистеин-богатых пептидов ограничены защитой от патогенов [4, 9], однако впоследствии показали, что функции, выполняемые цистеин-богатыми пептидами, гораздо шире и включают регуляцию закладки устьиц, симбиоза, репродуктивных процессов и стрессового ответа [10–12].

Цистеин-богатые пептиды EPF/EPFL были впервые идентифицированы как ключевые регуляторы устьичного развития у *Arabidopsis thaliana* [10, 13–15]. В дальнейшем установили, что эти пептиды участвуют в контроле активности апикальной побеговой меристемы, развитии соцветий и адаптации к стрессам. Несмотря на растущий объем экспериментальных данных, до сих пор отсутствуют систематизированные обзоры, суммирующие информацию об этом семействе. В представленной работе обобщены данные о пептидах EPF/EPFL, включая их структуру, эволюционное разнообразие и биологические функции.

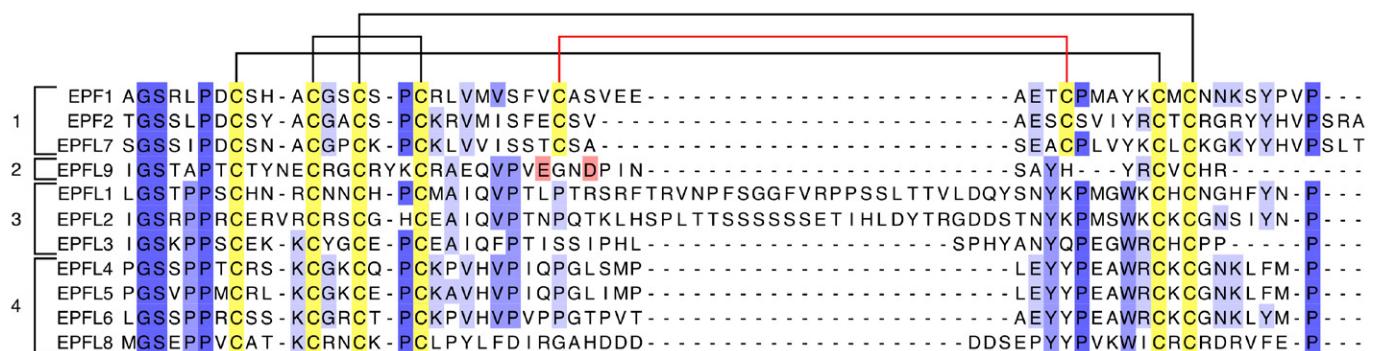


Рис. 1. Множественное выравнивание зрелых пептидов семейства EPF/EPFL *A. thaliana*, полученное при помощи алгоритма Muscle. 1–4 – клады пептидов; аминокислотные остатки Cys отмечены желтым цветом. Три консервативные дисульфидные связи выделены черными скобками, четвертая дисульфидная связь, характерная для клады EPF1/EPF2/EPFL7, показана красным. Аминокислотные остатки Glu28 и Asp31 в EPFL9 выделены розовым. UniProt ID: EPF1: Q8S8I4; EPF2: Q8LC53; EPFL7: C4B8C5; EPFL9: Q9SV72; EPFL1: Q9LFT5; EPFL2: Q9T068; EPFL3: C4B8C4; EPFL4: Q2V3I3; EPFL5: Q9LUH9; EPFL6: Q1PEY6; EPFL8: Q1G3V9

СТРОЕНИЕ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА

К цистеин-богатым пептидам растений, которые условно можно разделить на защитные (антибиотические) и сигнальные, относится ряд семейств, включая EPF/EPFL [16]. Наиболее детально изучена структура защитных пептидов: проведен ЯМР-анализ многих из них, определены структурные детерминанты антибиотической активности [17, 18]. Структурные особенности сигнальных цистеин-богатых растительных пептидов, включая семейство EPF/EPFL, изучены не столь глубоко, однако определена первичная и пространственная структура пептида EPFL9, выделенного из апопласта *A. thaliana* [19, 20]. Более того, получены данные о структурных аспектах связывания ряда пептидов этого семейства с рецептором [21]. У *A. thaliana*, классического модельного объекта, на котором активнее всего проходит изучение этого семейства, выявлено 11 пептидов – EPF1–2 и EPFL1–9, включая EPFL9/Stomagen [22]. Первыми были охарактеризованы EPF1–2, а затем паралоги EPF1, в дальнейшем названные EPFL [23]. В результате филогенетического анализа пептиды семейства EPF/EPFL были разделены на четыре клады (рис. 1). Представители двух из них, EPF1–EPF2/EPFL7 и EPFL9, изучены наиболее подробно.

Как и большинство пептидных гормонов и антибиотических пептидов растений, пептиды семейства EPF/EPFL синтезируются в виде белков-предшественников, состоящих из N-концевого сигнального пептида, про-домена и зрелого пептида (рис. 2A) [24]. Сигнальный пептид направляет предшественник в эндоплазматический ретикулум, после чего отщепляется пептидазами и разрушается. Затем удаляется про-область и высвобождается зрелая форма пептида, способная взаимодействовать с рецепторными комплексами [25].

Первичная структура пептидов семейства EPF/EPFL обогащена остатками цистеина, из которых шесть консервативны для всего семейства, а два характерны только для клады EPF1/EPF2/EPFL7 (рис. 1). Все пептиды семейства содержат мотив

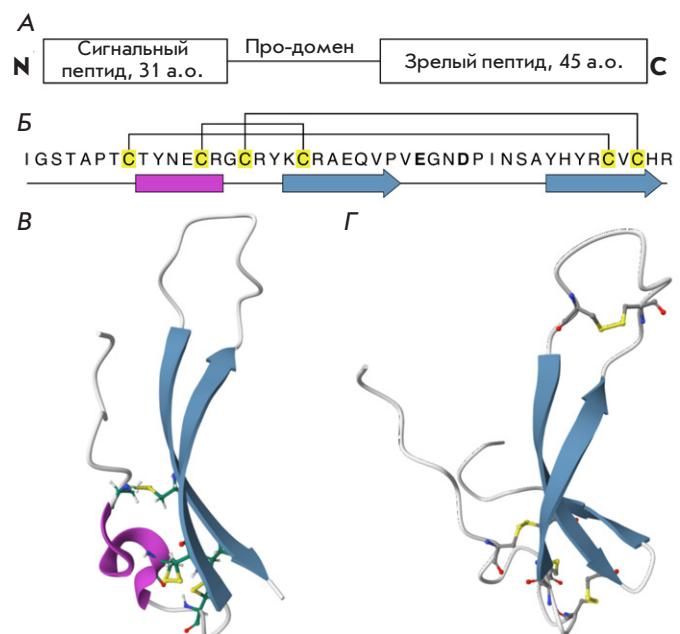


Рис. 2. Структура пептида EPFL9. А – структура пропептида [20]. Б – первичная структура пептида [19]. β -листы показаны голубыми стрелками, фрагмент спирали 3_{10} – розовый прямоугольник; остатки Cys отмечены желтым, дисульфидные связи – скобками. Отрицательно заряженные Glu28 и Asp31 в петлевой области выделены жирным. В – пространственная структура EPFL9 (PDB ID: 2LIY). Г – модель пространственной структуры пептида EPFL7 *A. thaliana*, построенная с помощью алгоритма AlphaFold3 [26]

Gly-Ser в N-концевой области. Известно, что этот мотив критичен для связывания пептидов с рецепторами [21]. Также в N-концевой области присутствует консервативный остаток Pro. Вероятно, что, изгиная полипептидную цепь, этот остаток обеспечивает пространственную конформацию пептида.

По данным ЯМР-спектроскопии, полученным для EPFL9, трехмерная структура EPF/EPFL-пептидов состоит из двух антипараллельных β -листов (скаффолда), соединенных петлевой областью (loop region), и стабилизированного дисульфидными связями (рис. 2B). Петлевая область более вариабельна, чем скаффолд, она играет ключевую роль в специфичности связывания с рецепторами [19]. Пространственные структуры остальных представителей семейства были получены путем гомологичного моделирования.

Консервативные остатки цистеина участвуют в образовании дисульфидных связей, количество и расположение которых влияет на функциональную активность и конформацию пептида. Так, замена остатков цистеина на серин в молекуле EPFL9 приводила к утрате способности стимулировать за кладку устьиц [19]. С другой стороны, вариабельные участки могут определять специфичность функции пептидов. Например, пептиды EPF1–2 являются негативными регуляторами развития устьиц, тогда как EPFL9 выступает в роли позитивного регулятора [20]. По-видимому, различие в физиологических ответах обусловлено особенностями строения петлевой области у этих пептидов [21].

Так, замена аминокислот петлевой области EPF2 на последовательность EPFL9 приводила к смене функции пептида с ингибирования формирования устьиц на их активное развитие. В то же время химерный пептид, содержащий петлю EPF2 и каркас EPFL9, обладал ингибирующими действием [19]. Рецепторами EPFL является семейство киназ ERECTA (ERf, ERECTA family), относящихся к кладе XIII LRR-RLK (Leucine-rich repeat receptor-like kinases, рецептороподобные киназы с лейцин-богатыми повторами). У *Arabidopsis* к этому семейству относятся белки ERECTA (ER), ERECTA-LIKE 1 (ERL1) и ERECTA-LIKE 2 (ERL2). Дальнейший путь передачи сигнала включает МАП-киназный (митоген-активируемая протеинкиназа) каскад, состоящий у арабидопсиса из MAPKKK YODA, MKK4/5 и терминальных MPK3/6 [27]. Взаимодействие пептидов с рецептором зависит от того, находится ли рецептор в комплексе с LRR-RLP (рецептороподобный белок с лейцин-богатыми повторами) ТММ (Too Many Mouth). Интересно, что для связывания EPF1/2 с рецепторами ERf необходимо, чтобы ERf входили в комплекс с ТММ,

тогда как EPFL4 взаимодействует со всеми тремя ERf в отсутствие ТММ [21].

ФИЛОГЕНИЯ. РАСПРОСТРАНЕНИЕ У РАСТЕНИЙ

Пептиды EPF и EPFL обнаружены только у наземных растений и не найдены у водорослей [28, 29]. Это указывает на появление этого семейства лишь после выхода растений на сушу и, возможно, на важную роль в их адаптации к наземной жизни. Предполагается, что ключевые генетические компоненты, обеспечивающие формирование устьичного аппарата, включая EPF/EPFL, возникли на ранних этапах эволюции наземных растений [30].

Последовательности пептидов консервативны у разных таксонов: у мха *Physcomitrium patens* идентифицирован *PpEPF1*, являющийся гомологом *AtEPF1* и *AtEPF2*. Филогенетический анализ показывает, что *PpEPF1* ближе к *AtEPF1* и *AtEPF2*, чем *AtEPFL9* к *AtEPF1–2* [28]. Это довольно интересно, так как устьица у мхов устроены иначе, чем у цветковых, но механизм их развития, судя по всему, сходен [31, 32]. Помимо *PpEPF1*, у мха также идентифицированы 10 пептидов семейства EPFL, функции которых пока не изучены [28]. При этом уже у цветковых растений гены, кодирующие представителей семейства EPF/EPFL, распределены по хромосомам неравномерно, что может быть результатом дупликации генов [33, 34].

Филогенетически семейство этих пептидов у арабидопсиса разделяют на четыре клады: EPF1–EPF2–EPFL7, EPFL9, EPFL1–3 и EPFL4–6–EPFL8 (рис. 1) [28, 34]. Эти группы различаются как по структуре, так и по предполагаемым функциям. Так, представители клады EPF1–EPF2–EPFL7 несут четыре консервативные дисульфидные связи, одна из которых находится в петлевой области, в то время как в структуре пептидов остальных клад присутствует три дисульфидных мостика. Это отражается на способности пептидов связываться с рецепторными комплексами [21, 28].

Пептид EPFL9 представлен у всех исследованных сосудистых растений, начиная с плаунов (*Selaginella moellendorffii*), голосеменных и вплоть до цветковых [28]. При этом он отсутствует у мха *P. patens*, у которого найдены только гомологи EPF1/EPF2. Интересно, что появление EPFL9, который является активатором развития устьиц, совпадает с резким увеличением плотности устьиц на поверхности листьев, произошедшем в позднем девонском периоде, которое дает начало активному развитию макрофиллов – крупных листьев с развитой сосудистой системой [28, 35].

В последние годы количество секвенированных растительных геномов увеличивается, что значи-

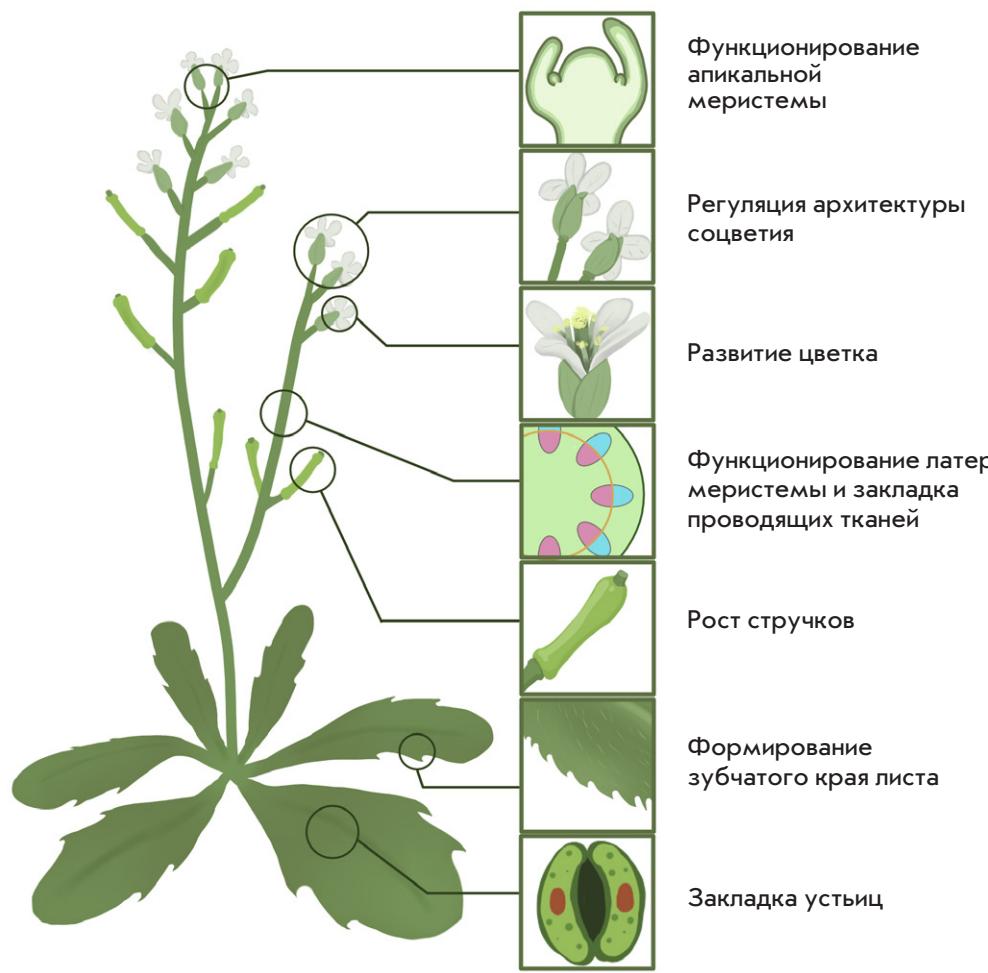


Рис. 3. Морфогенетические процессы, регулируемые пептидами семейства EPF/EPFL, у арабидопсиса

тельно облегчает поиск и дальнейшую валидацию гомологов. Таким образом, биоинформационическими методами были проанализированы геномы большого количества сельскохозяйственных цветковых растений. В четырех геномах хлопчатника обнаружили 132 гена EPF/EPFL: 20 и 24 у диплоидных видов и по 44 гена у тетраплоидных [34]. В растениях картофеля идентифицировали 14 генов [36], рапса – 27 [37]. У тополя волосистого *Populus trichocarpa* идентифицировано 15 генов EPF/EPFL [38], тогда как у тополя евфратского *P. euphratica* – 14 [33]. Гены EPFL обнаружены и у однодольных растений: у риса, сорго и ржи идентифицировано по 12 генов [39–41], у кукурузы – 18 [42], а у пшеницы 35 [43]. Широкое распространение представителей семейства EPF/EPFL в разных линиях эволюции цветковых и других растений подчеркивает их значение в адаптации к наземным условиям обитания, тогда как функции многих недавно идентифицированных гомологов остаются неясными и требуют дальнейшего экспериментального изучения.

ЗАКЛАДКА УСТЬИЦ

Известно, что пептиды семейства EPF/EPFL регулируют целый спектр морфогенетических программ, однако первой выявленной функцией этих пептидов стала регуляция расположения устьиц (рис. 3, табл. 1) [10].

У арабидопсиса *EPF1* экспрессируется в молодых листьях, а именно в клетках-предшественниках устьиц. Сверхэкспрессия *EPF1* приводит к снижению количества устьиц, тогда как нокаут приводит к его увеличению и кластеризации [10]. Гомолог *EPF1*, *EPF2* также ингибирует развитие устьиц: у растений со сверхэкспрессией гена *EPF2* наблюдается снижение, а у растений с нокаутом – увеличение числа устьиц, однако они не образуют кластеры [13]. Оба пептида необходимы для соблюдения «правила одной клетки»: между устьицами должно находиться не менее одной клетки эпидермиса [10, 13, 14]. *EPF2* экспрессируется в предшественниках устьиц раньше, чем *EPF1*. То есть, *EPF2* регулирует переход клеток к дифференцировке в устьица,

Таблица 1. Функции пептидов семейства EPF/EPFL у *A. thaliana*

Пептид	Функция	Ссылка
AtEPF1/2	Ингибирование формирования устьиц	[10, 13, 15, 23, 44]
AtEPFL9 (STOMAGEN)	Стимуляция образования устьиц	[11, 15, 44, 45]
	Удлинение стручка	[46]
AtEPFL2	Формирование зубчатого края листа	[47]
	Равномерная закладка семязачатков и увеличение их числа в стручке	[46]
AtEPFL1/2/4/6	Регуляция функционирования апикальной меристемы	[48–51]
	Повышение устойчивости к патогену	[52]
	Удлинение соцветий и цветоножек	[53]
	Формирование единственной материнской клетки мегаспоры	[54]
AtEPFL1–6	Обрастанье нуцеллуса интегументами	[55]
AtEPFL4–6	Удлинение тычиночных нитей за счет стимуляции пролиферации клеток	[56, 57]

тогда как EPF1 контролирует дальнейшее развитие [10, 14, 15]. Пептид EPFL9, напротив, стимулирует развитие устьиц – сверхэкспрессия EPFL9 приводит к увеличению плотности устьиц и их кластеризации, тогда как сайленсинг ингибирует развитие устьиц [45]. Показано, что EPF2 и EPFL9 связываются с рецептором ER, при этом EPFL9 конкурентно вытесняет EPF2 из этого комплекса [44]. Пептиды EPF1/2 секрециируются клетками устьиц, связываются с ER и ERL1 и ингибируют дифференцировку устьиц, тогда как EPFL9 секрециируется клетками мезофилла, конкурирует с EPF2 за связывание с ER и стимулирует образование устьиц [15, 44]. Таким образом, EPF1/2 и EPFL9 действуют как антагонисты в контроле плотности устьиц [44].

Наиболее подробно роль EPF исследована на примере арабидопсиса, однако участие этих пептидов в регуляции развития устьиц показано и на других растениях. Например, сверхэкспрессия *PeEPF2* – полия, гомолога AtEPF2, в растениях арабидопсиса с нокаутом по гену AtEPF2, приводила к снижению плотности устьиц на листе, восстанавливая мутантный фенотип [33]. Ортологи EPFL, вовле-

ченные в регуляцию развития устьиц у арабидопсиса – AtEPF2 и AtEPFL9, обнаружены в геномах однодольных *Triticum aestivum* и *Brachypodium distachyon* [58]. Как и соответствующие пептиды у арабидопсиса, эти пептиды также оказывают противоположный эффект на развитие устьиц.

Показано, что модуль EPF/TMM/ERECTA является довольно древним регулятором развития устьиц – его компоненты контролируют расположение устьиц у первых наземных растений, в частности, у мха *P. patens* [59]. Устьица у *P. patens* образуются на спорофите, и *PpEPF1*, гомолог EPF1/2 арабидопсиса, негативно регулирует их развитие. Однако сверхэкспрессия *PpEPF1* не способна восстановить нормальную плотность устьиц мутантных по EPF2 растений арабидопсиса. В то же время у *P. patens* нет ортолога AtEPFL9 и сверхэкспрессия AtEPFL9 не влияет на плотность устьиц, что говорит о том, что конкурентная регуляция закладки устьиц появилась на более поздних этапах эволюции наземных растений [59].

Таким образом, пептиды EPFL – консервативные и довольно древние регуляторы развития устьиц у наземных растений.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ ПОБЕГА

Апикальная меристема побега является ключевой структурой, обеспечивающей рост надземных органов растения. Ее пространственная организация, размер и активность строго регулируются сетью сигнальных каскадов, важную роль в которых играют в том числе пептиды семейства EPF/EPFL.

У *A. thaliana* пептиды EPFL1, EPFL2, EPFL4 и EPFL6 экспрессируются преимущественно по периферии апикальной меристемы побега, а также в области границы между меристемой и закладывающимися листьями [48]. В то же время рецепторы ER, ERL1 и ERL2 активны в центральной зоне меристемы, что указывает на их участие в пространственной регуляции клеточного деления и дифференцировки меристемы. Мутанты по EPFL1/2/4/6, а также ERf имеют схожий фенотип: увеличение размеров меристемы, снижение числа листовых примордиев и уменьшение общей биомассы растений [48]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что пептиды EPFL и рецепторы ER демонстрируют функциональную избыточность в регуляции размера апикальной меристемы побега и инициации роста листьев [60].

У мутантов по гену EPFL2 наблюдаются нарушения симметрии и равномерности закладки органов, а также изменения числа ауксиновых максимумов в апикальной меристеме побега [49]. Это

согласуется и с результатами другого исследования, согласно которому у мутантов *epfl2* наблюдалось изменение количества максимумов ауксина, приводящее к изменению формы листьев и семядолей [50].

Кроме того, показано что обработка синтетическими пептидами EPFL4 и EPFL6 ограничивает латеральный рост меристемы, снижая экспрессию ключевых регуляторов апикальной меристемы – CLV3 (CLAVATA3) и WUS (WUSCHEL) – при участии рецепторов ERf [51]. Взаимодействие между этими пептидами и их рецепторами регулирует не только размер, но и границы меристемы, что способствует контролю за числом инициируемых органов и нормальным развитием растений.

Таким образом, EPFL играют важную роль в пространственно-временной регуляции активности апикальной меристемы побега.

РЕГУЛЯЦИЯ ЛАТЕРАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ И ЗАКЛАДКИ ПРОВОДЯЩИХ ТКАНЕЙ

Регуляция латеральной меристемы и закладки проводящих тканей является ключевым процессом, обеспечивающим правильное развитие как вегетативных, так и репродуктивных органов. В регуляции функционирования латеральных меристем гипокотиля и соцветий арабидопсиса участвуют рецепторные киназы ER и ERL1 [61–63]. Так, обнаружена экспрессия генов *ER* и *ERL1*, но не *ERL2* в центральном цилиндре гипокотиля [61]. Двойные мутанты по генам *ER* и *ERL1* отличаются от растений дикого типа утолщением гипокотиля за счет увеличения ксилемы, при этом в такой ксилеме была повышена доля клеток с лигнифицированными клеточными стенками [61]. То есть, *ER* и *ERL1* предотвращают чрезмерное развитие ксилемы в гипокотилях.

Киназы *ER* и *ERL1* регулируют также развитие прокамбия в стеблях соцветий [62, 63]. У двойных мутантов по генам *ER* и *ERL1* наблюдалось нарушение строения проводящих пучков – слой прокамбия был прерывистым, в некоторых местах ксилема и флоэма соприкасались. Показано, что *ER* и *ERL1* экспрессируются в ксилеме и флоэме, причем именно флоэмная экспрессия гена *ER* является определяющей для регуляции анатомической структуры стебля соцветия [62]. Предполагается, что в этот процесс вовлечены пептиды EPFL4 и EPFL6, которые экспрессируются в эндодерме и связываются с *ER*. Однако у двойного мутанта по генам *EPFL4* и *EPFL6* не было нарушено строение проводящих пучков, поэтому вопрос о том, какие именно EPFL участвуют в регуляции функционирования латеральных меристем, все еще остается открытым.

Таким образом, показано, что рецепторы *ER* и *ERL1* и, по-видимому, их лиганды участвуют в контроле образования и функционирования латеральных меристем и закладке проводящих тканей.

ФОРМИРОВАНИЕ ЗУБЧАТОГО КРАЯ ЛИСТА

Еще одна роль пептидов семейства EPFL – это регуляция формирования зубчатого края листовой пластиинки [47]. У арабидопсиса этот процесс регулирует пептид EPFL2 совместно с рецепторами *ER* и *ERL1/2*. Мутанты по гену *EPFL2*, а также двойные мутанты по киназам *ERf* характеризуются отсутствием зубцов по краю листовой пластиинки. Взаимодействие EPFL2 с каждой из трех *ERf* подтвердили при помощи коиммунопреципитации [47]. Ген *EPFL2* экспрессируется в растущих листьях за исключением кончиков зубцов и развивающихся жилок [47]. Интересно, что экспрессия *ERL2* контрастирует экспрессии *EPFL2*: она обнаружена в кончиках зубцов и жилках, в то время как *ER* и *ERL1* экспрессируются во всей листовой пластиинке. Таким образом, регуляторный модуль EPFL2-ERf подавляет ответ на ауксин, ограничивая его небольшим количеством клеток на кончике растущего зубца.

РАЗВИТИЕ ГЕНЕРАТИВНЫХ ОРГАНОВ

В ходе эволюции у цветковых растений возникли сложные и разнообразные структуры для размножения, в формировании которых, начиная с регуляции архитектуры соцветия и заканчивая образованием семян, важную роль играют пептиды EPF/EPFL.

EPFL4/6, а также в меньшей степени EPFL1/2 вместе с *ERf* стимулируют удлинение соцветий и цветоножек у *A. thaliana* [53]. При этом EPFL4/6, выступающие лигандами *ER*, экспрессируются в клетках эндодермы, а ген *ER* экспрессируется в клетках эпидермы, флоэмы и ксилемы. Однако для формирования нормальной архитектуры соцветия важна рецепция сигнала именно во флоэме, так как экспрессия *ER* под специфичным для флоэмы промотором гена *SUC1* восстанавливала фенотип мутантов *er*. Экспрессия *ER* под промоторами, активными в ксилеме и эпидерме, подобного эффекта не давала [53]. Таким образом, пептиды EPFL4/6 экспрессируются в клетках эндодермы соцветий, мигрируют во флоэму, где связываются с *ER* и стимулируют рост стебля соцветия и цветоножек [53]. Транскриптомные данные показывают, что у мутантов *A. thaliana er-2* и *epfl4/6* значительная часть дифференциально экспрессируемых генов является компонентами ауксинового и гиббереллинового ответа. В частности, подавляется экспрессия ARGOS,

стимулирующего рост надземных органов [64], и транскрипционного фактора WRKY15 [53].

Роль пептидов EPFL в регуляции архитектуры соцветия показана и у риса. Так, *OsEPFL5–9* регулируют архитектуру метелки и размер зерен. При этом *OsEPFL6–9* снижают количество колосков на метелку, а *OsEPFL5* – повышает, то есть является их антагонистом [65]. Дальнейшая передача сигнала *OsEPFL6–9* идет через рецептор *OsER1* и МАП-киназный каскад, содержащий *OsMKK10–OsMKK4–OsMPK6* [65, 66].

Пептиды семейства EPFL контролируют не только развитие соцветий в целом, но и мужских и женских половых органов, и образующихся плодов. У растений арабидопсиса *EPFL4/5/6* стимулируют удлинение тычиночных нитей за счет регуляции пролиферации клеток [56, 57]. У тройных мутантов по генам *EPFL4/5/6* нарушается самоопыление и наблюдается мужская стерильность, поскольку тычинки оказываются существенно короче, чем пестик [57]. При более низкой температуре нарушение самоопыления происходит уже у одиночного мутанта *epfl6* [56]. При этом ER опосредует удлинение не только тычинок, но и пестика [56].

EPFL1 T. aestivum и *EPFL6 Brassica napus* также, по всей видимости, регулируют морфологию органов цветка. Их сверхэкспрессия в растениях *A. thaliana* уменьшала число тычинок и их длину относительно пестика [67, 68].

Пептиды EPFL также могут регулировать развитие стручков у *A. thaliana*. *EPFL9* совместно с ER способствует удлинению стручка, тогда как *EPFL2* экспрессируется в промежутках между примордиями семяпочек и, взаимодействуя с рецепторами *ERL2* и *ERL1*, увеличивает число семязачатков в стручке и повышает равномерность закладки их примордииев [46]. Интересно, что *EPFL9* и *EPFL2* могут выступать антагонистами, так как экспрессия *EPFL9* под промотором *EPFL2* приводила к фенотипу, сходному с фенотипом мутанта *epfl2* [46].

EPFL1/2/4/6 контролируют также начальные этапы развития женского гаметофита. Эти пептиды нужны для выделения единственной материнской клетки мегаспоры (МКМ), препятствуя как образованию многочисленных МКМ, так и их отсутствию [54].

На более поздних стадиях развития семязачатка *EPFL1–6* обеспечивают обрастанье нуцеллуса интегументами [55]. Гены *EPFL1–6*, ER и *ERL1/2* экспрессируются на разных стадиях развития семязачатка, тогда как мутации по этим генам приводят к нарушению формирования интегумента. *SERK1/2/3* при этом выступают в качестве корецептора: показано взаимодействие *SERK* с киназами

семейства ERf, которое усиливается в присутствии экзогенных пептидов *EPFL4/6* [55].

Пептиды EPF/EPFL контролируют такой важный сельскохозяйственный признак риса, как наличие ости у зерновки. Ген *EPFL1* дикого риса *Oryza rufipogon* активно экспрессируется в развивающихся соцветиях и обеспечивает формирование более длинных зерновок с остью и метелок с меньшим количеством зерновок [69]. Мутации, изменяющие число остатков цистеина в *OsEPFL1*, обнаружены у большинства безостных культурных сортов риса *O. sativa*, а аллель *EPFL1* африканского культурного риса *O. glaberrima* определял появление остистых зерен у *O. sativa* ssp. *japonica* [69]. При этом у сорта *O. sativa* ssp. *aus* cv. *Kasalath* наличие ости у зерновки определяется другими генами EPF/EPFL: у одиночного мутанта по гену *OsEPFL1* ости сохраняются, а мутант *osepfl2* оствей не имеет и формирует более короткие зерновки меньшей массы и с меньшим числом клеток в продольном сечении. *OsEPF2*, *OsEPFL7*, *OsEPFL9*, *OsEPFL10* также вносят вклад в развитие ости. По генам *OsEPFL1/GAD1/RAE2* и *OsEPFL2/9/10* шел отбор в процессе доместикации риса [39, 69].

Функции пептидов EPFL в развитии репродуктивной сферы растения крайне многообразны. Представители данного семейства контролируют архитектуру соцветия, рост органов цветка и правильное формирование женского гаметофита.

АБИОТИЧЕСКИЕ СТРЕССЫ

В последние годы ведется активный поиск и аннотирование генов, кодирующих пептиды семейства EPF/EPFL, у различных сельскохозяйственных растений. Часто обнаруживается, что промоторные области этих генов содержат *чиc*-регуляторные элементы, связанные с ответами на стрессовые воздействия и фитогормоны [33, 34, 36, 40, 41]. Более того, экспериментально подтверждено, что экспрессия отдельных EPF/EPFL регулируется данными факторами. Это позволяет предположить, что EPF/EPFL могут играть роль в формировании устойчивости растений к стрессовым условиям.

Так, экспрессия *EPFL8* повышается при обработке растений кукурузы абсцизовой кислотой (АБК), метилжасмонатом и салициловой кислотой, тогда как экспрессия ряда других *EPFL* в тех же условиях снижается [34]. Кроме того, водный дефицит может вызывать изменения экспрессии сразу нескольких *EPFL*, что косвенно указывает на их возможное участие в регуляции ответа на засуху [34, 70]. У ржи обнаружены как индуцируемые, так и ингибируемые при осмотическом стрессе *EPFL*, а также выявлены два *EPFL*, индуцируемых высокой темпе-

ратурой [40]. Показано достоверное снижение экспрессии семи генов *EPF* рапса при солевом стрессе [37]. Дифференциальны экспрессируемые в ответ на осмотический стресс гены *EPFL* идентифицированы также у сорго, картофеля, тополя, яблони [33, 36, 41, 71].

Известно, что *EPF1/2* ингибируют образование устьиц у *A. thaliana*, тогда как *EPFL9* стимулирует [10, 13, 45]. При этом плотность расположения устьиц и интенсивность транспирации определяют устойчивость растения к засухе. Сравнение экспрессии генов *EPF/EPFL* у устойчивого и чувствительного к засухе сортов яблони *Malus domestica* показало, что экспрессия ортолога *AtEPF2*, *MdEPF2*, сильнее индуцируется засухой в листьях устойчивого сорта [71]. Обработка АБК – ключевым регулятором ответа на осмотический стресс – также индуцировала экспрессию *MdEPF2*. Растения томата, сверхэкспрессирующие *MdEPF2*, отличались повышенной устойчивостью к осмотическому стрессу. При засухе у таких растений была больше биомасса, выше скорость фотосинтеза и относительное содержание воды, меньше содержание малонового диальдегида (МДА), маркера окислительного стресса, и пероксида водорода, а активность антиоксидантных ферментов выше, чем у растений дикого типа [71]. Основным морфологическим эффектом сверхэкспрессии *MdEPF2* было снижение количества устьиц, что можно рассматривать как причину большей устойчивости таких растений к осмотическому стрессу.

Ранее изучали физиологическую роль ортолога *AtEPF2*, *PdEPF2*, обнаруженного в геноме тополя [72]. *PdEPF2*, экспрессия которого индуцировалась засухой и АБК, сверхэкспрессировали в растениях арабидопсиса, которые оказались более устойчивыми к засухе, в условиях осмотического стресса у них было повышенено содержание пролина и интенсивность фотосинтеза.

У картофеля также выявлены *EPF/EPFL*, экспрессия которых отвечает на засуху: экспрессия трех генов растет, а одного (*EPF4*) падает [36]. Получили растения с нокдауном и сверхэкспрессией *EPF4*. Показали, что нокдаун этого гена приводит к повышению устойчивости к засухе – относительное содержание воды, содержание пролина и активность антиоксидантных ферментов (SOD, POD, CAT) у таких растений при засухе выше, чем у растений дикого типа, а МДА – ниже. При этом у растений, сверхэкспрессирующих *EPF4* при засухе, обнаруживались противоположные эффекты [36]. Изменение экспрессии *EPF4* влияло на плотность устьиц – в растениях с нокдауном *EPF4* она была ниже, а со сверхэкспрессией этого гена выше,

чем у растений дикого типа. Возможно, что негативная роль *EPF4* в регуляции ответа на осмотический стресс связана с его действием на формирование устьиц.

Совокупность геномных и физиологических данных, полученных на различных сельскохозяйственных культурах, указывает на потенциальную вовлеченность пептидов семейства *EPF/EPFL* в регуляцию ответа растений на абиотические стрессы, прежде всего, на засуху. Чаще всего в качестве наиболее вероятного механизма действия этих пептидов рассматривают контроль устьичной плотности и транспирации, однако нельзя исключить существование и других механизмов. При этом разные члены семейства могут выполнять как положительную, так и отрицательную регуляторную роль, что подчеркивает функциональное разнообразие *EPF/EPFL* и необходимость дальнейших исследований их специфических функций в различных физиологических контекстах.

БИОТИЧЕСКИЙ СТРЕСС

Изменение экспрессии различных представителей *EPF/EPFL* в ответ на заражение фитопатогенными грибами показано у нескольких видов растений. Так, заражение мха *P. patens* патогенным грибом *Botrytis cinerea* существенно снижало экспрессию шести генов, кодирующих предсказанные пептиды семейства *EPFL* [73]. Показано, что экспрессия *EPFL1–6* и *EPFL9* *A. thaliana* увеличивалась после инокуляции *Sclerotinia sclerotiorum*, тогда как экспрессия остальных представителей семейства *EPF/EPFL* не изменялась [52]. В то же время воздействие биотического стресса разнонаправленно влияло на экспрессию генов *EPF/EPFL* в растениях томата *Solanum lycopersicum*: так инфицирование фитопатогеном *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* приводило к повышению экспрессии *SIEPF7* и снижению экспрессии *SIEPF1/5*, а обработка элиситорами из не-патогенного для томата штамма *F. sambicuum* повышала экспрессию *SIEPF6/7* и снижала *SIEPF3/5* [74].

Изменение экспрессии сразу нескольких генов *EPF/EPFL* при взаимодействии с фитопатогенами позволяет предположить, что пептиды этого семейства могут совместно регулировать защитные механизмы растения. Так, рост *S. sclerotiorum* и продукция H_2O_2 у мутантов *Arabidopsis epfl1,2,4,6* существенно повышались, тогда как одиночные мутанты не отличались от растений дикого типа [52]. Кроме того, у мутантов *epfl1,2,4,6* существенно снижалась индуцируемая патогеном экспрессия генов, относящихся к *YODA DOWNSTREAM* (YDD). YDD – это группа генов, позитивно регулируемых у мутантов с конститутивно активной *YODA* [52]. С дру-

гой стороны, индуцибельная экспрессия *EPF1/2* у *A. thaliana* не повышала устойчивость растений к некротрофному грибу *Plectosphaerella cisticlerina* [75]. Как известно, многие патогены проникают в ткани растения через устьица, поэтому ослабление устойчивости мутантов по *ERf*, по-видимому, можно связать с увеличением числа устьиц. Так, после обработки EPFL9 число устьиц увеличивалось и симптомы заражения усиливались [76].

Таким образом, данные об участии пептидов EPF/EPFL в регуляции ответа на биотический стресс крайне скучны. При этом неоднократно показано участие рецепторов и компонентов сигнального пути пептидов EPF/EPFL в обеспечении устойчивости к фитопатогенам. Так, у мутантов по гену *ER* снижалась устойчивость к бактерии *Ralstonia solanacearum* [77], оомицету *Pythium irregularare* [78], патогенным грибам *Verticillium longisporum* [79], *S. sclerotiorum* [80] и *P. cisticlerina* [81, 82]. Дополнительный нокаут генов *ERL1/2* и *TMM* усиливал развитие инфекции [75, 80].

Однако снижение устойчивости к *R. solanacearum* при инокуляции патогена через поврежденные корни [77] указывает на то, что уязвимость *er* может быть связана не только с увеличением числа устьиц, но и с ингибированием защитного ответа растения. В пользу этого говорит снижение экспрессии патоген-индуцируемых генов *WRKY33*, *WRKY53*, *CYP79B2* и *CYP81F2* у мутантов *er*, *bak1* и *er bak1* [75].

В то же время активность *ER* не влияла на экспрессию генов, индуцируемых *flg22* – 22-аминокислотным эпипептидом, производным флагеллина [75]. Также мутанты *er* были не менее устойчивы к заражению *B. cinerea*, *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* и *Peronospora parasitica*, чем растения дикого типа [81]. Таким образом, *ER* не всегда необходим для формирования устойчивости к патогенам. Возможно, но не обязательно, это связано с функциональной избыточностью рецепторов EPFL.

ER регулирует ответ арабидопсиса на заражение *S. sclerotiorum*, влияя на связывание транскрипционного фактора *WRKY33* с промоторами генов *YDD* [80]. В этом процессе участвует хроматинремоделирующий комплекс *SWR1* и регуляторный модуль *ER-MPK6-WRKY33*. *SWR1* способствует связыванию W-box транскрипционного фактора *WRKY33*

с промоторами и активации экспрессии генов *YDD*, которые необходимы для поддержания устойчивости растения к заражению *S. sclerotiorum* [80, 83].

Поскольку EPF/EPFL-пептиды известны в первую очередь как регуляторы развития устьиц, их роль в контроле адаптации к стрессам часто пытаются связать с количеством устьиц, но, по-видимому, роль данной группы пептидов при стрессе обширнее и нуждается в дальнейшем изучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительное расширение знаний о пептидах семейства EPF/EPFL, в понимании их функций остаются важные пробелы. Так, подавляющее большинство функциональных исследований EPF/EPFL проведено на модельном растении *A. thaliana*. Более того, хотя гомологи генов EPF/EPFL идентифицированы у представителей различных групп покрытосеменных, их функциональный анализ в этих таксонах практически не проводился. Это особенно актуально в контексте филогенетического разнообразия растений, поскольку результаты, полученные на *Arabidopsis*, могут не полностью отражать спектр биологических функций EPFL в других видах.

Дополнительные сложности в изучении этих пептидов обусловлены функциональной избыточностью: многие представители семейства могут частично компенсировать друг друга, что затрудняет оценку вклада отдельных представителей. По этой причине значительная часть исследований основана на анализе мутантов по рецепторам, которые также демонстрируют частичную избыточность, но число их существенно меньше.

На сегодняшний день показано, что экспрессия EPFL может меняться при биотических и абиотических воздействиях, однако связь между пептидной регуляцией и адаптивными реакциями растений не до конца ясна.

Управление активностью EPFL и их рецепторов потенциально может быть использовано для оптимизации морфогенеза, повышения устойчивости к стрессам и, как следствие, для улучшения сельскохозяйственных культур. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-10048).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fukuda H, Hardtke CS. Peptide Signaling Pathways in Vascular Differentiation. *Plant Physiol.* 2020;182(4):1636-1644. doi: 10.1104/pp.19.01259
2. Mamaeva A, Makeeva A, Ganaeva D. The Small Key to the Treasure Chest: Endogenous Plant Peptides Involved in Symbiotic Interactions. *Plants.* 2025;14(3):378. doi: 10.3390/plants14030378
3. Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA. A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science.* 1991;253(5022):895-897. doi: 10.1126/science.253.5022.895

4. Tavormina P, De Coninck B, Nikonorova N, De Smet I, Cammue BPA. The Plant Peptidome: An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions. *Plant Cell*. 2015;27(8):2095-2118. doi: 10.1105/tpc.15.00440
5. Stintzi A, Schaller A. Biogenesis of post-translationally modified peptide signals for plant reproductive development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2022;69:102274. doi: 10.1016/j.pbi.2022.102274
6. Feng YZ, Zhu QF, Xue J, Chen P, Yu Y. Shining in the dark: the big world of small peptides in plants. *aBIOTECH*. 2023;4(3):238-256. doi: 10.1007/s42994-023-00100-0
7. Gancheva MS, Malovichko YuV, Poliushkevich LO, Doudueva IE, Lutova LA. Plant Peptide Hormones. *Russ J Plant Physiol*. 2019;66(2):171-189. doi: 10.1134/S1021443719010072
8. Okada T, Yoshizumi H, Terashima Y. A Lethal Toxic Substance for Brewing Yeast in Wheat and Barley: Part I. Assay of Toxicity on Various Grains, and Sensitivity of Various Yeast StrainsPart II. Isolation and Some Properties of Toxic Principle. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1970;34(7):1084-1094. doi:10.1080/00021369.1970.10859736
9. van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(19):3545-3570. doi: 10.1007/s00018-013-1260-1
10. Hara K, Kajita R, Torii KU, Bergmann DC, Kakimoto T. The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev*. 2007;21(14):1720-1725. doi: 10.1101/gad.155070
11. Sugano SS, Shimada T, Imai Y, Okawa K, Tamai A, Mori M, Hara-Nishimura I. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature*. 2010;463(7278):241-244. doi: 10.1038/nature08682
12. Maróti G, Downie JA, Kondorosi É. Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2015;26:57-63. doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.031
13. Hunt L, Gray JE. The Signaling Peptide EPF2 Controls Asymmetric Cell Divisions during Stomatal Development. *Curr. Biol*. 2009;19(10):864-869. doi: 10.1016/j.cub.2009.03.069
14. Richardson LGL, Torii KU. Take a deep breath: peptide signalling in stomatal patterning and differentiation. *J. Exp. Bot*. 2013;64(17):5243-5251. doi: 10.1093/jxb/ert246
15. Lee JS, Kuroha T, Hnilova M, Khatayevich D, Kanaoka MM, McAbee JM, Sarikaya M, Tamerler C, Torii KU. Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes Dev*. 2012;26(2):126-136. doi: 10.1101/gad.179895.111
16. Silverstein KAT, Moskal Jr. WA, Wu HC, Underwood BA, Graham MA, Town CD, VandenBosch KA. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J*. 2007;51(2):262-280. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x
17. Финкина ЕИ, Мельникова ДН, Богданов ИВ, Овчинникова ТВ. Пептиды системы врожденного иммунитета растений. Часть I. Структура, биологическая активность и механизмы действия. *Биоорган. химия*. 2019;45(1):3-16. doi: 10.1134/S013234231901007X
18. Финкина ЕИ, Мельникова ДН, Богданов ИВ, Овчинникова (Марченко) ТВ. Пептиды системы врожденного иммунитета растений. Часть II. Биосинтез, биологические функции и возможное практическое применение. *Биоорган. химия*. 2019;45(2):115-126. doi: 10.1134/S0132342319020040
19. Ohki S, Takeuchi M, Mori M. The NMR structure of stomagen reveals the basis of stomatal density regulation by plant peptide hormones. *Nat Commun*. 2011;2(1):512. doi: 10.1038/ncomms1520
20. Kondo T, Kajita R, Miyazaki A, Hokoyama M, Nakamura-Miura T, Mizuno S, Masuda Y, Irie K, Tanaka Y, Takada S, et al. Stomatal Density is Controlled by a Mesophyll-Derived Signaling Molecule. *Plant and Cell Physiology*. 2010;51(1):1-8. doi: 10.1093/pcp/pcp180
21. Lin G, Zhang L, Han Z, Yang X, Liu W, Li E, Chang J, Qi Y, Shpak ED, Chai J. A receptor-like protein acts as a specificity switch for the regulation of stomatal development. *Genes Dev*. 2017;31(9):927-938. doi: 10.1101/gad.297580.117
22. Rowe MH, Bergmann DC. Complex signals for simple cells: the expanding ranks of signals and receptors guiding stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*. 2010;13(5):548-555. doi: 10.1016/j.pbi.2010.06.002
23. Hara K, Yokoo T, Kajita R, Onishi T, Yahata S, Peterson KM, Torii KU, Kakimoto T. Epidermal cell density is auto-regulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol*. 2009;50(6):1019-1031. doi: 10.1093/pcp/pcp068
24. Tabata R, Sawa S. Maturation processes and structures of small secreted peptides in plants. *Front Plant Sci*. 2014;5:311. doi: 10.3389/fpls.2014.00311
25. Olsson V, Joos L, Zhu S, Gevaert K, Butenko MA, Smet ID. Look Closely, the Beautiful May Be Small: Precursor-Derived Peptides in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2019;70(1):153-186. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040413
26. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, Ronneberger O, Willmore L, Ballard AJ, Bambrick J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024;630(8016):493-500. doi: 10.1038/s41586-024-07487-w
27. Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S. Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2007;19(1):63-73. doi: 10.1105/tpc.106.048298
28. Takata N, Yokota K, Ohki S, Mori M, Taniguchi T, Kurita M. Evolutionary relationship and structural characterization of the EPF/EPFL gene family. *PLoS One*. 2013;8(6):e65183. doi: 10.1371/journal.pone.0065183
29. Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT, Jenkins J, Shu S, Ishizaki K, Yamaoka S, Nishihama R, Nakamura Y, Berger F, et al. Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell*. 2017;171(2):287-304.e15. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.030
30. Rydel AL, Peterson KM, Torii KU. Plant twitter: ligands under 140 amino acids enforcing stomatal patterning. *J Plant Res*. 2010;123(3):275-280. doi: 10.1007/s10265-010-0330-9
31. Caine RS, Chater CC, Kamisugi Y, Cuming AC, Beerling DJ, Gray JE, Fleming AJ. An ancestral stomatal patterning module revealed in the non-vascular land plant *Physcomitrella patens*. *Development*. 2016;143(18):3306-3314. doi: 10.1242/dev.135038
32. Caine RS, Chater CCC, Fleming AJ, Gray JE. Stomata and Sporophytes of the Model Moss *Physcomitrium patens*. *Front Plant Sci*. 2020;11:643. doi: 10.3389/fpls.2020.00643
33. Jia M, Wang Y, Jin H, Li J, Song T, Chen Y, Yuan Y, Hu H, Li R, Wu Z, et al. Comparative Genomics Analysis of the *Populus* Epidermal Pattern Factor (EPF) Family Revealed Their Regulatory Effects in *Populus euphratica* Stomatal Development. *Int J Mol Sci*. 2024;25(18):10052. doi: 10.3390/ijms251810052
34. Li P, Zhao Z, Wang W, Wang T, Hu N, Wei Y, Sun Z, Chen Y, Li Y, Liu Q, et al. Genome-wide analyses of member iden-

- tification, expression pattern, and protein–protein interaction of EPF/EPFL gene family in *Gossypium*. *BMC Plant Biology*. 2024;24(1):554. doi: 10.1186/s12870-024-05262-7
35. McElwain JC, Chaloner WG. Stomatal Density and Index of Fossil Plants Track Atmospheric Carbon Dioxide in the Palaeozoic. *Annals of Botany*. 1995;76(4):389–395. doi: 10.1006/anbo.1995.1112
36. Qiao R, Yang J, Deng Y, Duan X, Li X, Zhu F, Liu M, Mou J, Zhang N, Si H. Genome-Wide Identification of Epidermal Pattern Factor (EPF) Gene Family in Potato and Functional Characterization of StEPF4 in Regulating Drought Stress. *Agronomy*. 2024;14(12):2948. doi: 10.3390/agronomy14122948
37. Wang S, Wang W, Chen J, Wan H, Zhao H, Liu X, Dai X, Zeng C, Xu D. Comprehensive Identification and Expression Profiling of Epidermal Pattern Factor (EPF) Gene Family in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) under Salt Stress. *Genes*. 2024;15(7):912. doi: 10.3390/genes15070912
38. Liu S, Chen T, Li X, Cui J, Tian Y. Genome-wide identification and expression analysis of EPF/EPFL gene family in *Populus trichocarpa*. *Front Genet*. 2024;15:1432376. doi: 10.3389/fgene.2024.1432376
39. Xiong L, Huang Y, Liu Z, Li C, Yu H, Shahid MQ, Lin Y, Qiao X, Xiao J, Gray JE, et al. Small EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE2 peptides regulate awn development in rice. *Plant Physiology*. 2022;190(1):516–531. doi: 10.1093/plphys/kiac278
40. Zhiling L, Wenhua D, Fangyuan Z. Genome-wide identification and phylogenetic and expression pattern analyses of EPF/EPFL family genes in the Rye (*Secale cereale* L.). *BMC Genomics*. 2024;25(1):532. doi: 10.1186/s12864-024-10425-9
41. Jiao Z, Wang J, Shi Y, Wang Z, Zhang J, Du Q, Liu B, Jia X, Niu J, Gu C, et al. Genome-Wide Identification and Analysis of the EPF Gene Family in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plants*. 2023;12(22):3912. doi: 10.3390/plants12223912
42. Liu R, Xu K, Li Y, Zhao W, Ji H, Lei X, Ma T, Ye J, Zhang J, Du H, et al. Investigation on the Potential Functions of ZmEPF/EPFL Family Members in Response to Abiotic Stress in Maize. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(13):7196. doi: 10.3390/ijms25137196
43. Wei D, Chang P, Liu JY, Yang Y, Zhang X, Chen L, Hu YA. Genome-wide identification of EPF/EPFL gene family in wheat (*Triticum aestivum*) and analysis of TaEPF1-2B associated with stomatal traits. *J. Triticeae Crops*. 2021;41(11):1317–1329. doi: 10.7606/j.issn.1009-1041.2021.11.01
44. Lee JS, Hnilova M, Maes M, Lin YCL, Putarjunan A, Han SK, Avila J, Torii KU. Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. *Nature*. 2015;522(7557):439–443. doi: 10.1038/nature14561
45. Hunt L, Bailey KJ, Gray JE. The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. *New Phytol*. 2010;186(3):609–614. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03200.x
46. Kawamoto N, Carpio DPD, Hofmann A, Mizuta Y, Kurihara D, Higashiyama T, Uchida N, Torii KU, Colombo L, Groth G, et al. A Peptide Pair Coordinates Regular Ovule Initiation Patterns with Seed Number and Fruit Size. *Current Biology*. 2020;30(22):4352–4361.e4. doi: 10.1016/j.cub.2020.08.050
47. Tameshige T, Ikematsu S, Torii KU, Uchida N. Stem development through vascular tissues: EPFL–ERECTA family signaling that bounces in and out of phloem. *J. Exp. Bot.* 2017;68(1):45–53. doi: 10.1093/jxb/erw447
48. Kosentka PZ, Overholt A, Maradiaga R, Mitoubsi O, Shpak ED. EPFL Signals in the Boundary Region of the SAM Restrict Its Size and Promote Leaf Initiation. *Plant Physiology*. 2019;179(1):265–279. doi: 10.1104/pp.18.00714
49. Fujihara R, Uchida N, Tameshige T, Kawamoto N, Ho- tokezaka Y, Higaki T, Simon R, Torii KU, Tasaka M, Aida M. The boundary-expressed EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE2 gene encoding a signaling peptide promotes cotyledon growth during *Arabidopsis thaliana* embryogenesis. *Plant Biotechnol (Tokyo)*. 2021;38(3):317–322. doi: 10.5511/plantbiotechnology.21.0508a
50. Kimura Y, Tasaka M, Torii KU, Uchida N. ERECTA-family genes coordinate stem cell functions between the epidermal and internal layers of the shoot apical meristem. *Development*. 2018;145(1):dev156380. doi: 10.1242/dev.156380
51. Zhang L, DeGennaro D, Lin G, Chai J, Shpak ED. ERECTA family signaling constrains CLAVATA3 and WUSCHEL to the center of the shoot apical meristem. *Development*. 2021;148(5):dev189753. doi: 10.1242/dev.189753
52. Huang Y, Chai M, Xi X, Zhu W, Qi J, Qin Y, Cai H. Functional analysis of EPF/EPFL genes in *Arabidopsis* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*. 2022;51(4):486–492. <https://jfafu.fafu.edu.cn/#/digest?ArticleID=1333>
53. Uchida N, Lee JS, Horst RJ, Lai HH, Kajita R, Kakimoto T, Tasaka M, Torii KU. Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand–receptor communication between endodermis and phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(16):6337–6342. doi: 10.1073/pnas.1117537109
54. Cai H, Huang Y, Liu L, Zhang M, Chai M, Xi X, Aslam M, Wang L, Ma S, Su H, et al. Signaling by the EPFL-ERECTA family coordinates female germline specification through the BZR1 family in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2023;35(5):1455–1473. doi: 10.1093/plcell/koad032
55. Li M, Lv M, Wang X, Cai Z, Yao H, Zhang D, Li H, Zhu M, Du W, Wang R, et al. The EPFL-ERF-SERK signaling controls integument development in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 2023;238(1):186–201. doi: 10.1111/nph.18701
56. Negoro S, Hirabayashi T, Iwasaki R, Torii KU, Uchida N. EPFL peptide signalling ensures robust self-pollination success under cool temperature stress by aligning the length of the stamen and pistil. *Plant, Cell & Environment*. 2023;46(2):451–463. doi: 10.1111/pce.14498
57. He Y, He X, Wang X, Hao M, Gao J, Wang Y, Yang ZN, Meng X. An EPFL peptide signaling pathway promotes stamen elongation via enhancing filament cell proliferation to ensure successful self-pollination in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2023;238(3):1045–1058. doi: 10.1111/nph.18806
58. Jangra R, Brunetti SC, Wang X, Kaushik P, Gulick PJ, Foroud NA, Wang S, Lee JS. Duplicated antagonistic EPF peptides optimize grass stomatal initiation. *Development*. 2021;148(16):dev199780. doi: 10.1242/dev.199780
59. Caine RS, Chater CC, Kamisugi Y, Cuming AC, Beerling DJ, Gray JE, Fleming AJ. An ancestral stomatal patterning module revealed in the non-vascular land plant *Physcomitrella patens*. *Development*. 2016;143(18):3306–3314. doi: 10.1242/dev.135038
60. Uzair M, Urquidi Camacho RA, Liu Z, Overholt AM, DeGennaro D, Zhang L, Herron BS, Hong T, Shpak ED. An updated model of shoot apical meristem regulation by ERECTA family and CLAVATA3 signaling pathways in *Arabidopsis*. *Development*. 2024;151(12):dev202870. doi: 10.1242/dev.202870
61. Ikematsu S, Tasaka M, Torii KU, Uchida N. ERECTA-family receptor kinase genes redundantly prevent premature progression of secondary growth in the *Arabidopsis* hypocotyl. *New Phytol*. 2017;213(4):1697–1709. doi: 10.1111/nph.14335

62. Uchida N, Tasaka M. Regulation of plant vascular stem cells by endodermis-derived EPFL-family peptide hormones and phloem-expressed ERECTA-family receptor kinases. *J. Exp. Bot.* 2013;64(17):5335-5343. doi: 10.1093/jxb/ert196
63. Yuan B, Wang H. Peptide Signaling Pathways Regulate Plant Vascular Development. *Front Plant Sci.* 2021;12:719606. doi: 10.3389/fpls.2021.719606
64. Hu Y, Xie Q, Chua NH. The Arabidopsis Auxin-Inducible Gene ARGOS Controls Lateral Organ Size. *The Plant Cell.* 2003;15(9):1951-1961. doi: 10.1105/tpc.013557
65. Guo T, Lu ZQ, Xiong Y, Shan JX, Ye WW, Dong NQ, Kan Y, Yang YB, Zhao HY, Yu HX, et al. Optimization of rice panicle architecture by specifically suppressing ligand-receptor pairs. *Nat Commun.* 2023;14(1):1640. doi: 10.1038/s41467-023-37326-x
66. Guo T, Lu ZQ, Shan JX, Ye WW, Dong NQ, Lin HX. ERECTA1 Acts Upstream of the OsMKKK10-OsMKK4-OsMPK6 Cascade to Control Spikelet Number by Regulating Cytokinin Metabolism in Rice. *Plant Cell.* 2020;32(9):2763-2779. doi: 10.1105/tpc.20.00351
67. Sun Q, Qu J, Yu Y, Yang Z, Wei S, Wu Y, Yang J, Peng Z. TaEPFL1, an EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL) secreted peptide gene, is required for stamen development in wheat. *Genetica.* 2019;147(2):121-130. doi: 10.1007/s10709-019-00061-7
68. Huang Y, Tao Z, Liu Q, Wang X, Yu J, Liu G, Wang H. BnEPFL6, an EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL) secreted peptide gene, is required for filament elongation in *Brassica napus*. *Plant Mol Biol.* 2014;85(4):505-517. doi: 10.1007/s11103-014-0200-2
69. Jin J, Hua L, Zhu Z, Tan L, Zhao X, Zhang W, Liu F, Fu Y, Cai H, Sun X, et al. GAD1 Encodes a Secreted Peptide That Regulates Grain Number, Grain Length, and Awn Development in Rice Domestication. *The Plant Cell.* 2016;28(10):2453-2463. doi: 10.1105/tpc.16.00379
70. Xia H, Wang Q, Chen Z, Sun X, Zhao F, Zhang D, Fei J, Zhao R, Yin Y. Identification and Functional Analysis of the EPF/EPFL Gene Family in Maize (*Zea mays* L.): Implications for Drought Stress Response. *Agronomy.* 2024;14(8):1734. doi:10.3390/agronomy14081734
71. Jiang Q, Yang J, Wang Q, Zhou K, Mao K, Ma F. Overexpression of *MdEPF2* improves water use efficiency and reduces oxidative stress in tomato. *Environmental and Experimental Botany.* 2019;162:321-332. doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.03.009
72. Liu S, Wang C, Jia F, An Y, Liu C, Xia X, Yin W. Secretory peptide PdEPF2 enhances drought tolerance by modulating stomatal density and regulates ABA response in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2016;125(3):419-431. doi: 10.1007/s11240-016-0957-x
73. Lyapina I, Ganaeva D, Rogozhin EA, Ryabukhina EV, Ryazantsev DYu, Lazarev V, Alieva SE, Mamaeva A, Fesenko I. Comparative analysis of small secreted peptide signaling during defense response: insights from vascular and non-vascular plants. *Physiologia Plantarum.* 2025;177(2):e70147. doi: 10.1111/ppl.70147
74. Slezina MP, Istomina EA, Korostyleva TV, Kovtun AS, Kasianov AS, Konopkin AA, Shcherbakova LA, Odintsova TI. Molecular Insights into the Role of Cysteine-Rich Peptides in Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* Infection in Tomato Based on Transcriptome Profiling. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(11):5741. doi: 10.3390/ijms22115741
75. Jordá L, Sopeña-Torres S, Escudero V, Nuñez-Corcuera B, Delgado-Cerezo M, Torii KU, Molina A. ERECTA and BAK1 Receptor Like Kinases Interact to Regulate Immune Responses in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* 2016;7:897. doi: 10.3389/fpls.2016.00897
76. Tateda C, Obara K, Abe Y, Sekine R, Nekoduka S, Hikage T, Nishihara M, Sekine KT, Fujisaki K. The Host Stomatal Density Determines Resistance to *Septoria gentianae* in Japanese Gentian. *MPMI.* 2019;32(4):428-436. doi: 10.1094/MPMI-05-18-0114-R
77. Godiard L, Sauviac L, Torii KU, Grenon O, Mangin B, Grimsley NH, Marco Y. ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J.* 2003;36(3):353-365. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01877.x
78. Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, Godoy M, Sánchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R. ABA Is an Essential Signal for Plant Resistance to Pathogens Affecting JA Biosynthesis and the Activation of Defenses in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 2007;19(5):1665-1681. doi: 10.1105/tpc.106.048041
79. Häffner E, Karlovsky P, Splivallo R, Traczewska A, Diederichsen E. ERECTA, salicylic acid, abscisic acid, and jasmonic acid modulate quantitative disease resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Verticillium longisporum*. *BMC Plant Biol.* 2014;14(1):85. doi: 10.1186/1471-2229-14-85
80. Cai H, Huang Y, Chen F, Liu L, Chai M, Zhang M, Yan M, Aslam M, He Q, Qin Y. ERECTA signaling regulates plant immune responses via chromatin-mediated promotion of WRKY33 binding to target genes. *New Phytol.* 2021;230(2):737-756. doi: 10.1111/nph.17200
81. Llorente F, Alonso-Blanco C, Sánchez-Rodríguez C, Jordá L, Molina A. ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J.* 2005;43(2):165-180. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02440.x
82. Sánchez-Rodríguez C, Estévez JM, Llorente F, Hernández-Blanco C, Jordá L, Pagán I, Berrocal M, Marco Y, Somerville S, Molina A. The ERECTA Receptor-Like Kinase Regulates Cell Wall-Mediated Resistance to Pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI.* 2009;22(8):953-963. doi: 10.1094/MPMI-22-8-0953
83. Sopeña-Torres S, Jordá L, Sánchez-Rodríguez C, Miedes E, Escudero V, Swami S, López G, Piślewska-Bednarek M, Lassowska I, Lee J, et al. YODA MAP3K kinase regulates plant immune responses conferring broad-spectrum disease resistance. *New Phytol.* 2018;218(2):661-680. doi: 10.1111/nph.15007

УДК 576.311.347

Митофагия при возраст-зависимой нейродегенерации

В. С. Сухоруков^{1,2}, А. В. Егорова^{1,2*}, А. С. Романенко^{1,2}, М. С. Рябова^{1,2}, А. П. Красильникова³¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский центр неврологии и нейронаук», Москва, 125367 Россия²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, 117513 Россия³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, 119234 Россия

*E-mail: AV_Egorova@bk.ru

Поступила в редакцию 18.04.2025

Принята к печати 02.07.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27674

РЕФЕРАТ Митохондриальная дисфункция является одним из патогенетических механизмов повреждения нейронов в процессе старения. Высокая энергетическая зависимость нервных клеток делает их особо уязвимыми для возраст-ассоциированных изменений, которые сопровождаются окислительным стрессом и нарушением энергетического метаболизма. Поддержание пула функциональных митохондрий регулируется митофагией, обеспечивающей утилизацию поврежденных органелл и препятствуя прогрессированию митохондриальной дисфункции. Старение головного мозга сопровождается снижением активности митофагических процессов, нарастанием митохондриальной дисфункции и увеличением риска развития нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. В данном обзоре освещаются молекулярные и сигнальные пути митофагии, ее дисрегуляция при физиологическом и патологическом старении, что представляет особый интерес для выявления фармацевтических мишеней и разработки потенциальной терапии нейродегенеративных состояний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА митофагия, митохондрии, старение, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – болезнь Альцгеймера, БП – болезнь Паркинсона.

ВВЕДЕНИЕ

Возрастные изменения, неизбежно развивающиеся в головном мозге в процессе старения, представляют значительную социальную проблему, поскольку часто сопровождаются возникновением когнитивных нарушений и лежат в основе патогенеза ряда нейродегенеративных заболеваний [1, 2].

Особая роль в поддержании адекватного функционирования нейронов при возрастной и патологической инволюции головного мозга принадлежит митохондриям – органеллам, выполняющим широчайший спектр функциональной нагрузки по координации внутриклеточного гомеостаза [3]. Митохондриальная дисфункция значительно увеличивает риск развития возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний не только из-за энергетического дефицита, развивающегося в нервной ткани, но и в результате гиперпродукции активных форм кислорода, инициации апоптоза и воспалительных реакций, а также нарушения синаптической передачи [4].

Структурно-функциональные характеристики митохондрий постоянно находятся в состоянии быстрых преобразований, основные этапы которых принято называть «митохондриальной динамикой». Митохондриальная динамика, включающая такие ключевые процессы, как биогенез, деление и слияние этих органелл, нуждается также в адекватной системе их элиминации – митофагии [5].

Митофагия – процесс, направленный на утилизацию поврежденных органелл и регулирующий содержание митохондрий в клетках на уровне, необходимом для поддержания метаболического баланса [6]. При этом происходит поглощение дефектных митохондрий специализированными везикулами с последующим их слиянием с лизосомами, обеспечивающими деградацию дефектных органелл [7–9].

Особенности строения и функционирования нервной ткани, ее высокая потребность в энергетическом обеспечении, необходимость постоянного обновления компонентов цитоплазмы клеток определяют важ-

ность митофагии в поддержании функционального пула нейронов.

Старение головного мозга сопровождается снижением активности митофагических процессов, нарастанием митохондриальной дисфункции и увеличением риска развития нейродегенеративных заболеваний [10, 11]. Накопление нейротоксических белковых агрегатов, играющих центральную роль в патогенезе данной патологии, связывают, согласно современным представлениям, с мутациями в генах белков, запускающих митофагию (PINK1, Parkin, DJ-1) [12].

Несмотря на актуальность и высокую социальную значимость проблемы, многие аспекты старения головного мозга остаются недостаточно исследованными. Выяснение роли митохондриальной дисфункции и выявление ключевых маркеров митофагии в процессе возрастной инволюции представляются актуальной задачей современной геронтологии и необходимым этапом определения новых фармакевтических мишеней для воздействия на нейродегенеративные процессы.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ МАКРОАУТОФАГИИ. МИТОФАГИЯ

Утилизация крупных внутриклеточных субстратов, в частности, старых и поврежденных органелл, осуществляется при помощи макроаутофагии – вида аутофагии, при котором выявление и последующее разрушение дефектных структур происходит в аутофагосоме, образующейся при слиянии лизосомы и двумембранный органеллы – фагофора. Процессы аутофагии в клетке запускаются различными факторами, такими как накопление патологических белковых агрегатов, воздействие гипоксии, дефицит нутриентов, окислительный стресс. В восприятии инициирующих аутофагию сигналов и формировании аутофагосомы принимают участие различные белки, синтез которых кодируется генами *Atg* (Autophagy-related genes) [13]. Особая роль в процессе аутофагосомной деградации принадлежит белку LC3 (ATG8), который находится на мембране фагофора и связывается с предварительно убиквитинированной мишенью через белки-адаптеры [14]. Среди наиболее хорошо изученных адаптеров аутофагии выделяют p62 (основной адаптер практически во всех путях митофагии), NBR1 (участвует в деградации пероксисом), NDP52 (участвует в убиквитинависимой митофагии), TAX1BP1 и оптинейрин (OPTIN), необходимые для убиквитинависимой митофагии и аутофагии белковых агрегатов [15].

Потенциальными источниками построения фагофора являются цитолемма и органеллы клетки: комплекс Гольджи, эндоплазматический ретикулум, митохондрии.

Сборка фагофора *de novo* инициируется двумя цитоплазматическими белковыми комплексами: PI3K (class III PI3K complex I) и Atg1/ULK1, состоящими из катализических и регуляторных субъединиц [6, 16, 17]. Фосфорилирование комплекса PI3K индуцирует локальную продукцию мембранных фосфолипида PI3P (фосфатидилинозитол-3-фосфат) в характерных субдоменах эндоплазматического ретикулума, получивших название омегасомы [18]. PI3P необходим для привлечения молекул фосфолипидов, участвующих в росте фагофора, посредством связывания эффекторных белков WIPI и DFCP. Последние обеспечивают взаимодействие PI3P с двумя системами конъюгации LC3/ATG7/ATG3 и ATG5/12/ATG16L1 [19]. На следующем этапе происходит встраивание белков семейства Atg (autophagy-related proteins) в изолирующую мембрану и образование фагофора [20, 21]. Системы конъюгации при этом необходимы не только для расширения фагофора, но и для завершения формирования аутофагосомы и секвестрации груза. Избирательный захват различных мишеней обеспечивается рецепторными белками, локализующимися на поверхности объекта аутофагии, с помощью специализированных адаптерных белков аутофагосомы [22]. Адаптеры, несмотря на их большое количество, используют, по-видимому, общий механизм аутофагии: рекрутование комплекса ULK1/2 и связывание с субъединицей FIP200 (белок адгезии) для инициации образования аутофагосом [15, 23].

После деградации субстрата в аутофагосоме образуются макромолекулы, которые снова попадают в цитозоль и включаются в метаболические процессы клетки [16, 24]. Регуляция активности аутофагии обеспечивается в основном двумя сигнальными путями:

1. Путь PI3K/AKT/mTOR, ингибирующий аутофагию и препятствующий образованию аутофагосомы. На активность mTORC1 (рапамицин-чувствительный комплекс млекопитающих) влияет количество аминокислот, инсулина и ростовых факторов в клетке.
2. Сигнальный путь AMPK, реагирующий на уровень АТР, активируется при гипоксии [16, 25].

Роль в механизмах аутофагии таких сигнальных молекул, как сиртуины, TFEB (transcription factor EB) и др., изучена в меньшей степени и нуждается в детальном исследовании.

Процесс сборки фагофора регулируется в том числе и белками митохондрий. Так, хорошо известный белок Beclin 1, который является частью проаутофагического комплекса PI3K класса III и участвует в сборке фагофора, инициирует процесс Beclin 1-зависимой аутофагии как на уровне эндоплазматического ретикулума, так и на уровне митохондрий [26, 27].

Другой инициатор аутофагии – белок эндофилин B1 – в условиях стресса может рекрутироваться на внешней митохондриальной мембране, где активирует ранее описанный инициаторный комплекс PI3K класса III через связывание адаптера Beclin 1 [26].

Митофагия – это селективная утилизация митохондрий посредством аутофагосомной деградации. Процессу митофагии предшествуют изменения морфологии митохондрий. Так деление митохондрий, опосредованное белками DRP1 и Fis1, обеспечивает их периферическую фрагментацию и отделяет поврежденные участки органеллы для последующей утилизации [28].

Механизм классической митофагии основан на индукции белка митохондриальной мембраны серин-треониновой киназы PTEN 1 (PINK1) и белка паркин (PARK2), который является цитозольной убиквитин-Е3-лигазой. Таким образом, гены *PINK1* (*PARK7*) и *PARK2*, кодирующие белки, ассоциированные с семейными формами паркинсонизма, играют важную роль в контроле качества митохондрий. Сигналом для активации митофагии в этом случае служит потеря потенциала внутренней мембраны, сопутствующая повреждению митохондрий. К известным субстратам PINK1 относятся убиквитин и гомологичный убиквитину домен паркина. Фосфорилирование этих мишеней по консервативному остатку серина (S65) ведет к активации паркина, последующему захвату поврежденных митохондрий и формированию аутофагосом [29] (рис. 1).

Транслокация паркина из цитозоля на наружную мембрану митохондрий зависит от активности PINK1. Паркин в свою очередь катализирует убиквитинирование и протеасомную деградацию различных белков наружной митохондриальной мембраны, включая Drp1, Miro, митофузины 1 и 2 (MFN1/2). Этот механизм блокирует слияние митохондрий, позволяя изолировать поврежденные органеллы и инициировать процесс аутофагии через систему адаптерных белков.

При гипоксии и ряде токсических воздействий процесс митофагии реализуется PINK1–Parkin–независимым путем через рецепторы митохондриальных мембран, содержащие мотивы LIR:

- белки AMBRA1, BNIP3, FUNDC1 и NIX на внешней митохондриальной мембране;
- кардиолипин и PHB2 на внутренней митохондриальной мемbrane.

Убиквитинирование этих рецепторов служит сигналом для cargo-рецепторов p62/SQSTM1, NDP52, оптинейрина и других, связывающихся с убиквитином и белком аутофагосомных мембран LC3B, опосредуя митофагию [30].

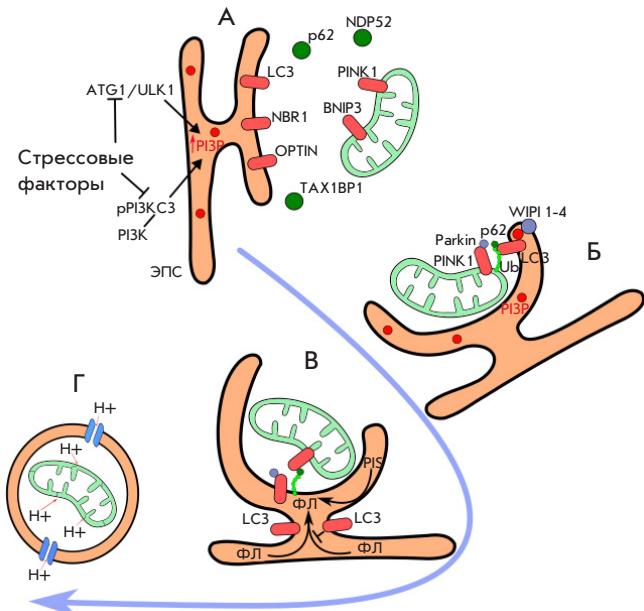


Рис. 1. Механизм митофагии. Стадии: А – инициация митофагии, Б – рецепторные взаимодействия, В – рост фагофора, Г – слияние везикулы с лизосомой. Инициация митофагии происходит под влиянием стрессовых факторов и сопровождается активацией ATG1/ULK1 и фосфорилированием PI3K, что индуцирует продукцию PI3P в ЭПС. PI3P необходим для связывания эффекторных белков WIPI, обеспечивающих взаимодействие с системой конъюгации LC3. Избирательный захват митохондрий реализуется при участии специализированных адаптерных белков (TAX1BP1, NDP52, p62, OPTIN, NBR1) (А). Далее происходит опосредованное паркином и убиквитином связывание LC3 с PINK1 на мемbrane митохондрий. WIPI 1–4, присоединяясь к PI3P, обеспечивает взаимодействие с LC3 и правильную работу комплекса (Б). Рост фагофора происходит посредством переноса ФЛ из просвета ЭПС при участии PI3P. Одновременно с этим в стенах фагофора активируется PIS, инициируя синтез фосфолипидов *de novo* (В). LC3 обеспечивает отщепление везикулы от ЭПС. Происходит ее слияние с лизосомой с последующей деструкцией содержащегося (Г). PI3K – фосфатидилинозитид-3-киназа; PI3P – фосфатидилинозитол-3-фосфат; TAX1BP1 – Tax1-связывающий белок 1; NDP52 – рецептор аутофагии; OPTIN – оптинейрин; PINK1 – PTEN-индукционная киназа 1; BNIP3 – белок 3, взаимодействующий с белком BCL2; ФЛ – фосфолипиды; PIS – фосфатидилинозитолсинтаза, ЭПС – эндоплазматическая сеть

МИТОФАГИЯ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ СТАРЕНИИ

Дезорганизация митохондрий, прогрессирующая при старении, сопровождается развитием митохондриальной дисфункции, что подтверждается результатами электронно-микроскопических исследований [31].

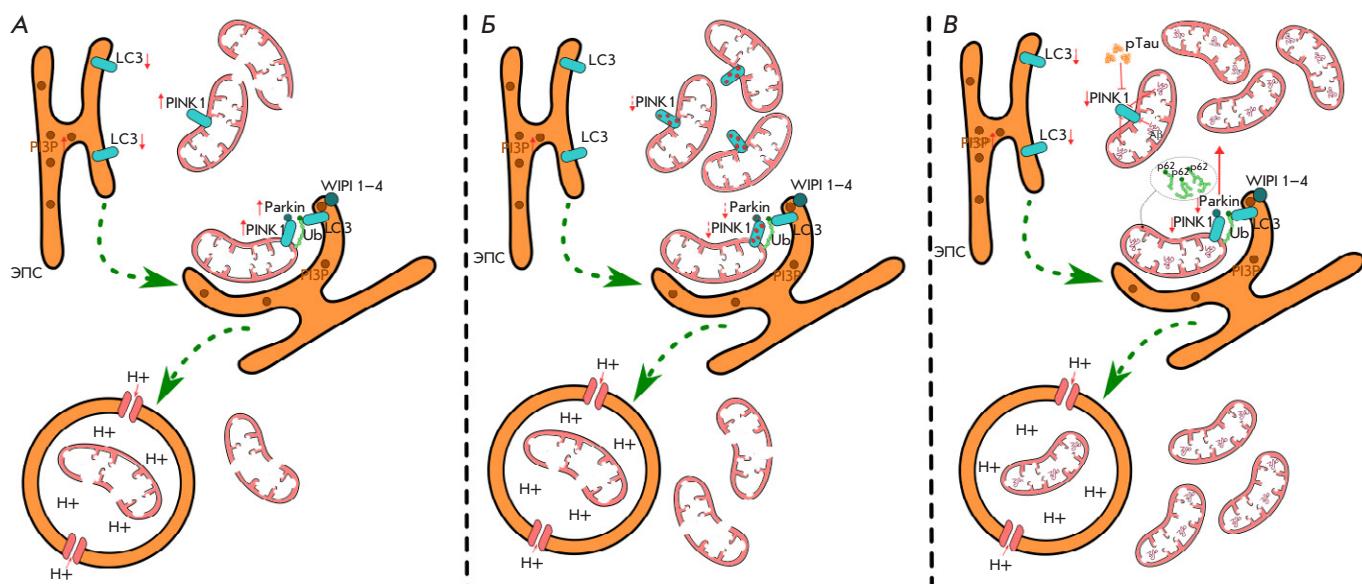


Рис. 2. Изменения процесса митофагии на стадии инициации и рецепторных взаимодействий при физиологическом старении и нейродегенеративных заболеваниях. *А* – старение. Характеризуется накоплением дефектных митохондрий и дисфункцией митофагического процесса. Прогрессирующая митохондриальная дезорганизация сопровождается компенсаторным увеличением уровня PINK1 и паркина. Снижение экспрессии LC3 нарушает взаимодействие рецепторов фагофора и митохондрий, что приводит к угнетению митофагии. *Б* – болезнь Паркинсона. Сопровождается снижением утилизации митохондрий. При генетических формах БП выявляются мутации в генах, кодирующих PINK1 и паркин, что приводит к инактивации соответствующих белков. *В* – болезнь Альцгеймера. Характеризуется значительным увеличением пула дефектных митохондрий и уменьшением интенсивности митофагии. Накопление патологических белковых агрегатов способствует повреждению митохондрий, снижению уровня PINK1 и паркина, увеличению LC3 и p62. PI3Р – фосфатидилинозитол-3-фосфат; p62 – убиквитинсвязывающий белок p62. \downarrow – опосредованное влияние

При изучении ультраструктуры митохондрий в процессе физиологического старения было установлено уменьшение их длины и площади, модификация крист и мембран. Показано, что подобные морфологические изменения коррелируют с увеличением экспрессии маркера митохондриального деления – фосфорилированного Drp1, и снижением содержания белков слияния митохондрий Mfn2 и маркера аутофагии LC3B. Повышенная фрагментация митохондрий при старении приводила к изменению их функции: отмечалось, в частности, снижение транспорта ATP/ADP вследствие уменьшения уровня белка Vdac1 (участвует в регуляции проницаемости митохондриальной мембраны), а также увеличение окислительных повреждений. Для дефектных митохондрий был характерен разрыв внешней мембраны, выделение апоптогенов в цитоплазму с последующей гибелью клеток. Описанные морфофункциональные модификации органелл при старении приводили к снижению плотности нейронов и усилиению нейродегенерации [3].

Многочисленные работы подтверждают прогрессирующее снижение интенсивности аутофагических процессов в ходе возрастной инволюции и при возраст-ассоциированных заболеваниях [32–37].

Использование mt-Кеима-зонда (мономерный кислотоустойчивый флуоресцентный белок, обладающий сродством к митохондриальному матриксу) с целью количественной оценки митофагии в трансгенной линии мышей выявило возрастное снижение уровня митофагии в нейронах зубчатой фасции гиппокампа [33]. Сверхэкспрессия ключевых маркеров PINK1–Parkin-зависимой митофагии в моделях старения сопровождалась увеличением продолжительности жизни модельных организмов (*Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*) [34]. Повышение содержания паркина как в ткани, так и в сосудах головного мозга было зафиксировано в группе старых мышей (возраст 24 месяца) [35, 36]. Установлено, что увеличение экспрессии *Parkin* позволяет снизить количество точечных мутаций митохондриальной ДНК, приводящих к развитию митохондриальной дисфункции [37].

Увеличение апоптотической гибели нейронов в отсутствие PINK1 доказано на клеточных моделях, что подтверждает роль этого белка в выживании нервных клеток при старении [38].

Установлено, что потеря памяти в процессе старения коррелирует со снижением экспрессии генов *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*, *LAMP2* и *LC3*, при этом экспресс-

сия генов *PINK1* и *Parkin* повышается, что сказывается на показателях митохондриального мембранныго потенциала. Подобные изменения в динамике экспрессии генов *LAMP2*, *LC3*, *PINK1* и *Parkin* указывают на дисфункцию процесса митофагии [3] (рис. 2).

В настоящее время появляется все больше доказательств того, что физическая активность является эффективным стимулятором аутофагии, изменяет динамику митохондрий, поддерживая их в рабочем состоянии, и в целом обладает нейропротекторным эффектом. Установлено, что различные виды физических упражнений способны запускать аутофагию в коре головного мозга молодого или взрослого животного и ослаблять аутофагическую дисфункцию в пожилом мозге. В результате недавно проведенных исследований обнаружили, что физические нагрузки повышают уровни связанных с аутофагией белков *LC3-II/LC3-I*, *LC3-II*, *p62*, *Atg7*, *Bnip3L* и *Parkin*, а также уровни *Mfn2* и *Drp1* [39]. Кроме того, Liu и соавт. показали, что изнурительные физические нагрузки индуцируют *PINK1*-зависимую митофагию у мышей *mt-Keima* [33].

Таким образом, баланс процессов митохондриальной динамики и митофагии является специфическим компенсаторным механизмом, играющим ключевую роль в поддержании стабильного функционирования данных органелл в стареющем мозге.

МИТОФАГИЯ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Процессу митофагии принадлежит важнейшая роль в патогенезе таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера (БА) и Паркинсона (БП), риск развития которых значительно повышается с возрастом [2].

Установлено, что ведущим патогенетическим звеном генетически обусловленных форм болезни Паркинсона являются митохондриальная дисфункция и окислительный стресс [40]. Генетические ранние формы БП могут быть вызваны мутациями в генах *PARK2* (*Parkin*), *PINK1* и *DJ-1*, которые кодируют белки, локализованные в митохондриях (рис. 2). Потеря этих белков приводит к повышенной чувствительности к окислительному стрессу и нарушению энергетического обмена [41]. Установлено, что сверхэкспрессия *PINK1* ингибитирует трансляцию мРНК *DRP1*, уменьшает его транслокацию из цитозоля на поверхность митохондрий, вызывая образование удлиненных цепочечных митохондрий и затрудняя процесс утилизации поврежденных органелл. Убиквитинирование *DRP1*, связанное с *PINK1*, приводит к его деградации в протеасомах и последующей инактивации, также

уменьшая таким образом интенсивность деления митохондрий [42]. При этом нокдаун *PINK1* увеличивает фрагментацию митохондрий [43].

Поскольку *PINK1* – единственная известная киназа, катализирующая фосфорилирование убиквитина, выявление S65-фосфоубиквитина может использоваться для оценки активности *PINK1* и рассматривается как биомаркер митохондриального стресса и аутофагии [44]. Повреждение митохондрий приводит к накоплению *PINK1* в результате нарушения его деградации протеазой *PARL* (presenilin-associated rhomboid-like protein), локализованной на внутренней мембране митохондрий [45]. В отличие от идиопатической болезни Паркинсона в аутопсийном материале, полученном от пациентов с мутациями *PINK1* или *Parkin*, тельца Леви в нейронах черной субстанции иногда не выявляются [46]. Предполагают, что это связано с участием *PINK1* и *Parkin* в долгосрочном выживании дофаминовых нейронов, а нарушение этого процесса ведет к их быстрой гибели без накопления патологических белков, что подтверждается и экспериментами с нокдауном *PINK1*.

В ходе исследований доказана дефектность и *PINK1*-*Parkin*-независимого пути, в реализации которого участвует кардиолипин [47]. Нейроны с мутацией *SNCA*, свойственной для болезни Паркинсона, характеризуются более интенсивным переходом кардиолипина на внешнюю мембрану митохондрий. В свою очередь, данный фосфолипид, способный к рефолдингу фибрилл α -синуклеина, путем взаимодействия с *LC3* в митохондриях усиливает митофагический оборот, что приводит к митохондриальной дисфункции, осложняющейся дефектами митофагии. Установлено, что на ранних стадиях БП синаптические митохондрии утрачивают кардиолипиновый кластер, что приводит к снижению интенсивности процесса митофагии [47, 48].

В ряде исследований показали, что многообещающей мишенью для поддержания митофагии при болезни Паркинсона может быть митохондриальная протеиндеубиквитиназа (*USP30*), снижение уровня которой в различных моделях данного заболевания приводило к оптимизации функции митохондрий [5, 49, 50].

Митохондриальная динамика и процесс митофагии нарушаются и при развитии болезни Альцгеймера (рис. 2). Об этом свидетельствует изменение экспрессии генов *ATG5*, *Beclin1*, *LC3A*, *LC3B*, *PINK1*, *TERT*, *BCL2*, *BNIP3L*, обнаруженное на мышиной модели БА [51].

Установлено снижение на 30–50% базального уровня митофагии в гиппокампе пациентов с БА, при этом наблюдается накопление поврежденных митохондрий, характеризующихся уменьшенным

размером, дезорганизованными кристами и снижением выработки АТР [52]. В гиппокампе пациентов с ранней стадией БА зафиксированы повышенные уровни PINK1, в то время как на поздней стадии увеличивается уровень паркина, что указывает на снижение митофагии из-за дефекта в инициации PINK1/Parkin-зависимого пути [45]. Отмечено также снижение рекрутирования активированного LC3 в мембранны фагофора, дисфункция сигнального каскада AMPK и нарушение слияния митофагосом с лизосомами [52].

В митохондриальных фракциях, полученных из образцов мозга пациентов с поздней стадией БА, обнаружено увеличение уровня p62, повышение соотношения LC3II/I и снижение уровня PINK1, что также указывает на сбой в митофагии [53]. Значительное влияние на динамику митохондрий и процессы митофагии оказывает накопление патологических белковых агрегатов при БА. Так, внутрижелудочковое введение β -амилоида приводило к снижению уровней PINK1, паркина и BCL-1, а также увеличению p62 в гиппокампе крыс [54]. Накопление общего и фосфорилированного таубелка сопровождается повышением мембранныного потенциала митохондрий, что препятствует стабилизации PINK1 на наружной митохондриальной мемbrane и предотвращает рекрутирование паркина. Уменьшение содержания PINK1 на внешней мемbrane митохондрий угнетает активацию паркина и E3-убиквитинлигазы, что приводит к нарушению последующих стадий ауто- и митофагии [55]. Сверхэкспрессия паркина восстанавливает митофагию и митохондриальный потенциал [56]. Изменения митохондриальной динамики, сопровождающие развитие данной патологии, заключаются в усилении деления органелл. Накопление токсичных таубелка и β -амилоида увеличивают фосфорилирование DRP1 и способствуют его транслокации в митохондрии [57]. Чрезмерная фрагментация митохондрий в конечном итоге вызывает гибель клеток и нейродегенерацию.

В одном из исследований упоминалось, что изменение гомеостаза АТР и NAD⁺ могут быть одной из причин нарушения митофагии при БА. Об этом свидетельствует тот факт, что при снижении уровня NAD⁺ в клетке запускается процесс агрегации неправильно свернутых белков, что способствует развитию дефектной аутофагии и последующей гибели нейрональных клеток [11].

Стоит отметить, что при БА также снижается активность двух нейропротекторных генов *Sirtuin1* (*SIRT1*) и *Sirtuin3* (*SIRT3*), кодирующих синтез одноименных белков. Функцией сиртуина-1 является индукция аутофагии/митофагии посредством дезацетилирования белков ATG5, ATG7 и ATG8/LC3.

Также сиртуин-1 способствует стабилизации PINK1 и повышает уровень LC3 и Nix/BNIP3, участвующих в митофагии [58]. Сиртуин-3, в свою очередь, активирует ген *FOXO3*, регулирующий апоптоз и аутофагию [59].

Следствием дефицита лизосом в тканях мозга, характерного для патогенеза БА, является изменение динамики активности лизосомальных ферментов. Это, в свою очередь, способствует нарушению резорбции аутофагических скоплений и также считается причиной дефектной митофагии. Так, при наследственной форме БА мутации в гене *PSEN1* (кодирует белок пресенилин 1) приводят к избыточному подщелачиванию лизосомальной среды, патологическому снижению гидролазы лизосом и увеличению уровня p62 [56].

Для многих заболеваний, включая нейродегенеративные, характерно избыточное накопление конечных продуктов гликирования, индуцирующих окислительный стресс и воспалительные процессы посредством выработки активных форм кислорода. Активные формы кислорода, в свою очередь, считаются основным фактором, инициирующим стресс-индуцированную митофагию. В постмортальных образцах мозга пациентов с БА обнаружено повышение экспрессии рецептора конечного продукта гликирования [60, 61].

Таким образом, участие PINK–Parkin-зависимого пути в механизмах митофагии и его роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний изучено достаточно хорошо, однако ряд вопросов при этом остается не исследованным. Так, пристальное внимание в последние годы уделяется изучению альтернативных путей процесса митофагии, таких, например, как деградация компонентов митохондрий с использованием везикул митохондриального происхождения, содержащих окисленные белки, липиды, мутантную митохондриальную ДНК, активные формы кислорода [43]. Недавно обнаружили связь между везикулами митохондриального происхождения, дефектами митофагии и аутоиммунными реакциями, следствием которых является гибель нейронов при БП [62].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс митофагии играет важную роль в поддержании физиологического гомеостаза, в механизмах старения и патогенезе нейродегенеративных расстройств. В настоящее время рассматриваются различные молекулы, изменяющие активность митофагии в нервной ткани, которые могут быть использованы для разработки потенциальных средств для терапии нейродегенеративных заболеваний. В то же время, учитывая разнообразие регулятор-

ных путей митофагии, нет сомнений в том, что этот перечень будет расширен за счет показателей, отражающих состояние митофагии в определенных типах клеток нервной ткани при воздействии факторов стресса различного генеза.

В целом следует отметить, что несмотря на интерес к роли митофагии в возрастной инволюции и в патогенезе возраст-ассоциированных заболеваний, механизмы ее влияния на старение организма изучены недостаточно. К спектру нерешенных вопросов можно отнести участие ряда регуляторных сигнальных молекул в координации взаимодействия между органеллами, особенности митохондриальной динамики, предваряющие митофагический процесс, механизмы деградации аутофагосом в условиях ми-

тохондриального стресса. Особого внимания заслуживают механизмы инициации (активации) классической и рецептор-опосредованной аутофагии.

Таким образом, крайне актуальным представляется дальнейшее изучение взаимосвязи между потенциальными ключевыми маркерами митофагии и их относительным вкладом в процессы нейродегенерации с целью выявления новых перспективных фармацевтических мишеней. ●

*Работа поддержанна грантом Минобрнауки
России на проведение крупных научных
проектов по приоритетным направлениям
научно-технологического развития
(соглашение № 075-15-2024-638).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loeffler DA. Influence of Normal Aging on Brain Autophagy: A Complex Scenario. *Front Aging Neurosci.* 2019;11(49):1–16. doi: 10.3389/fnagi.2019.00049
2. Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2019;5:565–581. doi: 10.1038/s41582-019-0244-7
3. Mishra E, Thakur MK. Alterations in hippocampal mitochondrial dynamics are associated with neurodegeneration and recognition memory decline in old male mice. *Biogerontology.* 2022;23(2):251–271. doi: 10.1007/s10522-022-09960-3
4. Gleixner AM, Pulugulla SH, Pant DB, et al. Impact of aging on heat shock protein expression in the substantia nigra and striatum of the female rat. *Cell Tissue Res.* 2014;357(1):43–54. doi: 10.1007/s00441-014-1852-6
5. Cai Q, Jeong YY. Mitophagy in Alzheimer's Disease and Other Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Cell.* 2020;9(1):150. doi: 10.3390/cells9010150
6. Garza-Lombó C, Pappa A, Panayiotidis MI, Franco R. Redox homeostasis, oxidative stress and mitophagy. *Mitochondrion.* 2020;51:105–117. doi: 10.1016/j.mito.2020.01.002
7. Лукьяннова Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии. М.: РАН, 2019. 215 с.
8. Oliver DMA, Reddy PH. Molecular Basis of Alzheimer's Disease: Focus on Mitochondria. *J. Alzheimer's Dis.* 2019;72(s1):S95–116. doi: 10.3233/jad-190048
9. Lou G, Palikaras K, Lautrup S, et al. Mitophagy and Neuroprotection. *Trends Mol. Med.* 2020;26(1):8–20. doi: 10.1016/j.molmed.2019.07.002
10. Jang JY, Blum A, Liu J, Finkel T. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* 2018;128(9):3662–3670. doi: 10.1172/jci120842
11. Sukhorukov V, Voronkov D, Baranich T, et al. Impaired Mitophagy in Neurons and Glial Cells during Aging and Age-Related Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10251. doi: 10.3390/ijms221910251
12. Fivenson EM, Lautrup S, Sun N, et al. Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochem. Int.* 2017;109:202–209. doi: 10.1016/j.neuint.2017.02.007
13. Freidlin IS, Mammedova JT, Strikova EA. The Role of Autophagy in Infections. *Russ. J. Physiol.* 2019;105(12):1486–1501. doi: 10.1134/s0869813919120057
14. Kwon YT, Ciechanover A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem. Sci.* 2017;42(11):873–886. doi: 10.1016/j.tibs.2017.09.002
15. Turco E, Savova A, Gere F, et al. Reconstitution defines the roles of p62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation. *Nat. Commun.* 2021;12(1):5212. doi: 10.1038/s41467-021-25572-w
16. Walker SA, Ktistakis NT. Autophagosome Biogenesis Machinery. *J. Mol. Biol.* 2020;432(8):2449–2461. doi: 10.1016/j.jmb.2019.10.027
17. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell.* 2007;130(1):165–178. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.021
18. Uemura T, Yamamoto M, Kametaka A, et al. A Cluster of Thin Tubular Structures Mediates Transformation of the Endoplasmic Reticulum to Autophagic Isolation Membrane. *Mol. Cell. Biol.* 2014;34(9):1695–1706. doi: 10.1128/mcb.01327-13
19. Müller AJ, Proikas-Cezanne T. Function of human WIPI proteins in autophagosomal rejuvenation of endomembranes? *FEBS Letters.* 2015;589(14):1546–1551. doi: 10.1016/j.febslet.2015.05.008
20. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018;19(6):349–364. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4
21. Melia TJ, Lystad AH, Simonsen A. Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *J. Cell Biol.* 2020;219(6): e202002085. doi: 10.1083/jcb.202002085
22. Lamark T, Johansen T. Mechanisms of Selective Autophagy. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2021;37(1):143–169. doi: 10.1146/annurev-cellbio-120219-035530
23. Vargas JNS, Wang C, Bunker E, et al. Spatiotemporal Control of ULK1 Activation by NDP52 and TBK1 during Selective Autophagy. *Mol. Cell.* 2019;74(2):347–362.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2019.02.010
24. Yim WWY, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov.* 2020;6(1):6. doi: 10.1038/s41421-020-0141-7
25. Wang JL, Xu CJ. Astrocytes autophagy in aging and neurodegenerative disorders. *Biomed. Pharmacother.* 2020;122:109691. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109691
26. Rambold AS, Lippincott-Schwartz J. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle.* 2011;10(23):4032–4038. doi: 10.4161/cc.10.23.18384
27. Wei Y, Liu M, Li X, et al. Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. *Biomed. Res. Int.* 2018;2018:1–9. doi: 10.1155/2018/1012789
28. Kleele T, Rey T, Winter J, et al. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature.*

- 2021;593(7859):435–439. doi: 10.1038/s41586-021-03510-6
29. Guan R, Zou W, Dai X, et al. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke. *J. Biomed. Sci.* 2018;25(1):87. doi: 10.1186/s12929-018-0487-4
30. Swerdlow NS, Wilkins HM. Mitophagy and the Brain. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(24):9661. doi: 10.3390/ijms21249661
31. Skulachev VP, Vyssokikh MYu, Chernyak BV, et al. Six Functions of Respiration: Isn't It Time to Take Control over ROS Production in Mitochondria, and Aging Along with It? *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(16):12540. doi: 10.3390/ijms241612540
32. Bondy SC. Mitochondrial Dysfunction as the Major Basis of Brain Aging. *Biomolecules*. 2024;14(4):402. doi: 10.3390/biom14040402
33. Liu YT, Sliter DA, Shammas MK, et al. Mt-Keima detects PINK1-PRKN mitophagy in vivo with greater sensitivity than mito-QC. *Autophagy*. 2021;17(11):3753–3762. doi: 10.1080/15548627.2021.1896924
34. Rana A, Oliveira MP, Khamoui AV, et al. Promoting Drp1-mediated mitochondrial fission in midlife prolongs healthy lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Nature Commun.* 2017;8(1):448. doi: 10.1038/s41467-017-00525-4
35. Liang W, Moyzis AG, Lampert MA, et al. Aging is associated with a decline in Atg9b-mediated autophagosome formation and appearance of enlarged mitochondria in the heart. *Aging Cell*. 2020;19(8):e13187. doi: 10.1111/acel.13187
36. Tyrrell DJ, Blin MG, Song J, et al. Aging Impairs Mitochondrial Function and Mitophagy and Elevates Interleukin 6 Within the Cerebral Vasculature. *J. Am. Heart Assoc.* 2020;9(23):e017820. doi: 10.1161/jaha.120.017820
37. Gaziev AI, Abdullaev S, Podlutsky A. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age. *Biogerontology*. 2014;15(5):417–438. doi: 10.1007/s10522-014-9515-2
38. Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z, et al. PINK1 Is Necessary for Long Term Survival and Mitochondrial Function in Human Dopaminergic Neurons. Waldvogel H, editor. *PLoS One*. 2008;3(6):e2455. doi: 10.1371/journal.pone.0002455
39. Qin YY, Pan SY, Dai JR, et al. Alleviation of ischemic brain injury by exercise preconditioning is associated with modulation of autophagy and mitochondrial dynamics in cerebral cortex of female aged mice. *Exp. Gerontol.* 2023;178:112226. doi: 10.1016/j.exger.2023.112226
40. Dagda RK. Role of Mitochondrial Dysfunction in Degenerative Brain Diseases, an Overview. *Brain Sci.* 2018;8(10):178. doi: 10.3390/brainsci8100178
41. Ma K, Zhang Z, Chang R, et al. Dynamic PGAM5 multimers dephosphorylate BCL-xL or FUNDC1 to regulate mitochondrial and cellular fate. *Cell Death Differ.* 2019;27(3):1036–1051. doi: 10.1038/s41418-019-0396-4
42. Sulkshane P, Ram J, Thakur A, et al. Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia. *Redox Biology*. 2021;45:102047. doi: 10.1016/j.redox.2021.102047
43. Macdonald R, Barnes K, Hastings C, Mortiboys H. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? *Biochem. Soc. Trans.* 2018;46(4):891–909. doi: 10.1042/bst20170501
44. Fiesel FC, Springer W. Disease relevance of phosphorylated ubiquitin (p-S65-Ub). *Autophagy*. 2015;11(11):2125–2126. doi: 10.1080/15548627.2015.1091912
45. Wong YC, Holzbaur ELF. Autophagosome dynamics in neurodegeneration at a glance. *J. Cell Sci.* 2015;128(7):1259–1267. doi: 10.1242/jcs.161216
46. Takanashi M, Li Y, Hattori N. Absence of Lewy pathology associated with PINK1 homozygous mutation. *Neurology*. 2016;86(23):2212–2213. doi: 10.1212/wnl.0000000000002744
47. Ryan T, Bamm VV, Stykel MG, et al. Cardiolipin exposure on the outer mitochondrial membrane modulates α -synuclein. *Nat. Commun.* 2018;9(1):817. doi: 10.1038/s41467-018-03241-9
48. Chung SY, Kishinevsky S, Mazzulli JR, et al. Parkin and PINK1 Patient iPSC-Derived Midbrain Dopamine Neurons Exhibit Mitochondrial Dysfunction and α -Synuclein Accumulation. *Stem Cell Reports*. 2016;7(4):664–677. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.012
49. Bingol B, Tea JS, Phu L, et al. The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature*. 2014;510(7505):370–375. doi: 10.1038/nature13418
50. Bakula D, Scheibye-Knudsen M. MitophAging: Mitophagy in Aging and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8(239). doi: 10.3389/fcell.2020.00239
51. Reddy PH, Yin X, Manczak M, et al. Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2018;27(14):2502–2516. doi: 10.1093/hmg/ddy154
52. Fang EF, Hou Y, Palikaras K, et al. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 2019;22(3):401–412. doi: 10.1038/s41593-018-0332-9
53. Vaillant-Beuchot L, Mary A, Pardossi-Piquard R, et al. Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains. *Acta Neuropathol.* 2020;141(1):39–65. doi: 10.1007/s00401-020-02234-7
54. Han Y, Wang N, Kang J, Fang Y. β -Asarone improves learning and memory in A β 1-42-induced Alzheimer's disease rats by regulating PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Metab. Brain Dis.* 2020;35(7):1109–1117. doi: 10.1007/s11011-020-00587-2
55. Chen RH, Chen YH, Huang TY. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. *J. Biomed. Sci.* 2019;26(1):80. doi: 10.1186/s12929-019-0569-y
56. Martin-Maestro P, Sproul A, Martinez H, et al. Autophagy Induction by Bexarotene Promotes Mitophagy in Presenilin 1 Familial Alzheimer's Disease iPSC-Derived Neural Stem Cells. *Mol. Neurobiol.* 2019;56:8220–8236. doi: 10.1007/s12035-019-01665-y
57. Yan J, Liu XH, Han MZ, et al. Blockage of GSK3 β -mediated Drp1 phosphorylation provides neuroprotection in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 2015;36(1):211–227. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.08.005
58. Lee IH. Mechanisms and disease implications of sirtuin-mediated autophagic regulation. *Exp. Mol. Med.* 2019;51(9):1–11. doi: 10.1038/s12276-019-0302-7
59. Meng H, Yan WY, Lei YH, et al. SIRT3 Regulation of Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci.* 2019;11:313. doi: 10.3389/fnagi.2019.00313
60. Srikanth V, Maczurek A, Phan T, et al. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 2011;32(5):763–777. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.016
61. Sukhorukov VS, Mudzhiri NM, Voronkova AS, et al. Mitochondrial Disorders in Alzheimer's Disease. *Biochemistry (Moscow)*. 2021;86(6):667–679. doi: 10.1134/s0006297921060055
62. Matheoud D, Sugiura A, Bellemare-Pelletier A, et al. Parkinson's Disease-Related Proteins PINK1 and Parkin Repress Mitochondrial Antigen Presentation. *Cell*. 2016;166(2):314–327. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.039

УДК 579.6:577.21:637.05

Полное секвенирование генома выявляет вариабельность метаболических и иммунных систем у изолятов *Propionibacterium freudenreichii*

И. Д. Антипенко^{1*}, С. А. Венедюхина¹, Н. П. Сорокина², И. В. Кучеренко², Т. С. Смирнова², Г. Н. Рогов², М. Ю. Шкурников¹

¹Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», факультет биологии и биотехнологии, лаборатория исследований молекулярных механизмов долголетия, Москва, 101000 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Углич, 109316 Россия

*E-mail: iantipenko@hse.ru

Поступила в редакцию 31.07.2025

Принята к печати 29.09.2025

DOI: 10.32607/actanaturee.27764

РЕФЕРАТ Бактерии *Propionibacterium freudenreichii* играют важную роль в производстве сыров швейцарского типа, однако геномная вариабельность штаммов, влияющая на их технологические свойства, остается недостаточно изученной. Охарактеризованы метаболические и генетические различия промышленных штаммов *P. freudenreichii*. Сопоставление фенотипических и геномных данных позволяет выявлять маркеры технологически значимых признаков и использовать их для скрининга новых штаммов. Это создает основу для подбора консорциумов с заданными свойствами и разработки заквасочных культур с улучшенными производственными характеристиками. В работе проведено полногеномное секвенирование и сравнительный анализ пяти промышленных штаммов *P. freudenreichii*. Эти штаммы, несмотря на их высокую геномную идентичность, различались газообразованием и метаболизмом субстратов. Филогенетический анализ показал близость штамма *P. freudenreichii* FNCPS 828 к подвиду *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (z -score = 0.99948), который не способен восстанавливать нитраты, но метаболизирует лактозу. Ген *narG*, кодирующий альфа-субъединицу нитратредуктазы, идентифицирован только у одного из пяти проанализированных штаммов – FNCPS 828, а также у 39% ранее описанных штаммов *P. freudenreichii*, что указывает на этот ген как на потенциальный маркер нитратвосстанавливающей активности. Анализ 112 геномов *P. freudenreichii* выявил систему CRISPR-Cas I-G у 74% штаммов, а тип I-E только примерно у 25%. Все пять изученных штаммов содержали систему типа I-G; у FNCPS 3 также обнаружена полноценная система I-E с наибольшим числом CRISPR-спейсеров, включая соответствовавшие геномам ранее опубликованных бактериофагов. Наиболее распространенные антифаговые системы включали RM I и IV, AbiE, PD-T4-6, HEC-06 и ietAS. Таким образом, выявлено генетическое разнообразие штаммов *P. freudenreichii*, имеющее значение для их промышленного применения. Обнаружение *narG* в качестве потенциального маркера восстановления нитратов, а также детальное картирование систем CRISPR-Cas расширяют возможности рационального подбора и инженерной оптимизации заквасочных культур *P. freudenreichii* с заданными метаболическими свойствами и устойчивостью к бактериофагам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Propionibacterium*, полногеномное секвенирование, метаболизм, CRISPR-Cas, бактериофаги.

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Propionibacterium* играют важную роль в пищевой промышленности. В частности, штаммы *Propionibacterium freudenreichii* активно

применяются в процессах созревания сыров швейцарского типа [1]. Ключевым метаболическим путем *P. freudenreichii* является цикл Вуда–Веркмана, в котором лактат сначала превращается в пируват,

а затем метаболизируется: одна часть превращается в пропионат, придающий сыру характерный вкус, а другая – в ацетат и углекислый газ, обеспечивающие образование характерных «глазков» [2].

Каждый штамм *P. freudenreichii* характеризуется индивидуальным набором ферментов, определяющим особенности его метаболической активности [3], что влияет на спектр потребляемых углеводов и определяет вкусовые качества конечного продукта [4]. Кроме того, эти бактерии синтезируют витамины B9 и B12, конъюгированную линолевую кислоту, трегалозу, бактериоцины и органические кислоты, а также обладают пробиотическими свойствами [5].

Заражение бактериофагами представляет серьезную проблему для молочной промышленности, поскольку может привести к срыву ферментации и появлению дефектов в продукте. Бактериофаги обнаруживаются примерно в половине сыров швейцарского типа в концентрации как минимум 10^5 БОЕ/г, они размножаются по мере роста пропионовокислых бактерий в теплой камере при созревании сыра [6]. Учитывая ключевую роль *P. freudenreichii* в формировании органолептических характеристик сыров, изучение систем их иммунной защиты имеет важное практическое значение для выявления штаммов, устойчивых к фагам, и минимизации риска технологических сбоев на стадии созревания продукции [7].

Несмотря на промышленную значимость *P. freudenreichii*, геномная характеристика промышленных штаммов этого вида весьма ограничена. Полногеномное секвенирование позволяет выявлять межштаммовые вариации и устанавливать связь между генотипом и технологическими свойствами, включая метаболизм, стрессоустойчивость и защитные системы [4].

В настоящем исследовании представлены результаты полногеномного секвенирования пяти штаммов *P. freudenreichii*, используемых в молочной промышленности, а также комплексная геномная характеристика этих штаммов с акцентом на их метаболические особенности, защитные механизмы и вариативность функциональных генов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и условия культивирования

В работе использовали пять штаммов *P. freudenreichii*: FNCPS 2 (GCA_044990475.1), FNCPS 3 (GCA_044990455.1), FNCPS 4 (GCA_044990515.1), FNCPS 6 (GCA_044990495.1) и FNCPS 828 (GCA_044990435.1), полученные из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института маслоделия и сыроделия молочной промышленности (ВНИИМС – филиал Федерального научного

центра пищевых систем имени В.М. Горбатова РАН). Штаммы FNCPS 2 и FNCPS 3 были выделены из образцов сырого молока, остальные – из образцов сыра. Все штаммы получены из продуктов, произведенных на территории Алтайского края, Россия.

Пропионовокислые бактерии культивировали в жидкой питательной среде следующего состава: пептон – 10 г, дрожжевой экстракт – 10 г, хлористый кобальт – 0.01 г, однозамещенный фосфорнокислый калий – 1 г, 40%-ная молочная кислота – 20 см³. Указанные компоненты растворяли в 1 л дистиллированной воды, доводили pH до 7.1 ± 0.1, разливали по пробиркам и стерилизовали при температуре 121 ± 2°C в течение 15 мин. В этой же среде изучали газообразующую активность штаммов *P. freudenreichii*.

Влияние продуктов протеолиза белков молока на газообразование пропионовокислых бактерий изучали, используя питательную среду аналогичного состава, однако компоненты вносили в обезжиренное молоко, предварительно гидролизованное панкреатином и разбавленное дистиллированной водой в соотношении 1 : 2.

Для накопления культур пропионовокислых бактерий среду культивирования инокулировали 1% посевного материала и инкубировали в термостате при температуре 30 ± 1°C в течение 72 ч.

Фенотипическая характеристика штаммов

Скорость газообразования и объем выделившегося газа определяли при культивировании в градуированных пробирках Дунбара при температуре 30 ± 1°C с дозой инокулята 1%. Объем выделившегося газа фиксировали ежедневно в течение 15 сут. Скорость газообразования рассчитывали как отношение максимального объема газа к числу суток культивирования.

Влияние температуры на газообразующую активность культур оценивали, культивируя клетки в градуированных пробирках Дунбара при температуре 18 ± 1°C, 22 ± 1°C и 30 ± 1°C, с дозой инокулята 1%. Объем газа регистрировали ежедневно в течение 15 сут.

Для идентификации анаэробных бактерий исследовали биохимическую активность культур с использованием тест-системы API 20A (bioMérieux, Франция) в соответствии с инструкцией производителя. Результаты, полученные на тест-стрипах, анализировали с применением онлайн-базы данных APIWEB (bioMérieux).

Секвенирование и сборка бактериального генома

ДНК для секвенирования генома выделяли с использованием набора ExtractDNA Blood and Cells

(«ЕвроГен», Россия) согласно инструкциям производителя. Библиотеки ДНК готовили с помощью набора MGIEasy Fast FS DNA Library Prep Set V2.0 (Cat. No. 940-001196-00, MGI, Китай) согласно протоколу производителя. Качество библиотек оценивали с использованием набора для анализа ДНК Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (Cat. No. Q33230, Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific). Длину фрагментов библиотек ДНК оценивали с помощью капиллярного гель-электрофореза QIAxcel Advanced с использованием набора QX DNA Fast Analysis Kit (Cat. No. 929008, Qiagen, Германия). Секвенирование проводили с использованием проточной ячейки FCS на платформе MGI DNBSEQ-G50 (BGI, Китай) в режиме PE150.

Сборку бактериальных геномов выполняли с использованием SPAdes [8] в режиме «isolate». Для повышения качества итоговой сборки сырье прочтения были выровнены на контиги при помощи Bowtie2 [9], после чего файлы выравнивания были отсортированы и проиндексированы с использованием инструментов SAMtools [10] и переданы в Pilon [11] для исправления неточностей сборки. Качество сборки оценивали с помощью QUAST [12], полноту собранных геномов оценивали с помощью BUSCO [13]. Собранные геномные последовательности размещены в базе данных NCBI (BioProject: PRJNA1184111).

Анализ геномов

Аннотацию геномов и их функциональный анализ проводили с использованием конвейера аннотации прокариотических геномов NCBI [14] и платформы BV-BRC [15], использующей алгоритм RASTtk [16]. Сравнительный анализ наличия генов у пропионовокислых бактерий осуществляли с помощью платформы BV-BRC на основе высококаче-

ственных общедоступных полных сборок геномов *P. freudenreichii* ($n = 112$).

Идентификация систем бактериального иммунитета

Поиск систем бактериального иммунитета проводили с использованием программы PADLOC (v2.0.0) [17]. CRISPR-повторы и спейсеры идентифицировали с помощью инструмента CRISPR-Cas Finder v4.3.2 [18], аннотацию белков Cas проводили с использованием PADLOC. Для определения возможных мишней спейсеры выравнивали на геномы фагов бактерий с использованием Bowtie2 v2.5.4 [19]. Нуклеотидные последовательности 575 геномов фагов получены из базы данных NCBI (дата доступа: 04.07.2025).

Филогенетический анализ

Филогенетическую идентификацию и определение близкородственных штаммов проводили с помощью анализа корреляции тетрануклеотидов через веб-сервис JSpeciesWS [20]. Среднюю нуклеотидную идентичность (ANI) сравнивали с использованием алгоритма OrthoANI [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая геномная характеристика

Полногеномное секвенирование считается золотым стандартом генетической характеристики микроорганизмов. Общие характеристики геномных последовательностей пяти штаммов представлены в табл. 1.

Тетракорреляционный анализ показал, что наибольшее сходство с исследуемыми штаммами *P. freudenreichii* FNCPS 828, 2, 6 и 4 имеет типовой штамм *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* CCUG 36819 (z-score: 0.99948, 0.96457, 0.97622, 0.98812 со-

Таблица 1. Геномные характеристики исследованных штаммов *P. freudenreichii* по данным полногеномного секвенирования

<i>P. freudenreichii</i>	FNCPS 2	FNCPS 3	FNCPS 4	FNCPS 6	FNCPS 828
Контиги	599	205	159	446	83
GC-контент	65.95	67.04	66.68	66.38	67.24
Контиг L50	9	11	5	11	9
Длина генома, п.н.	2806765	2894278	2649124	2734816	2579802
Контиг N50	101.834	63836	169499	79634	93772
CDS	2.684	2.768	2.497	2.603	2.349
тРНК	48	173	44	58	45
Области повторов	44	48	13	46	38
pРНК	3	3	4	3	4
Гипотетические белки	935	933	790	845	670
Белки с функциональной аннотацией	1.749	1.835	1.707	1.758	1.679

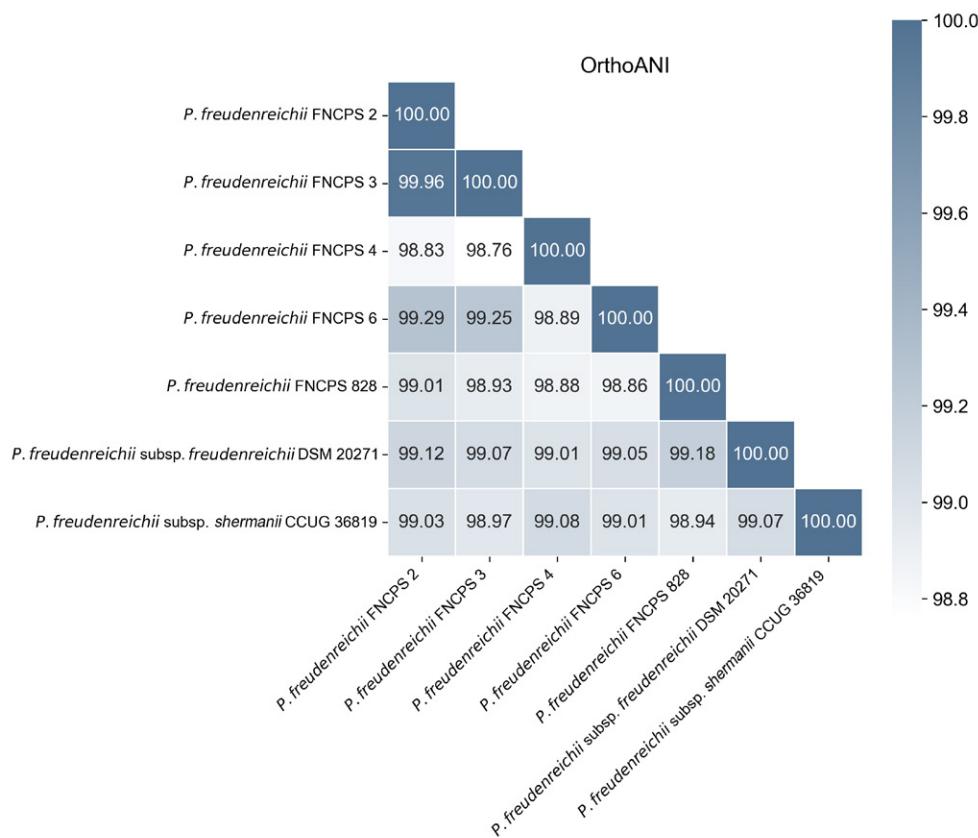


Рис. 1. Термальная карта OrthoANI-выравнивания штаммов *P. freudenreichii*. Значения отражают процент средней нуклеотидной идентичности между ортологичными генами разных штаммов. Значения на диагонали (100%) соответствуют идентичности каждого штамма самому себе

ответственно). Наиболее близким штамму FNCPS 3 оказался *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSM 20271 (z -score = 0.98812). Расчет значений OrthoANI между всеми исследуемыми штаммами и референсными геномами показал высокую филогенетическую близость ($ANI > 98\%$), что указывает на их вероятную принадлежность к одной клonalной группе. Результаты представлены в виде матрицы парных сходств (рис. 1).

Фенотипирование штаммов

Газообразование. Газообразование (продукция CO_2) является одной из ключевых технологических характеристик пропионовокислых бактерий, определяющей формирование «глазков» в сырах типа Эмменталь [22]. Основным продуцентом CO_2 в процессе созревания являются *P. freudenreichii*, которые метаболизируют молочную кислоту с образованием пропионата, ацетата и CO_2 .

Для оценки газообразующей активности были проведены эксперименты с использованием двух типов питательной среды – с добавлением и без добавления гидролизата молока. Результаты представлены на рис. 2A,Б.

Штамм *P. freudenreichii* FNCPS 2, растущий на среде без гидролизата молока, характеризовал-

ся наибольшей скоростью и объемом газообразования, тогда как у штаммов FNCPS 3 и FNCPS 4 эти показатели имели низкие значения. При использовании среды с гидролизованным молоком различия между штаммами уменьшились: активность *P. freudenreichii* FNCPS 2 сохранялась на высоком уровне, показатели FNCPS 6 и FNCPS 828 значительно возрастали, тогда как FNCPS 3 демонстрировал низкий объем выделяемого газа. Таким образом, штамм FNCPS 2 характеризуется стабильной и высокой газообразующей способностью, в то время как FNCPS 3 имеет низкую активность независимо от условий культивирования.

Зависимость газообразования штаммами *P. freudenreichii* от температуры представлена на рис. 3. При 18°C наибольшее выделение CO_2 наблюдалось у FNCPS 4, тогда как FNCPS 3 газ не продуцировал. Повышение температуры до 22 и 25°C приводило к увеличению объема образующегося CO_2 у всех штаммов, особенно у FNCPS 6 и FNCPS 828, показавших к 14-м суткам максимальные значения среди всех штаммов.

Метаболическое профилирование бактерий

Метаболическое профилирование штаммов было выполнено с использованием системы BioMérieux, результаты представлены на рис. 4.

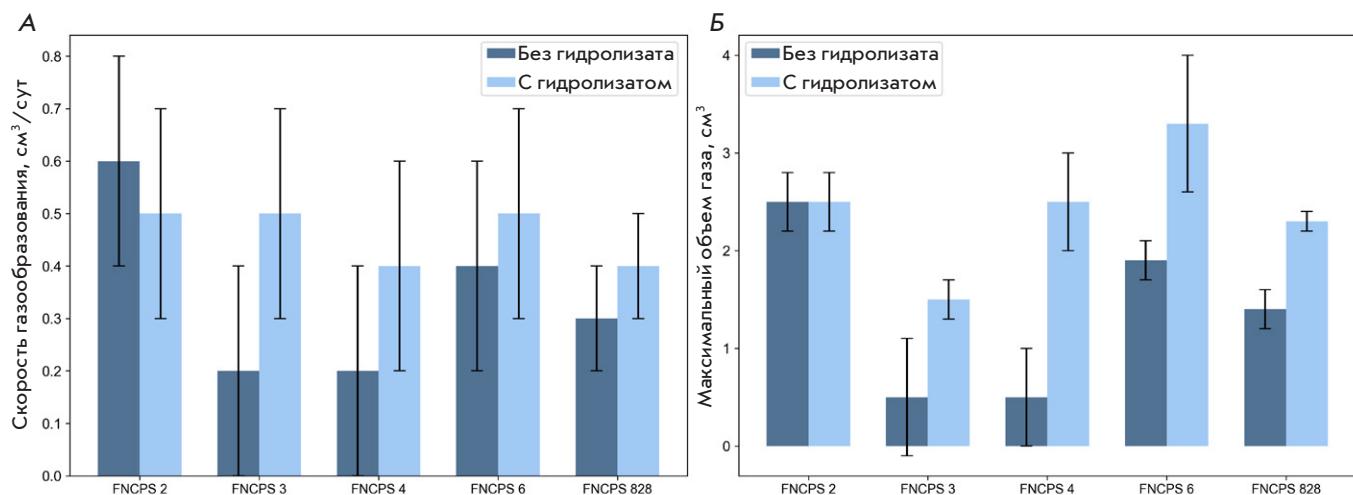


Рис. 2. А – максимальная скорость газообразования пропионовокислых бактерий на различных питательных средах; Б – максимальный объем выделившегося газа. Значения представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение

Согласно полученным данным, единственными субстратами, метаболизируемыми всеми штаммами, были *D*-манноза, *D*-глюкоза и *D*-лактоза. Штамм FNCPS 3, в отличие от остальных штаммов, не утилизировал глицерин и не обладал каталазной активностью. Наиболее широким метаболический профиль (12 из 20 протестированных субстратов) был у *P. freudenreichii* FNCPS 2. Кроме того, штаммы FNCPS 828 и FNCPS 4 обладали способностью разлагать желатин, что было нехарактерно для остальных штаммов.

Анализ генома

Анализ кодирующих последовательностей на уровне функциональных категорий (role name) аннотированных биологических функций генов показал, что все штаммы обладали сопоставимым числом уникальных функциональных групп (от 738 до 750), из которых 724 были общими для всех (рис. 5). Наиболее связанными друг с другом оказались штаммы FNCPS 4 и 828, которые имели 16 общих уникальных функциональных групп генов.

Полиморфные варианты ряда генов в исследованных штаммах могут играть ключевую роль в процессе созревания сыров, влияя на органолептические свойства продукции, эффективность метаболических путей и общую пищевую ценность. Так, только у штаммов FNCPS 4 и FNCPS 828 *P. freudenreichii* выявлен полный набор генов, кодирующих ферменты метаболизма 1,2-пропандиола и компоненты пропандиолдегидратазного комплекса (гены *PduA*, *PduB*, *PduJ*, *PduK*, *PduN*, *PduU*, *PduV*), что указывает на способность этих штаммов к анаэробному превращению пропандиола в пропанол и пропионат [23].

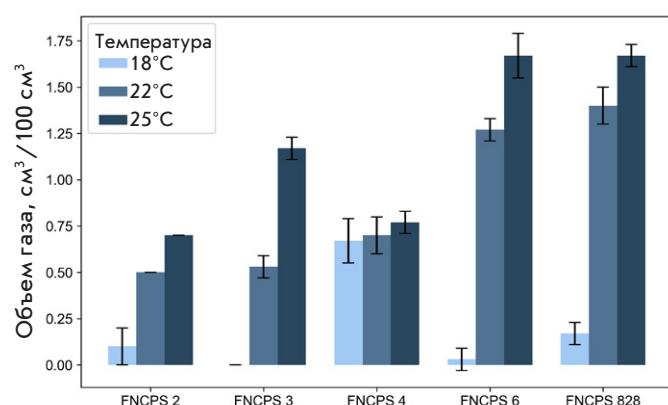


Рис. 3. Влияние температуры на объем газообразования. Значения представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение

Штаммы FNCPS 2, 3 и 6 содержат аспартатрациемазу [EC 5.1.1.13], которая участвует в синтезе *D*-аспартата, а также ген *OrrB*, кодирующий компонент олигопептидного транспортера, обеспечивающего поглощение пептидов из окружающей среды – важного источника азота в условиях ферментативной матрицы.

Единственным отличием на уровне функционального класса стало отсутствие у штамма FNCPS 828 генов, относящихся к классу *Nitrogen Metabolism*.

Определение подвида

Вид *P. freudenreichii* традиционно подразделяется на два подвида – *freudenreichii* и *shermanii*. Основными признаками, дифференциирующими эти подвиды, являются способность к восстановлению

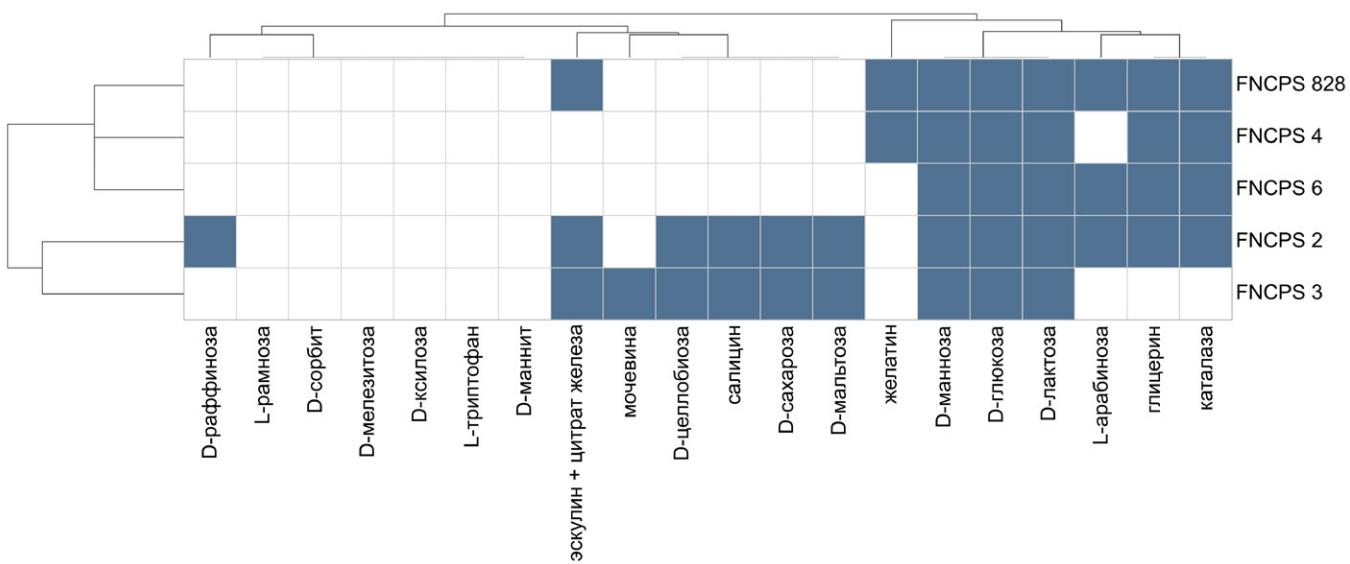


Рис. 4. Термальная карта ферментативного и биохимического профиля штаммов *P. freudenreichii*. Цветовая шкала отражает наличие положительной реакции (синий цвет) или ее отсутствие (белый цвет) на соответствующий субстрат. Штаммы сгруппированы по сходству биохимической активности; результаты кластеризации отображены в виде дендрограммы

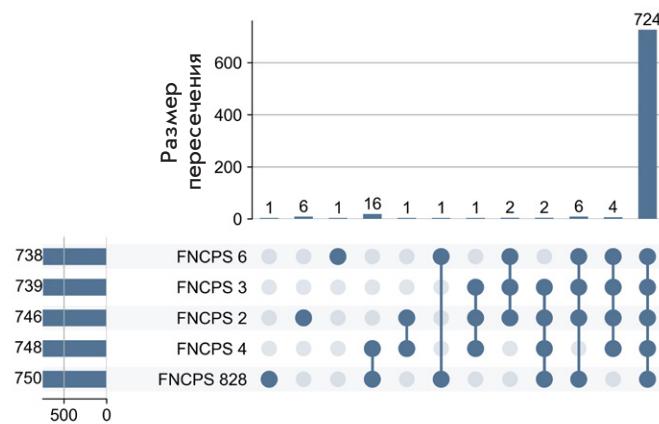


Рис. 5. Пересечения функциональных групп между штаммами *P. freudenreichii*. Высота столбцов отражает количество функциональных групп, встречающихся в одной или нескольких комбинациях штаммов; в нижней части показано, в каких штаммах представлены соответствующие функциональные роли

нитратов и ферментации лактозы [4]. Как правило, штаммы *ssp. freudenreichii* восстанавливают нитраты, но не метаболизируют лактозу, тогда как *ssp. shermanii* способны ферментировать лактозу, но не восстанавливают нитраты [24].

Ключевым ферментом, вовлеченым в восстановление нитратов, является комплекс дыхательной нитратредуктазы [EC 1.7.99.4]. Этот фермент функционирует как конечный акцептор электронов в анаэробных условиях, участвуя в генерации энергии. Геномный анализ показал, что у штам-

ма FNCPS 828 отсутствует ген *narG*, кодирующий альфа-цепь дыхательной нитратредуктазы, в которой осуществляется непосредственное восстановление нитрата до нитрита [25]. Отсутствие этого гена выявлено у 44 из 112 (39%) проанализированных геномов *P. freudenreichii* (рис. 6А). При этом среди штаммов, содержащих ген *narG*, не найдено ни одного, ранее отнесенного к подвиду *shermanii*.

Единственным отличием в генетическом профиле штамма FNCPS 828 от остальных исследованных штаммов было отсутствие гена, кодирующего α -галактозидазу – фермента, расщепляющего α -D-галактоолигосахариды и полисахариды, включая мелибиозу, раффинозу, стахиозу и вербаскозу. Ген α -галактозидазы выявлен только в 14% геномов *P. freudenreichii* и не найден у всех типовых представителей *ssp. freudenreichii* (рис. 6Б).

Характеристика систем бактериальной защиты

Общая характеристика. Бактериофаги представляют серьезную угрозу для пропионовокислых бактерий, поскольку заражение ими приводит к снижению метаболической активности клеток, что особенно критично в условиях промышленного производства [26]. В ходе эволюции бактерии выработали разнообразные системы защиты от заражения бактериофагами.

Анализ 112 ранее опубликованных геномов *P. freudenreichii* показал, что наиболее распространеными системами бактериального иммуни-

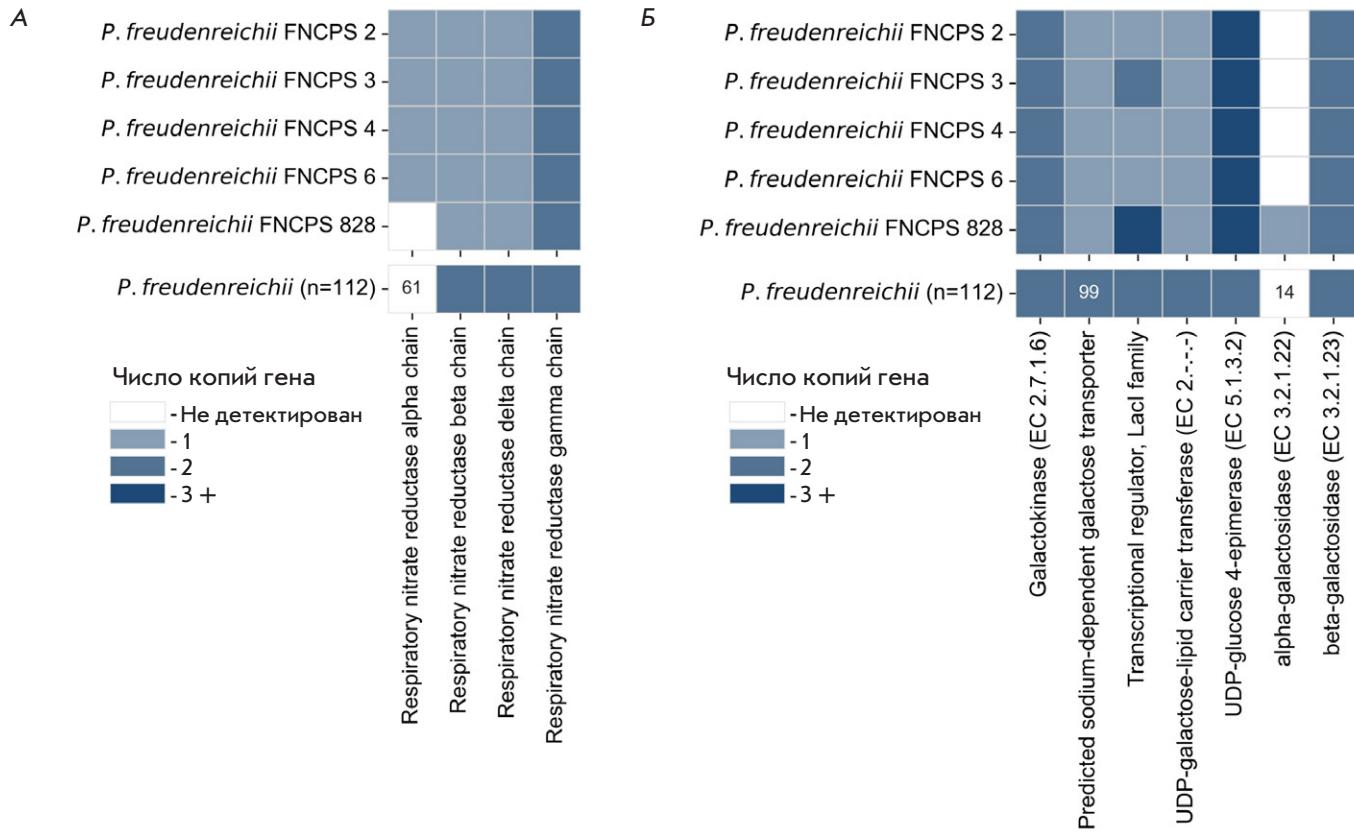


Рис. 6. Распределение генов метаболизма нитратов и лактозы у представителей *P. freudenreichii* ($n = 112$) и исследуемых штаммов. *А* – гены дыхательной нитратредуктазы; *Б* – гены, ассоциированные с метаболизмом лактозы. Верхняя панель: матрица наличия/отсутствия генов (синий – присутствие; белый – отсутствие; числа обозначают число копий); нижняя панель – процентное распределение каждого гена в популяции. Второй ключевой метаболический маркер – способность к ферментации лактозы. Фенотипический анализ показал, что все пять исследованных штаммов обладают способностью метаболизировать лактозу (рис. 4). Результаты геномного анализа подтвердили наличие полного набора генов, ответственных за утилизацию лактозы, в том числе ключевого фермента β -галактозидазы (*lacZ*)

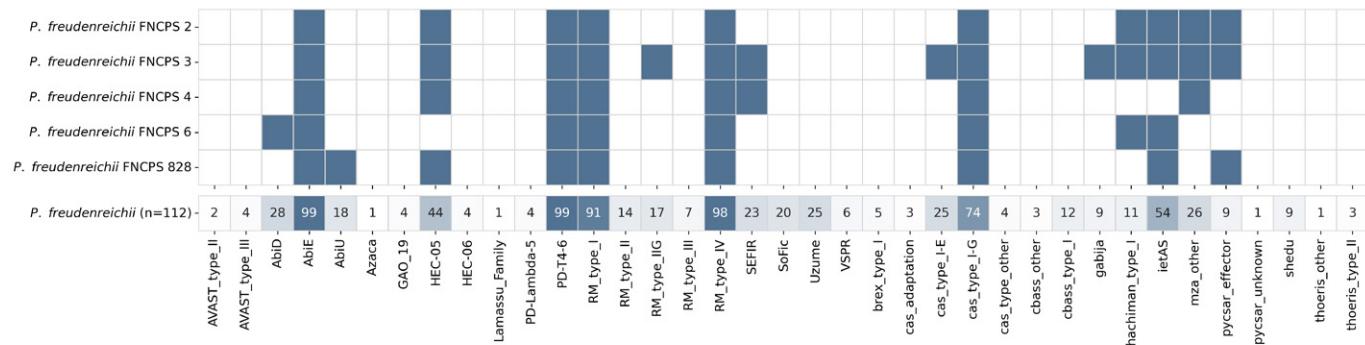


Рис. 7. Системы бактериального иммунитета *P. freudenreichii* ($n = 112$) и пяти штаммов, полученных из коллекции ВНИИМС. На верхней части рисунка изображена бинарная матрица: синий цвет указывает на наличие системы, белый цвет – на ее отсутствие. На нижней панели указан процент представленности каждого гена в популяции

тета, представленными более чем в 90% геномов, являются системы абортинной инфекции (AbiE, PD-T4-6) и рестрикции-модификации (RM) типов I и IV. Достаточно часто встречалась также система CRISPR-Cas типа I-G, обнаруженная в 74% штам-

мов (83 из 112) (рис. 7). Все перечисленные защитные механизмы выявлены и у пяти штаммов, проанализированных в нашей работе.

Помимо широко распространенных систем, в пяти проанализированных геномах найдены и менее из-

Таблица 2. Характеристика систем CRISPR-Cas у исследуемых штаммов *P. freudenreichii*

Штамм <i>P. freudenreichii</i>	Система CRISPR-Cas, тип	Белки Cas, число	Уникальные спайсеры, число	Уникальные CRISPR, число
FNCPS 2	I-G	6	44	2
FNCPS 3	I-G, I-E	14	170	5
FNCPS 4	I-G	6	13	3
FNCPS 6	I-G	6	62	4
FNCPS 828	I-G	5	37	2

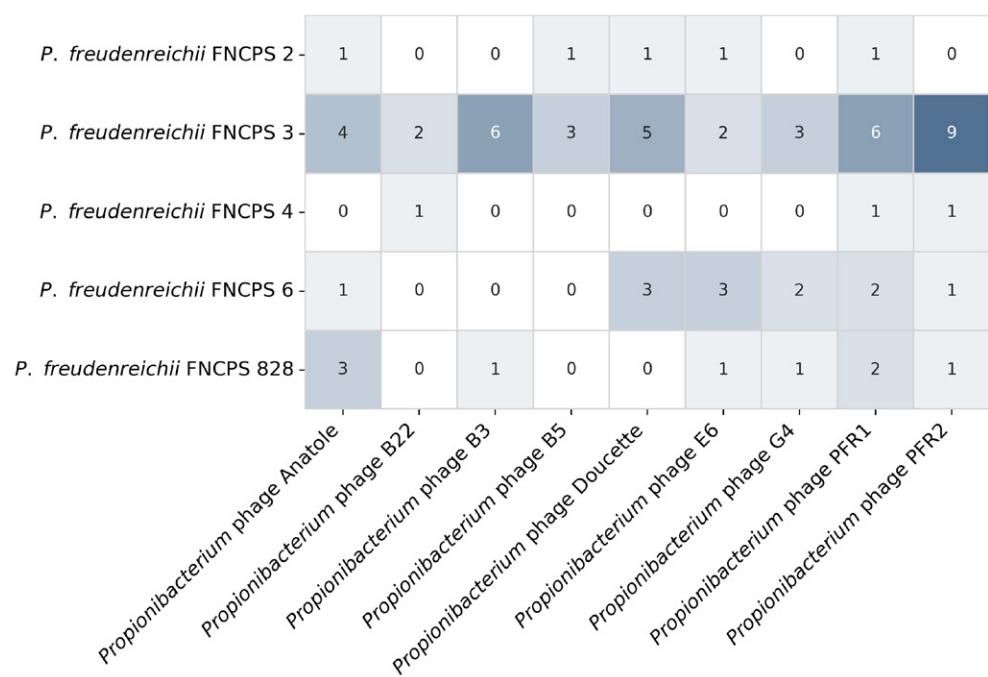


Рис. 8. Термография совпадений спайсеров с геномами протестированных фагов. Цифры в ячейках обозначают количество спайсеров из каждого бактериального штамма, выровненных на соответствующий геном фага

ученные антифаговые механизмы. Так, система HEC-05, задействующая нуклеазы для распознавания и разрушения модифицированной фаговой ДНК [27], обнаружена у всех штаммов, за исключением FNCPS 6. В популяции *P. freudenreichii* она встречается в 44% геномов. Система ietAS, характерная для 54% штаммов данного вида, представлена во всех исследованных геномах, кроме FNCPS 4. Несмотря на то что ее механизм действия пока не раскрыт полностью, предполагается, что она может функционировать в синергии с другими защитными системами [28].

Интересно, что, несмотря на сравнительно высокую частоту обнаружения таких систем, как SoFic (20%) и Uzume (25%), в штаммах *P. freudenreichii*, они отсутствовали во всех пяти исследованных геномах. В то же время менее распространенные в популяции системы – Hachiman I (11%) и Pycsar (9%) – обнаружены в трех из пяти штаммов.

CRISPR-Cas

CRISPR-Cas является одной из наиболее известных адаптивных систем защиты, обеспечивающая иммунитет к ранее встреченным фагам за счет интеграции фрагментов их ДНК в геном бактерии [29]. Проведен анализ наличия и состава систем CRISPR-Cas в пяти исследуемых штаммах *P. freudenreichii* (табл. 2).

У штаммов FNCPS 2, FNCPS 4 и FNCPS 6 обнаружена полная система типа I-G, включающая все необходимые белки: Cas1, Cas2, Cas3, Cas5, Cas6, Cas7 и Cas8, что свидетельствует о ее потенциальной функциональности. Штамм FNCPS 3 содержит две системы CRISPR-Cas: полные кластеры типа I-G и I-E (Cas1, Cas2, Cas3, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas11), что может обеспечивать повышенную устойчивость к инородной ДНК.

У штамма FNCPS 828 идентифицирована неполная система CRISPR-Cas типа I-G: отсутствует бе-

лок Cas2, участвующий во встраивании новых спайсеров в CRISPR-массив. При этом присутствуют остальные ключевые компоненты.

Всего в пяти штаммах *P. freudenreichii* идентифицировано 326 уникальных спайсеров. Для поиска возможных мишеней систем CRISPR-Cas проведено выравнивание выявленных спайсеров на ранее опубликованные геномы 575 бактериофагов, заражающих бактерии, используемые в молочной промышленности. В результате анализа обнаружены совпадения 69 спайсеров (21%) с геномами девяти различных фагов, все из которых инфицируют пропионовокислые бактерии (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты анализа пяти филогенетически близких штаммов *P. freudenreichii*, имеющих выраженные фенотипические различия. Так, несмотря на высокую степень геномной идентичности ($\text{orthoANI} > 99.9$), штаммы *P. freudenreichii* FNCPS 2 и FNCPS 3 существенно различались по ряду фенотипических признаков. *P. freudenreichii* FNCPS 2 отличался стабильной и высокой газообразующей активностью как в стандартной среде, так и при добавлении молочного гидролизата, в то время как FNCPS 3 образовывал газ только в присутствии гидролизата. Оба штамма группировались в один кластер по метаболическому профилю, что указывает на адаптацию к среде их общего происхождения. Однако FNCPS 3 не утилизировал *L*-арabinозу, *D*-раффинозу и глицерин – соединения, потенциально присутствующие в молочной среде, тогда как FNCPS 2 метаболизировал наибольшее число субстратов, что согласуется с его выраженной газообразующей активностью. Ранее было показано, что интенсивность газообразования у *P. freudenreichii* напрямую связана с доступностью метаболитов, прежде всего лактата: при исчерпании питательных источников уровень ферментации и выделение CO_2 снижаются [30]. Кроме того, использование таких углеродных субстратов, как лактоза сыворотки и глицерин, влияет на ферментацию и газообразование *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*, что подтверждает зависимость данного процесса от типа и разнообразия источников питания [31, 32]. Таким образом, различия в метаболизме легкоусвояемых источников углерода, вероятно, могут объяснить наблюдаемые различия в уровне газообразования между штаммами [33].

Последние исследования показывают, что традиционное разделение *P. freudenreichii* на подвиды *freudenreichii* и *shermanii*, основанное на способности ферментировать лактозу и восстанавливать нитраты, не отражает фактического генетическо-

го и фенотипического разнообразия этого вида. Описаны штаммы с различными комбинациями указанных признаков [24, 34], а филогенетический анализ методом MLST не выявил четкой кластеризации, соответствующей существующей классификации на подвиды [34]. Недавняя переклассификация на основе фенотипа показала, что более 45% исследованных штаммов не могут быть отнесены ни к одному из подвидов [24]. Кроме того, вероятно, некоторые штаммы ошибочно классифицированы как не восстанавливающие нитрат вследствие недостаточной длительности инкубации [24]. В этой связи актуальной становится разработка генетических маркеров для корректного разграничения подвидов и предсказания фенотипа.

Штамм FNCPS 828 демонстрировал высокую филогенетическую близость к типовому штамму *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* CCUG 36819 (ESK = 0.99948), был способен к метаболизму лактозы, но при этом не обладал полным набором генов, необходимых для восстановления нитратов. Единственным вариабельным геном, связанным с этой способностью у штаммов *P. freudenreichii*, оказался *narG*, кодирующий альфа-субъединицу дыхательной нитратредуктазы, что делает его потенциальным маркером для определения подвида.

На данный момент системам защиты *P. freudenreichii* посвящено ограниченное число исследований. Наиболее распространенным защитным механизмом у бактерий является система рестрикции-модификации [35], выявленная также у *P. freudenreichii* [36]. Ранее сообщалось, что у этих бактерий наиболее распространена система CRISPR-Cas типа I-G, встречается также тип I-E [37]. Анализ 112 штаммов *P. freudenreichii*, проведенный в нашем исследовании, подтвердил преобладание системы типа I-G, в то время как тип I-E представлен примерно у 25% штаммов. Кроме того, установлено, что системы *AbiE*, *PD-T4-6* и системы рестрикции-модификации типа I и IV встречаются более чем у 90% исследованных штаммов.

Все пять штаммов, проанализированных в нашем исследовании, содержали систему CRISPR-Cas типа I-G. У штамма FNCPS 828 эта система оказалась неполной – отсутствовал ген, кодирующий белок Cas2. Штамм FNCPS 3, помимо системы типа I-G, имел также дополнительную систему CRISPR-Cas типа I-E. Этот штамм также отличался наибольшим числом спайсерных последовательностей, включая максимальное количество спайсеров, мишени которых соответствовали ранее описанным фагам пропионовокислых бактерий. Ранее сообщалось, что штаммы *P. freudenreichii* содержат спайсеры к фагам B22, Anatole, E1, Doucette, E6, G4 и B3

[38]. В нашем исследовании только штамм FNCPS 3 имел спайсеры ко всем ранее описанным фагам, за исключением E1, а также содержал дополнительные спайсеры к фагам B5, PFR1 и PFR2, что отражает значительное вирусное давление в процессе коэволюции штамма с бактериофагами. Кроме систем CRISPR-Cas, у всех штаммов были выявлены наиболее распространенные у *P. freudenreichii* защитные механизмы, а также менее изученные комплексы НЕС-05 и ietaS, что свидетельствует о многоуровневой системе антивирусной защиты у представителей данного вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе проанализированы как общие черты, так и внутривидовое разнообразие штаммов *P. freudenreichii*, что имеет непосредственное значение для молочной промышленности. Различия в газообразующей активности, спектре метаболизируемых субстратов и системах бактериальной защиты отражают адаптацию штаммов к различным технологическим условиям и подчеркивают необхо-

димость их целенаправленного подбора для оптимизации заквасочных культур. Выявление гена *narg* как потенциального маркера восстановления нитратов, а также описание разнообразия защитных систем, включая CRISPR-Cas, открывают перспективы для более точной типизации штаммов и прогнозирования их технологических свойств. Эти результаты формируют основу для разработки заквасок с повышенной стабильностью, предсказуемыми характеристиками и устойчивостью к бактериофагам, что в конечном счете способствует созданию более надежных и функциональных промышленно значимых культур, адаптированных к специфике конкретных процессов ферментации. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (грант № 075-15-2024-483).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- de Rezende Rodovalho V, Rodrigues DLN, Jan G, Le Loir Y, de Carvalho Azevedo VA, Guédon E. Propionibacterium freudenreichii: General characteristics and probiotic traits. *Prebiotics and Probiotics-From Food to Health*. Published online 2021.
- Turgay M, Falentin H, Irmler S, et al. Genomic rearrangements in the *aspA-dcuA* locus of *Propionibacterium freudenreichii* are associated with aspartase activity. *Food Microbiol*. 2022;106:104030.
- Loux V, Mariadassou M, Almeida S, et al. Mutations and genomic islands can explain the strain dependency of sugar utilization in 21 strains of *Propionibacterium freudenreichii*. *BMC Genomics*. 2015;16(1):296.
- Piwowarek K, Lipińska E, Hać-Szymańczuk E, Kieliszek M, Kot AM. Sequencing and analysis of the genome of *Propionibacterium freudenreichii* T82 strain: Importance for industry. *Biomolecules*. 2020;10(2):348.
- Coronas R, Zara G, Gallo A, et al. Propionibacteria as promising tools for the production of pro-bioactive scotta: A proof-of-concept study. *Front Microbiol*. 2023;14:1223741.
- Gautier M, Rouault A, Sommer P, Briandet R. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss cheese. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(7):2572-2576.
- Cheng L, Marinelli LJ, Grosset N, et al. Complete genomic sequences of *Propionibacterium freudenreichii* phages from Swiss cheese reveal greater diversity than *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) acnes phages. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):19.
- Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Krobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2020;70(1):e102.
- Langdon WB. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min*. 2015;8:1-7.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079.
- Walker BJ, Abeel T, Shea T, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*. 2014;9(11):e112963.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075.
- Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Gene Prediction: Methods and Protocols*. Published online 2019:227-245.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(14):6614-6624. doi:10.1093/nar/gkw569
- Olson RD, Assaf R, Brettin T, et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D678-D689. doi: 10.1093/nar/gkac1003
- Brettin T, Davis JJ, Disz T, et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep*. 2015;5(1):8365. doi: 10.1038/srep08365
- Payne LJ, Meaden S, Mestre MR, et al. PADLOC: a web server for the identification of antiviral defence systems in microbial genomes. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(W1):W541-W550. doi: 10.1093/nar/gkac400
- Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, et al. CRISPR-CasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W246-W251. doi:10.1093/nar/gky425
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357-359.
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinfor-*

- matics.* 2016;32(6):929-931. doi: 10.1093/bioinformatics/btv681
21. Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(2):1100-1103. doi: 10.1099/ijsem.0.000760
22. Atasever M, Mazlum H. Biochemical Processes During Cheese Ripening. *Veterinary Sciences and Practices.* 2024;19(3):174-182.
23. Shu L, Wang Q, Jiang W, et al. The roles of diol dehydratase from pdu operon on glycerol catabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol.* 2022;157:110021.
24. de Freitas R, Madec MN, Chuat V, et al. New insights about phenotypic heterogeneity within *Propionibacterium freudenreichii* argue against its division into subspecies. *Dairy Sci Technol.* 2015;95(4):465-477. doi: 10.1007/s13594-015-0229-2
25. Lledó B, Martínez-Espinosa RM, Marhuenda-Egea FC, Bonete MJ. Respiratory nitrate reductase from haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: biochemical and genetic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 2004;1674(1):50-59.
26. Maske BL, de Melo Pereira GV, da Silva Vale A, Souza DSM, Lindner JDD, Soccol CR. Viruses in fermented foods: Are they good or bad? Two sides of the same coin. *Food Microbiol.* 2021;98:103794.
27. Payne LJ, Hughes TCD, Fineran PC, Jackson SA. New antiviral defences are genetically embedded within prokaryotic immune systems. *bioRxiv.* Published online 2024:2021-2024.
28. Gao L, Altae-Tran H, Böhning F, et al. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. *Science (1979).* 2020;369(6507):1077-1084.
29. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):67-83.
30. Aburjaile FF, Rohmer M, Parrinello H, et al. Adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* to long-term survival under gradual nutritional shortage. *BMC Genomics.* 2016;17(1):1007. doi: 10.1186/s12864-016-3367-x
31. Kosmider A, Drozdzynska A, Blaszka K, Leja K, Czacyk K. Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* using crude glycerol and whey lactose industrial wastes. *Pol J Environ Stud.* 2010;19(6):1249-1253.
32. de Assis DA, Machado C, Matte C, Ayub MAZ. High cell density culture of dairy *propionibacterium* sp. and *acidipropionibacterium* sp.: A review for food industry applications. *Food Bioproc Tech.* 2022;15(4):734-749.
33. Dank A, Abee T, Smid EJ. Expanded metabolic diversity of *Propionibacterium freudenreichii* potentiates novel applications in food biotechnology. *Curr Opin Food Sci.* 2023;52:101048.
34. Dalmasso M, Nicolas P, Falentin H, et al. Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int J Food Microbiol.* 2011;145(1):113-120.
35. Georjon H, Bernheim A. The highly diverse antiphage defence systems of bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(10):686-700.
36. Deptula P, Laine PK, Roberts RJ, et al. De novo assembly of genomes from long sequence reads reveals uncharted territories of *Propionibacterium freudenreichii*. *BMC Genomics.* 2017;18(1):790.
37. Fatkulina AA, Chuksina TA, Sorokina NP, et al. Comparative Analysis of Spacer Targets in CRISPR-Cas Systems of Starter Cultures. *Acta Naturae.* 2024;16(4):81-85.
38. Bücher C, Burtscher J, Domig KJ. Propionic acid bacteria in the food industry: An update on essential traits and detection methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2021;20(5):4299-4323.

УДК 579.6:577.21:637.05

Комплексная характеристика пяти штаммов *Lactococcus*: от фенотипических свойств к геномным особенностям

И. Д. Антипенко^{1*}, Н. П. Сорокина², И. В. Кучеренко², Е. В. Кураева², Е. С. Масежная², М. Ю. Шкурников¹

¹Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», факультет биологии и биотехнологии, лаборатория исследований молекулярных механизмов долголетия, Москва, 101000 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Углич, 109316 Россия

*E-mail: iantipenko@hse.ru

Поступила в редакцию 16.07.2025

Принята к печати 21.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27747

РЕФЕРАТ Эффективность ферментации молочных продуктов зависит от характеристик молочнокислых бактерий, прежде всего от их метаболической активности и устойчивости к бактериофагам, поэтому важно понимать связь между генетическими и фенотипическими особенностями штаммов, используемых в промышленности. Нами проведен комплексный анализ пяти широко применяемых в России штаммов *Lactococcus* с использованием полногеномного секвенирования и оценки фенотипических свойств. Несмотря на генетическое сходство четырех штаммов *L. lactis*, выявлены значительные различия в их метаболической активности. Сравнение структуры ранее опубликованных геномов 337 штаммов *L. lactis* и 147 штаммов *L. cremoris* выявило отсутствие гена *lacZ* у *L. cremoris*, что указывает на видоспецифичные особенности метаболизма лактозы. Важно отметить, что у трех из пяти исследованных штаммов было выявлено наличие профагов, что коррелировало с пониженной кислотообразующей активностью. Штаммы *L. lactis* FNCPS 51n и 73p были устойчивыми ко всем 50 протестированным бактериофагам, что может быть связано с наличием системы abortивной инфекции *AbiB*. Полученные данные подчеркивают значимость интеграции геномного и фенотипического анализа при отборе эффективных и устойчивых стартовых культур *Lactococcus* для молочной промышленности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Lactococcus*, ферментация, профилирование генома, профаги, стартовые культуры, бактериофаги.

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Lactococcus*, способные эффективно метаболизировать лактозу в молочную кислоту, входят в число ключевых микроорганизмов, используемых в производстве ферментированных молочных продуктов [1].

В молочной промышленности наибольшее распространение получили *L. lactis* и относительно недавно выделенный в самостоятельный вид *L. cremoris* [2]. Эти виды различаются наличием генов, связанных с метаболизмом углеводов и аминокислот [3], а также механизмами ответа на стресс [4].

Промышленно значимые различия выявлены и на внутривидовом уровне. Так, в пределах

подвида *L. lactis* subsp. *lactis* выделяют биовар *diacetylactis*, обладающий способностью метаболизировать цитрат с образованием диацетила — соединения, придающего продукту характерный маслянисто-сливочный аромат [5], который является важным компонентом аромата сыров типа Камамбер, Эмменталь и Чеддер [6]. Комбинации штаммов для ферментации подбирают с учетом типа продукта: для кисломолочных изделий чаще используют *diacetylactis* и *L. cremoris*, тогда как *L. lactis* subsp. *lactis* применяется в сыроделии [7]. При этом показано, что скорость ферментации при использовании лактококковых заквасок в большей степени зависит от индивидуальных ха-

рактеристик штамма, нежели от его видовой принадлежности [8].

Разнообразие технологически значимых признаков у *Lactococcus* формировалось в результате эволюционных процессов и горизонтального переноса генов, включая плазмиды, несущие гены, связанные с метаболизмом сахаров, синтезом ароматических соединений и устойчивостью к бактериофагам [9]. В разных странах и регионах используют как коммерческие, так и местные штаммы молочнокислых бактерий (МКБ), отобранные либо на основе длительной традиции применения, либо благодаря уникальным технологическим свойствам [10].

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ пяти штаммов *Lactococcus*, широко применяемых в России в производстве ферментированных молочных продуктов. Охарактеризованы метаболические и генетические особенности этих штаммов, включая устойчивость к бактериофагам, а также выявлены признаки, определяющие их технологическую ценность.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и условия культивирования

В работе использовали пять штаммов: *L. cremoris* FNCPS 23 (GCA_044990555.1), *L. lactis* FNCPS 51_n, 43_n, 81_n и 73_n (GCA_044990575.1, GCA_044990535.1, GCA_044990605.1, GCA_044990625.1), из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института маслоделия и сыроделия (ВНИИМС, филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН). Штаммы 81_n и 43_n были выделены из автохтонной сметаны, остальные — из молока. Все штаммы были получены из продуктов на территории Ярославской области, Россия, за исключением штамма *L. cremoris* FNCPS 23, выделенного из образца, поступившего из Литвы.

Фенотипическая характеристика

Динамику роста определяли с помощью спектрофотометрии, применяя фотоэлектрический фотометр КФК-3-ЗОМЗ (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия). Штаммы культивировали в стерильном 10% восстановленном обезжиренном молоке при 30°C с добавлением 1% инокулята 16-часовой культуры. Оптическую плотность (OD) измеряли на длине волн 560 нм с интервалом 60 мин в течение 10 ч.

Для определения предельной титруемой кислотности в стерильное 10% восстановленное обезжиренное молоко добавляли 0.1% 16-часовой культуры лактобактерий и инкубировали при 30 ± 1°C в течение

7 сут. Кислотность определяли титрованием раствором NaOH с использованием прибора Titrette, 50 мл (Brand, Германия), согласно ранее описанному методу [11] и выражали в градусах Тернера (°Т).

Величину pH измеряли в стерильном 10% восстановленном обезжиренном молоке до ферментации (контрольное значение pH 6.53), а также во время ферментации в контрольных точках с использованием цифрового pH-метра STARTER 2100 (Ohaus, Швейцария).

Коагуляционную активность оценивали по способности штамма образовывать сгусток в 10% восстановленном обезжиренном молоке с 0.015% лактуса. Для этого в стерильное лактусовое молоко вносили инокулят каждого штамма в трех повторах. Образование сгустка и изменение окраски лактуса (восстановление) оценивали ежечасно при инкубации при температуре 30 и 40°C [12].

Образование ацетоина и диацетила определяли с использованием теста Фогеса–Проскауэра: 48-часовую культуру смешивали с 30% KOH, интенсивность окрашивания оценивали по 5-балльной шкале.

Анализ липидических профилей бактериофагов

Липидический спектр бактериофагов определяли методом культивирования на двухслойном агаре в чашках Петри [13]. Чувствительность к бактериофагам оценивали по наличию или отсутствию зоны просветления в месте нанесения фага.

Секвенирование генома

ДНК для секвенирования генома выделяли с использованием набора ExtractDNA Blood and Cells («ЕвроГен», Россия) согласно инструкциям производителя. Библиотеки ДНК подготавливали с помощью набора MGIEasy Fast FS DNA Library Prep Set V2.0 (Cat. No. 940-001196-00, MGI) согласно протоколу производителя. Качество библиотек оценивали с использованием набора для анализа ДНК Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (Cat. No. Q33230, Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США). Длину фрагментов библиотек ДНК оценивали с помощью капиллярного гель-электрофореза QIAxcel Advanced с использованием набора QX DNA Fast Analysis Kit (Cat. No. 929008, Qiagen). Секвенирование проводили с использованием проточной ячейки FCS на платформе MGI DNBSEQ-G50 (BGI, Китай) в режиме PE150.

Сборку бактериальных геномов выполняли с использованием SPAdes [14] в режиме isolate. Для повышения качества итоговой сборки сырые прочтения выравнивали на контиги при помощи Bowtie2 [15], после чего файлы выравнивания были отсо-

Таблица 1. Общие характеристики геномов исследованных штаммов *Lactococcus*

Параметр характеристики	<i>L. lactis</i> FNCPS 73n	<i>L. lactis</i> FNCPS 51n	<i>L. lactis</i> FNCPS 43n	<i>L. lactis</i> FNCPS 81n	<i>L. cremoris</i> FNCPS 23
Размер генома, п.н.	3110896	2258993	3084214	2963565	2528857
GC-состав, %	34.91	35.52	34.97	35.35	35.78
тРНК	75	44	57	60	53
рРНК	8	5	7	8	5
Гипотетические белки	965	720	907	1,121	765
Белки с установленной функцией	3349	2575	3292	3649	2224
CRISPR-локус	-	1	1	-	9
Белок Cas	-	-	-	-	-
Профаги	-	+	+	-	+
Плазмиды	repUS33	repUS4, rep32	repUS33, repUS4	repUS33	repUS33

Таблица 2. Фенотипические характеристики исследуемых штаммов

Штамм	Коагуляционная активность				Предельная кислотность, °Т	Образование диацетила, баллы		
	при 30°C, ч		при 40°C, ч					
	Восстановление лакмуса	Свертывание	Восстановление лакмуса	Свертывание				
<i>L. lactis</i> 73n	8	8	8	8	98	-		
<i>L. lactis</i> 81n	6	9	6	11	96	-		
<i>L. lactis</i> 51n	10	16	9	11	98	4/5		
<i>L. lactis</i> 43n	12 неполное	12	13	13	90	5/5		
<i>L. cremoris</i> 23	13	14	-	-	88	-		

рированы и проиндексированы с использованием инструментов SAMtools [16] и переданы в Pilon [17] для исправления неточностей сборки. Качество сборки оценивали с помощью QUAST [18], полноту собранных геномов оценивали с использованием BUSCO [19].

Анализ геномов

Аннотацию геномов и функциональный анализ проводили с использованием конвейера аннотации прокариотических геномов NCBI [20], BlastKOALA [21] и платформы BV-BRC [22]. Анализ наличия генов метаболизма в геномах штаммов рода *Lactococcus* осуществляли с помощью платформы BV-BRC на основе высококачественных, общедоступных полных сборок геномов: *L. lactis* ($n = 337$) и *L. cremoris* ($n = 147$). Профаги в бактериальных геномах выявляли с использованием инструмента PHASTEST с настройками глубокого поиска [23]. Системы защиты бактерий выявляли с помощью веб-инструмента DefenseFinder (v2.0.0, база моделей v2.0.2) [24]. Результаты, основанные на HMMER, фильтровали по критериям: $i\text{-value} \leq 1\text{e-}5$, покрытие профиля

последовательности $\geq 70\%$, покрытие целевой последовательности $\geq 70\%$.

Дополнительно спайсеры и компоненты системы CRISPR-Cas выявляли с использованием CRISPRCasFinder [25]. Плазмиды идентифицировали с использованием PlasmidFinder v2.0.1 (база данных: 2020-07-13) с порогами $\geq 95\%$ идентичности и $\geq 60\%$ покрытия [26].

Филогенетический анализ

Филогенетическую идентификацию и определение близкородственных штаммов проводили с помощью анализа корреляции тетрануклеотидов через веб-сервис JSpeciesWS [27]. Сравнение средней нуклеотидной идентичности (ANI) выполняли с использованием алгоритма OrthoANI [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая геномная характеристика

Характеристики геномных последовательностей пяти анализируемых штаммов приведены в табл. 1. Они оказались схожими с опубликованными характеристиками штаммов соответствующих видов МКБ.

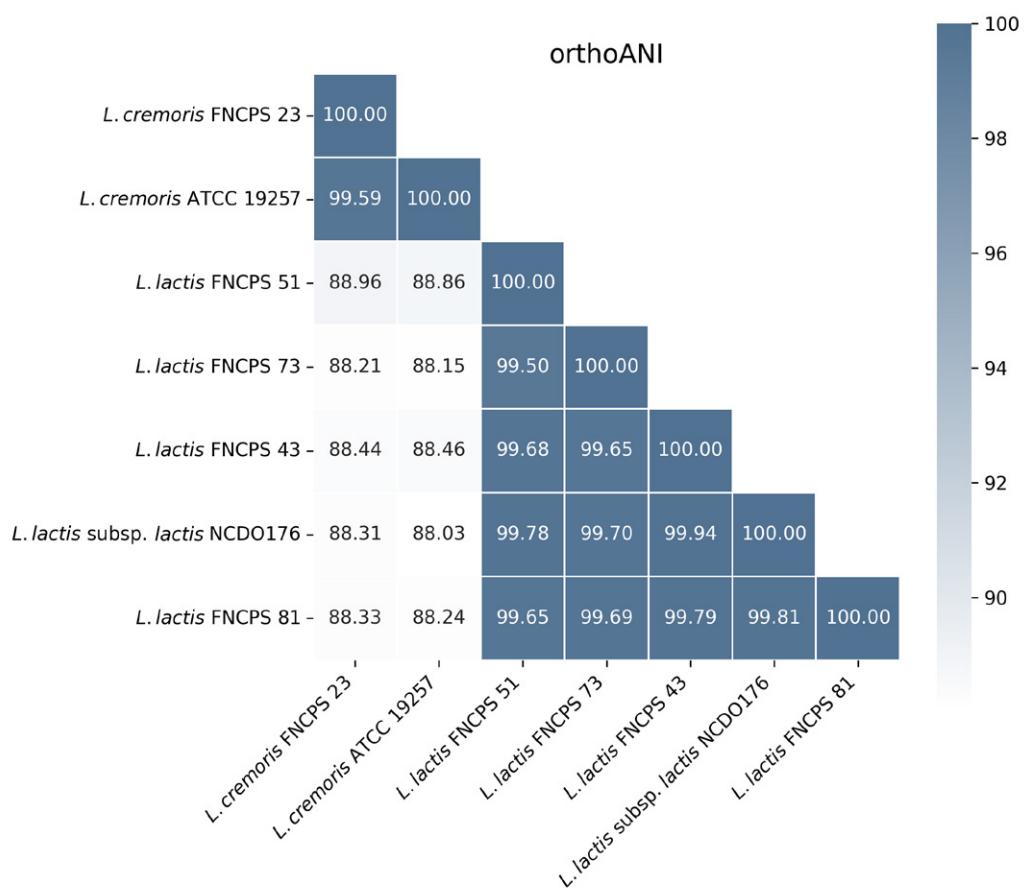


Рис. 1. Термальная карта средней нуклеотидной идентичности ортологичных генов (orthoANI). Приведен процент средней нуклеотидной идентичности ортологичных генов разных штаммов. Значения на диагонали (100%) соответствуют идентичности каждого штамма самому себе

Четыре штамма были отнесены к *L. lactis*, один – к *L. cremoris*. Ближайшими типовыми геномами были *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO176 (Z-score > 0.996) для *L. lactis* и *L. cremoris* ATCC 19257 (Z-score = 0.998) для *L. cremoris*. Анализ OrthoANI показал высокое сходство геномов штаммов *L. lactis* (>99.5%), что указывает на близкое родство (рис. 1). Штамм *L. cremoris* имел низкие значения ANI (88–89%) по сравнению с *L. lactis*, что подтверждает его отдельный видовой статус.

Фенотипирование штаммов

Результаты фенотипических тестов исследуемых штаммов представлены в табл. 2.

Рост исследуемых штаммов оценивали по изменению оптической плотности (OD) в процессе культивирования. Штаммы *L. lactis* 73n, 81n и 51n демонстрировали сходные темпы роста, в то время как *L. lactis* 43n и *L. cremoris* 23 росли медленнее. Через 7 ч после начала эксперимента OD достигала плато, что может указывать на завершение активной фазы роста (рис. 2A).

Различия между штаммами также проявлялись в предельной кислотности: наименьшими значениями были у *L. lactis* 43n и *L. cremoris* 23 (табл. 2).

Аналогичная картина наблюдалась при измерении pH: наибольшим снижение pH среды культивирования было у штаммов *L. lactis* 73n и 81n, тогда как минимальное закисление среды к последнему этапу культивирования отмечено у *L. lactis* 43n (рис. 2Б).

Оценка коагуляционной активности при 30 и 40°C (табл. 2) подтвердила высокую метаболическую активность *L. lactis* 73n и 81n: восстановление лакмуса происходило за 6–8 ч, свертывание молока – за 8–11 ч при обеих температурах. *L. lactis* 51n демонстрировал температурную зависимость: при 40°C коагуляция наступала на 5 ч раньше, чем при 30°C. *L. lactis* 43n и *L. cremoris* 23 проявили наименьшую активность: свертывание происходило через 12–14 ч, при этом у 43n восстановление лакмуса было неполным. У штамма *L. cremoris* 23 при 40°C коагуляция и восстановление лакмуса не наблюдались.

Анализ генов метаболизма

Протеолитическая система и катаболизм аминокислот. Эффективный рост МКБ в молоке требует расщепления белков, особенно казеина, составляю-

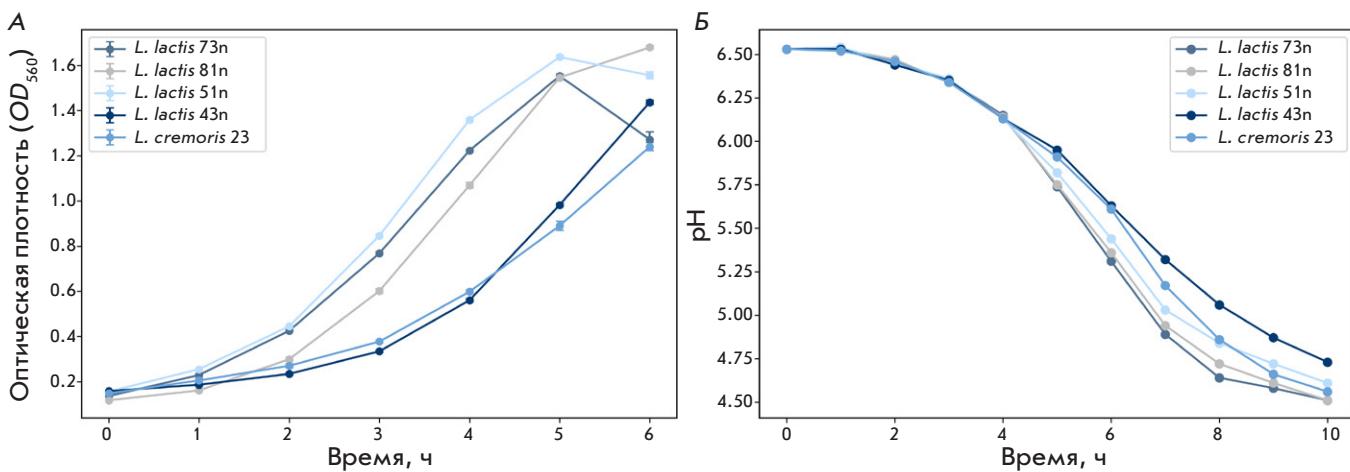


Рис. 2. А – динамика оптической плотности культуральной жидкости при инкубации исследуемых штаммов. Б – изменение pH культуральной жидкости в процессе культивирования тех же штаммов

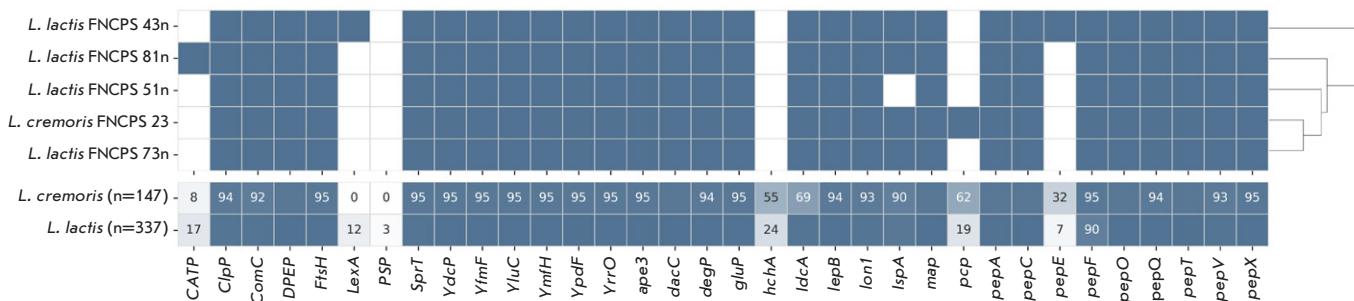


Рис. 3. Наличие генов протеолитических ферментов у представителей *L. lactis* ($n = 337$) и *L. cremoris* ($n = 147$), а также в пяти исследуемых штаммах. Верхняя панель представляет бинарную матрицу: синий цвет – наличие гена, белый – его отсутствие. Нижняя панель показывает процентное присутствие каждого гена в популяции; числовые значения указаны только для генов, встречающихся которых составляет менее 95% от общего числа штаммов. Штаммы сгруппированы по сходству их протеолитических геномных профилей; результаты кластеризации представлены в виде дендрограммы

щего около 80% всех белков молока [29]. Молекула казеина обогащена остатками пролина, что делает ее доступной для казеинолитических протеаз. У *Lactococcus* описаны два типа внеклеточных протеиназ – PI и PIII, различающихся специфичностью к фракциям казеина [29]. Лактоцепин I (PI) преимущественно гидролизует β -казеин, образуя более 100 олигопептидов длиной 4–30 аминокислотных остатков. PIII обладает более широкой специфичностью, он расщепляет $\alpha s1$ -, β - и κ -казеин. При этом у половины промышленных штаммов *L. lactis* ген *prtP*, кодирующий эти ферменты, отсутствует [30].

Ген *prtP* найден у трех из пяти исследованных штаммов: *L. cremoris* 23, *L. lactis* 51n и 81n. Белки *L. cremoris* 23 и *L. lactis* 51n показали высокую идентичность (97%), тогда как у *L. lactis* 81n обнаружена делеция из 427 аминокислот, что снизи-

ло идентичность до 76.6–77.2%. Все белки классифицированы как протеиназы типа PI. Сравнение с эталонной протеиназой типа PI (PrtP, P16271) показало 97.8% идентичности у *L. cremoris* 23, 95.9% – у *L. lactis* 51n и 74.9% – у *L. lactis* 81n.

Пептиды, образующиеся при расщеплении казеина, транспортируются в клетку с участием систем Opp, DtpT и Dpp [31], гены которых представлены у всех пяти штаммов. В цитоплазме пептиды расщепляются экзо- и эндопротеазами [29]. Сравнительный анализ геномов показал сходный профиль наличия генов протеаз у всех пяти штаммов, соответствующий общему паттерну для рода *Lactococcus* (рис. 3).

Основные различия между видами *L. cremoris* и *L. lactis* заключались в частоте встречаемости генов пирролидонкарбоксилатпептидазы (*pcp*, [ЕС

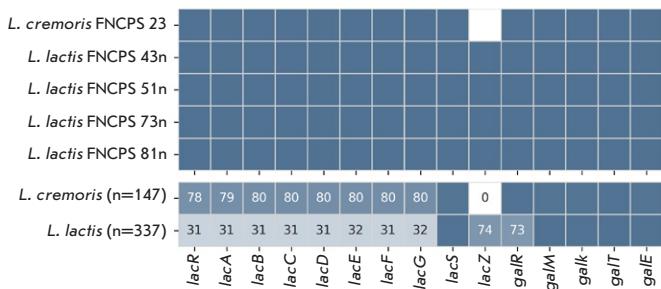


Рис. 4. Гены метаболизма лактозы у представителей *L. lactis* ($n = 337$) и *L. cremoris* ($n = 147$), а также у пяти исследуемых штаммов. Верхняя панель представляет бинарную матрицу: синий цвет – наличие гена, белый – его отсутствие. Нижняя панель показывает процентное присутствие каждого гена в популяции; числовые значения указаны только для генов, встречаемость которых составляет менее 95% от общего числа штаммов

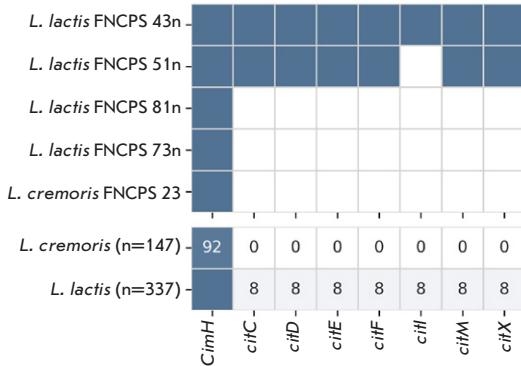


Рис. 5. Гены метаболизма цитрата у представителей *L. lactis* ($n = 337$) и *L. cremoris* ($n = 147$), а также у пяти исследуемых штаммов. Верхняя панель представляет бинарную матрицу: синий цвет – наличие гена, белый – его отсутствие. Нижняя панель показывает содержание (%) каждого гена в популяции; числовые значения указаны только для генов, встречаемость которых не превышает 95% от общего числа штаммов

3.4.19.3]) и пептидазы E (*pepE*), которые, согласно базе UniProt, локализуются в плазмidaх. Ген *rcp* найден у 62% штаммов *L. cremoris* и только у 19% *L. lactis*, тогда как *pepE* – у 32% *L. cremoris* и 7% *L. lactis*. Напротив, гены САТР (белок семейства аминоконцевых протеаз СААХ) и *LexA* чаще встречались у *L. lactis* (17 и 12% соответственно), чем у *L. cremoris* (8 и 0% соответственно).

Анализируемые штаммы различались наличием пяти генов протеолитических ферментов. Так, у штамма *L. cremoris* 23 обнаружен ген *rcp*,

у штамма *L. lactis* 81n – *CATP*, у *L. lactis* 43n – *LexA* и *pepE*, а у штамма 51n отсутствовал ген *lspA*, кодирующий сигнальную липопротеинпептидазу.

Метаболизм лактозы. Лактоза является основным источником углерода в молоке для МКБ. Метаболизм лактозы и галактозы происходит с использованием пути Лелуара и тагатозо-6-фосфатного пути [32]. Анализ штаммов *L. lactis* показал, что 31% (104 из 337) из них содержат все гены тагатозо-6-фосфатного пути, в отличие от 78% (115 из 147) штаммов *L. cremoris*. Все пять исследованных штаммов также содержали полный набор соответствующих генов (рис. 4).

Ключевым ферментом пути Лелуара является β -галактозидаза *LacZ*, катализирующая расщепление лактозы на глюкозу и галактозу. Ген *lacZ* не найден во всех геномах *L. cremoris*, включая штамм FNCPS 23, но идентифицирован в 74% штаммов *L. lactis*, включая все четыре исследованных штамма этого вида (рис. 4).

Метаболизм цитрата. Среди исследованных штаммов диацетил продуцировали только *L. lactis* 43n и 51n, причем 43n имел более высокую активность (табл. 2). Генетический анализ выявил гены, отвечающие за метаболизм цитрата, исключительно у этих двух штаммов (рис. 5). У всех представителей *L. cremoris* отсутствовали соответствующие гены. В целом, они были выявлены лишь в 8% (28 из 337) штаммов *L. lactis*, что указывает на ограниченное распространение биовара *diacetylactis*.

Устойчивость к бактериофагам

Бактериофаги – частая причина нарушений ферментации молочных продуктов, приводящая к экономическим потерям [33]. ДНК фагов, специфичных к *Lactococcus* и *Streptococcus*, обнаружена в 37% образцов молока, предназначенного для ферментации [34], что делает оценку фагоустойчивости важным этапом при подборе используемых штаммов.

На рис. 6 представлены результаты тестирования 50 бактериофагов (отображены только те, которые вызывали лизис хотя бы одного из штаммов). Штаммы *L. lactis* 73n и 51n продемонстрировали устойчивость ко всем фагам. Штаммы 81n, 43n и *L. cremoris* 23 оказались чувствительными к отдельным бактериофагам, сохраняя при этом устойчивость к другим.

Поскольку различия в устойчивости к фагам могут быть связаны с вариабельностью фаг-специфичных защитных систем, кодируемых геномами бактерий, провели анализ с использованием DefenseFinder (рис. 7). Единственной системой, общей для всех штаммов, оказалась *Dnd* – механизм

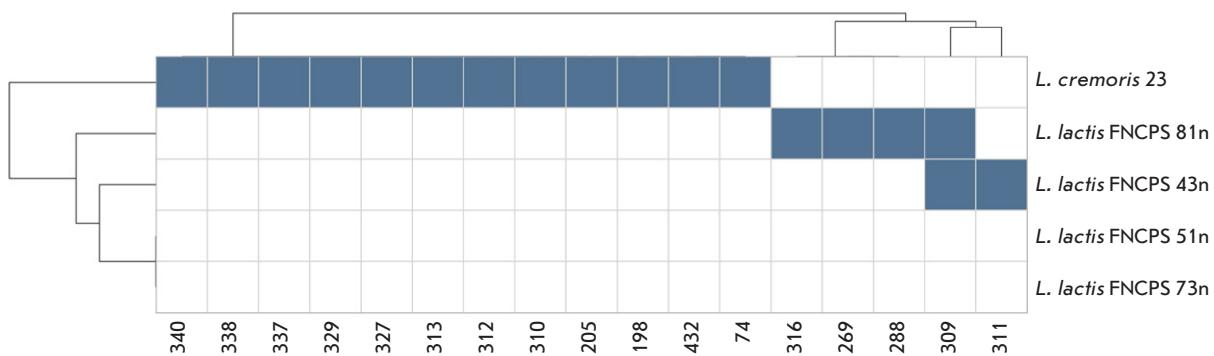


Рис. 6. Литический спектр взаимодействия бактериофагов с исследуемыми штаммами. Указаны названия бактериофагов. Синий цвет ячейки – чувствительность штамма к соответствующему фагу; белый цвет – отсутствие литического эффекта. Штаммы и бактериофаги сгруппированы по сходству их литических профилей; результаты кластеризации представлены в виде дендрограммы

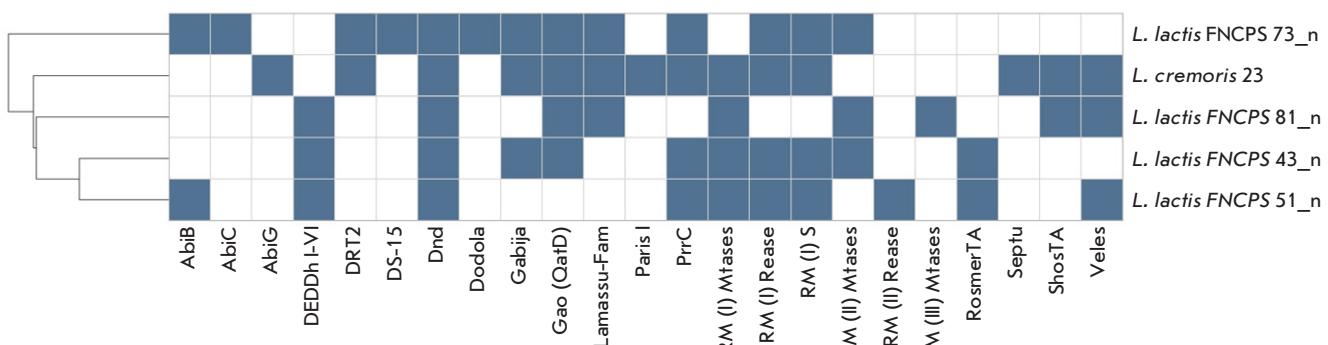


Рис. 7. Профиль систем бактериального иммунитета у исследованных штаммов. Приведены наименования систем устойчивости исследуемых штаммов. Синие ячейки указывают на наличие соответствующих генов, белые – на их отсутствие. Штаммы сгруппированы по сходству в представленности генов систем бактериальной защиты; результаты кластеризации представлены в виде дендрограммы

врожденного иммунитета, основанный на фосфоротиоатных модификациях ДНК [35].

Система AbiB выявлена только у устойчивых штаммов. У *L. lactis* 73n дополнительно обнаружены AbiC, DS-15 и Dodola. У *L. lactis* 51n выявлена уникальная система рестрикции-модификации (RM) II типа, отсутствующая у других штаммов. Штамм *L. lactis* 81n оказался наиболее чувствительным к фаговой инфекции (4/50 фагов вызывали лизис). У этого штамма отсутствовали гены рестриктазы и субъединицы S системы RM типа I, а также системы PrrC, что может объяснять его чувствительность к фагам. Наибольшую чувствительность показал *L. cremoris* 23, лизируемый 12 фагами, не активными в отношении других штаммов. При этом не выявлено ни одной защитной системы, представленной у всех *L. lactis*, но не найденной у *L. cremoris* 23, что может указывать на участие структуры клеточной стенки в восприимчивости к фаговой инфекции [36].

Гены Cas (I–IV типа) не обнаружены, однако CRISPR-спейсеры присутствовали во всех геномах, кроме *L. lactis* 81n и 73n.

Детекция профагов

Анализ геномов выявил фаговые нуклеотидные последовательности, что указывает на присутствие профагов в большинстве исследованных штаммов. У штаммов *L. lactis* 73n и 81n вставки фаговых последовательностей не обнаружены, что свидетельствует об отсутствии интегрированных профагов.

В геноме *L. cremoris* 23 найдены два контига с фаговыми генами: один (33.5 т.п.н.) сходен с PHAGE_Lactoc_62503, другой (8.1 т.п.н.) – с PHAGE_Lactoc_b1L309. Эти контиги содержат 40 и 11 кодирующих последовательностей при GC-содержании 35.04–35.29%. Вероятно, первый фрагмент представляет собой функциональный профаг, тогда как второй – остаточную неактивную вставку.

Геном *L. lactis* 51n включает четыре контига с фаговыми последовательностями (2.8–7.3 т.п.н., суммарно около 22 т.п.н.), схожие с фагами bIL312, bIL309, D4410 и bIL286. Эти участки могут быть либоrudиментарными остатками, либо частями одного профага, разделенного при сборке генома.

В *L. lactis* 43n обнаружено шесть фагосодержащих контигов, крупнейшие из которых достигают 13.5 т.п.н. (общая длина около 44 т.п.н.). Найдены последовательности, сходные с фагами bIL312, bIL285, bIL309, а также 98201, bIL311 и BK5_T. Фаговые белки синтезируются с обеих цепей ДНК, что указывает на двухцепочечный характер фагового генома.

Поскольку ни один из фрагментов фаговой ДНК в штаммах *L. lactis* 43n и *L. lactis* 51n не был интегрирован в контиг, содержащий бактериальные гены, можно предположить, что обнаруженные последовательности представляют собой не интегрированные в геном профаги, а ДНК фагов, попавших в образец на этапе культивирования.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе охарактеризованы пять промышленных штаммов рода *Lactococcus*. Геномный анализ выявил высокое сходство между штаммами *L. lactis*, свидетельствующее об их клonalном происхождении, в то время как *L. cremoris* 23 был таксономически обособлен. Несмотря на близкое родство, штаммы различались своей метаболической активностью: *L. lactis* 73n и 81n характеризовались высокой скоростью роста и продукцией кислот, тогда как *L. lactis* 43n и *L. cremoris* 23 отличались медленной скоростью роста и кислотообразования. Штамм 51n, проявлявший умеренную активность, увеличивал скорость свертывания молока при 40°C – температуре, нетипичной для *Lactococcus* [37], что может иметь значение для производства сыров с высокотемпературным нагревом (Пармезан, Эмменталь и др.). Кроме того, штаммы *L. lactis* 43n и 51n относятся к биовару *diacetylactis*, что подтверждается наличием генов метаболизма цитрата и способностью продуцировать диацетил. При этом штамм 51n имел более низкий уровень продукции диацетила, чем 43n, что, вероятно, связано с отсутствием гена транскрипционного регулятора цитратлиазы (*citI*), участвующего в активации транскрипции соответствующего оперона в присутствии цитрата [38]. Корреляция между активностью продукции диацетила и наличием гена *citI* может представлять промышленный интерес, однако для подтверждения его роли необходимы эксперименты по геномному редактированию и оценке экспрессии мРНК соответствующих генов.

Геномный анализ выявил гены систем транспорта пептидов Opp, DtpT и Dpp, а также характерный набор протеолитических ферментов МКБ [29]. Присутствие гена *prtP* внеклеточной протеазы I типа в штаммах *L. lactis* 51n и *L. cremoris* 23 не коррелировало с уровнем их метаболической активности. Недавно показали, что представленность генов отдельных пептидаз (*Pcp*, *PepE/G*, *PepI*, *PepR*, *PepL* и *PepQ*) в геномах молочнокислых бактерий может существенно варьировать, влияя на активность ферментации [39]. Изученные нами штаммы также различались составом генов, кодирующих отдельные внутриклеточные пептидазы, включая *pcp*, *pepE*, *CATP*, *lspA* и *lexA*. Хотя выявленные вариации не объяснили фенотипические различия, они могут иметь функциональное значение. Для подтверждения их роли в формировании фенотипа необходимо функциональное тестирование соответствующих генов в комплексе с оценкой протеолитической активности. Кроме того, отсутствие очевидной корреляции может быть связано с различиями в копийности указанных генов и их возможной плазмидной локализацией, что не оценивали в рамках нашей работы, и является ее ограничением.

Мы подтвердили значительные различия в метаболизме лактозы между видами *L. lactis* и *L. cremoris*, что ранее отмечалось в литературе [1, 40]. Отсутствие *lacZ* у *L. cremoris* является характерной видовой особенностью, тогда как у большинства *L. lactis* этот ген присутствует. При этом у 80% *L. cremoris* и у трети *L. lactis* экспрессируются гены тагатозо-6-фосфатного пути. Все изученные штаммы *L. lactis* обладают генами обоих путей, что отражает их адаптацию к промышленным условиям.

Штаммы *L. lactis* 73n и 51n проявили устойчивость ко всем протестированным фагам. Для этих штаммов характерно наличие системы abortивной инфекции *AbiB*, однако полная устойчивость, вероятно, обусловлена комплексом факторов. Кроме того, как показано ранее, система *AbiB* эффективна преимущественно против фагов *Lactococcus* типа 936 [41], поэтому для подтверждения ее вклада в устойчивость указанных штаммов необходимо определить типы фагов, использованных в тестировании. Наши результаты согласуются с выводами длительного мониторинга фаговой динамики на сыродельных предприятиях, где устойчивость лактокоокков к бактериофагам также связывали с системами abortивной инфекции (*Abi*) [42]. Показано, что смена стартовых культур влияет на состав и численность фагов, а применение устойчивых штаммов может определять формирование фаговой экосистемы на производстве [42]. CRISPR-локусы выявлены у трех штаммов, при этом отсутствие белков Cas

согласуется с данными о неполных или деградированных CRISPR-системах у *Lactococcus* [43].

В геномах *L. lactis* 51n, 43n и *L. cremoris* 23 выявлены последовательности фаговой ДНК. У 51n и 43n они, вероятно, соответствуют внегеномным сателлитным фагам или вирусам, попавшим в образцы при культивировании. Профаг, обнаруженный у *L. cremoris* 23, вероятно, интегрирован, однако для подтверждения его способности к индукции следует провести эксперименты по активации.

Согласно ранее опубликованным данным, в целом более низкая скорость ферментации характерна для *L. cremoris* по сравнению с *L. lactis* [44], хотя отдельные штаммы *cremoris* могут проявлять более высокую активность, чем некоторые штаммы *lactis* [8]. Выявленное снижение ферментативной активности у штаммов *L. lactis* 51n, 43n и *L. cremoris* 23 по сравнению с *L. lactis* 73n и 81n, вероятно, также может быть обусловлено внутривидовыми различиями, причину которых еще предстоит выявить. Несмотря на отсутствие полного лизиса клеток, присутствие профагов в геноме, вероятно, создает дополнительную физиологическую нагрузку. Это может быть связано с активацией abortивных систем защиты (AbiC, AbiG и др.), которые, предотвращая распространение фага, одновременно нарушают нормальный клеточный метаболизм, что может снижать общую функциональную активность колонии бактерий за счет сопутствующего метаболического стресса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kondrotiene K, Zavistanaviciute P, Aksomaitiene J, Novoslavskij A, Malakauskas M. *Lactococcus lactis* in dairy fermentation—Health-promoting and probiotic properties. *Fermentation*. 2023;10(1):16.
- Li TT, Tian WL, Gu CT. Elevation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* to the species level as *Lactococcus cremoris* sp. nov. and transfer of *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* to *Lactococcus cremoris* as *Lactococcus cremoris* subsp. *tructae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021;71(3):004727.
- Torres Manno M, Zuljan F, Alarcón S, et al. Genetic and phenotypic features defining industrial relevant *Lactococcus lactis*, *L. cremoris* and *L. lactis* biovar. *diacetylactis* strains. *J Biotechnol*. 2018;282:25–31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.06.345>
- Kim WS, Ren J, Dunn NW. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;171(1):57–65.
- van Mastrigt O, Mager EE, Jamin C, Abbe T, Smid EJ. Citrate, low pH and amino acid limitation induce citrate utilization in *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. *Microb Biotechnol*. 2018;11(2):369–380.
- Curioni PMG, Bosset JO. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int Dairy J*. 2002;12(12):959–984.
- Castellone V, Bancalari E, Rubert J, Gatti M, Neviani E, Bottari B. Eating fermented: Health benefits of LAB-fermented foods. *Foods*. 2021;10(11):2639.
- Poudel R, Thunell RK, Oberg CJ, et al. Comparison of growth and survival of single strains of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus cremoris* during Cheddar cheese manufacture. *J Dairy Sci*. 2022;105(3):2069–2081. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20958>
- Kelleher P, Mahony J, Bottacini F, Lugli GA, Ventura M, van Sinderen D. The *Lactococcus lactis* Pan-Plasmidome. *Front Microbiol*. 2019;Volume 10–2019. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00707>
- Panebianco F, Giarratana F, Caridi A, Sidari R, De Bruno A, Giuffrida A. Lactic acid bacteria isolated from traditional Italian dairy products: Activity against *Listeria monocytogenes* and modelling of microbial competition in soft cheese. *Lwt*. 2021;137:110446.
- Tomovska J, Gjorgjevski N, Makarijioski B. Examination of pH, titratable acidity and antioxidant activity in fermented Milk. *J Mater Sci Eng A*. 2016;6(11):326–333.
- Gutierrez-Mendez N, Rodriguez-Figueroa JC, Gonzalez-Cordova AF, Nevarez-Moorillon G V, Rivera-Chavira B, Vallejo-Cordova B. Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Can J Microbiol*. 2010;56(5):432–439.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование показало, что метаболические особенности *Lactococcus*, осуществляющего молочнокислое брожение, в значительной степени определяются штаммоспецифическими характеристиками, а не филогенетической принадлежностью. Это подтверждается выраженной фенотипической вариабельностью близкородственных штаммов *L. lactis*. Возможная связь между присутствием профагов и сниженной метаболической активностью у штаммов *L. lactis* 51n, 43n и *L. cremoris* 23 подчеркивает важность анализа фагового профиля при подборе штаммов для промышленного применения. Кроме того, наличие системы AbiB у штаммов 51n и 73n, устойчивых к широкому спектру бактериофагов, делает эту систему перспективным маркером фагорезистентности. В совокупности полученные данные подчеркивают необходимость комплексного подхода, сочетающего геномные и фенотипические методы, для эффективного подбора штаммов, обладающих высокой продуктивностью и устойчивостью, для применения в молочной промышленности. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (грант № 075-15-2024-483).

13. Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Bacteriophages: Methods and protocols, Volume 1: Isolation, characterization, and interactions*. Published online 2009:141-149.
14. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Krobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2020;70(1):e102.
15. Langdon WB. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min*. 2015;8:1-7.
16. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079.
17. Walker BJ, Abeel T, Shea T, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*. 2014;9(11):e112963.
18. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075.
19. Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Gene prediction: methods and protocols*. Published online 2019:227-245.
20. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(14):6614-6624. doi: 10.1093/nar/gkw569
21. Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol*. 2016;428(4):726-731. doi: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006
22. Olson RD, Assaf R, Brettin T, et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D678-D689. doi: 10.1093/nar/gkac1003
23. Wishart DS, Han S, Saha S, et al. PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(W1):W443-W450. doi: 10.1093/nar/gkad382
24. Tesson F, Planel R, Egorov AA, et al. A Comprehensive Resource for Exploring Antiphage Defense: DefenseFinder Webservice, Wiki and Databases. *Peer Community Journal*. 2024;4:e91. doi: 10.24072/pcjournal.470
25. Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, et al. CRISPR-CasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W246-W251. doi: 10.1093/nar/gky425
26. Alessandra C, Ea Z, Aurora GF, et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3895-3903. doi: 10.1128/aac.02412-14
27. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2016;32(6):929-931. doi: 10.1093/bioinformatics/btv681
28. Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(2):1100-1103. doi: 10.1099/ijsem.0.000760
29. Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek K, Kot AM. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*. 2021;26(7):1858.
30. Passerini D, Beltramo C, Coddeville M, et al. Genes but Not Genomes Reveal Bacterial Domestication of Lactococcus Lactis. *PLoS One*. 2010;5(12):e15306. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015306
31. Venegas-Ortega MG, Flores-Gallegos AC, Martínez-Hernández JL, Aguilar CN, Nevárez-Moorillón G V. Production of Bioactive Peptides from Lactic Acid Bacteria: A Sustainable Approach for Healthier Foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019;18(4):1039-1051. doi: https://doi.org/10.1111/1541-4337.12455
32. Iskandar CF, Cailliez-Grimal C, Borges F, Revol-Junelles AM. Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. *Trends Food Sci Technol*. 2019;88:121-132. doi: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.020
33. Garnneau JE, Moineau S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb Cell Fact*. 2011;10(1):S20. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S20
34. del Rio B, Binetti AG, Martín MC, Fernández M, Magadán AH, Alvarez MA. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol*. 2007;24(1):75-81. doi: https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.001
35. Gan R, Wu X, He W, et al. DNA phosphorothioate modifications influence the global transcriptional response and protect DNA from double-stranded breaks. *Sci Rep*. 2014;4(1):6642. doi: 10.1038/srep06642
36. Stuart A, Irina S, Evgenii V, et al. Differences in Lactococcal Cell Wall Polysaccharide Structure Are Major Determining Factors in Bacteriophage Sensitivity. *mBio*. 2014;5(3):10.1128/mbio.00880-14. doi: 10.1128/mbio.00880-14
37. Chen J, Shen J, Ingvar Hellgren L, Ruhdal Jensen P, Solem C. Adaptation of Lactococcus lactis to high growth temperature leads to a dramatic increase in acidification rate. *Sci Rep*. 2015;5(1):14199. doi: 10.1038/srep14199
38. G MM, Christian M, Diego de M, Paloma L. CitI, a Transcription Factor Involved in Regulation of Citrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *J Bacteriol*. 2005;187(15):5146-5155. doi: 10.1128/jb.187.15.5146-5155.2005
39. Shi Z, Fan X, Tu M, Wu Z, Pan D. Comparison of changes in fermented milk quality due to differences in the proteolytic system between Lactobacillus helveticus R0052 and Lactococcus lactis subsp. lactis JCM5805. *Food Biosci*. 2023;51:102271.
40. Rodríguez J, Vázquez L, Flórez AB, Mayo B. Phenotype testing, genome analysis, and metabolic interactions of three lactic acid bacteria strains existing as a consortium in a naturally fermented milk. *Front Microbiol*. 2022;Volume 13-2022. https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1000683
41. Chopin MC, Chopin A, Bidnenko E. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(4):473-479. doi: https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.006
42. P JA, Marie-Laurence L, Elyse B, et al. Longitudinal Study of Lactococcus Phages in a Canadian Cheese Factory. *Appl Environ Microbiol*. 2023;89(5):e00421-23. doi: 10.1128/aem.00421-23
43. Mileriene J, Aksomaitiene J, Kondrotiene K, et al. Whole-Genome Sequence of Lactococcus lactis Subsp. lactis LL16 Confirms Safety, Probiotic Potential, and Reveals Functional Traits. *Microorganisms*. 2023;11(4):1034. doi: 10.3390/microorganisms11041034
44. Garvie EI, Farrow JAE. NOTES: *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* (Orla-Jensen) comb. nov. and *Streptococcus lactis* subsp. *diacetilactis* (Matuszewski et al.) nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1982;32(4):453-455. doi: 10.1099/00207713-32-4-453

УДК 615.849

Радиозащитные свойства препарата «Димефосфон» на модели лучевого поражения *in vivo*

Д. А. Киселёва^{1*}, М. А. Мельченко^{1,2}, О. И. Яровая^{1,2}, Н. В. Басов^{1,2}, А. Д. Рогачев^{1,2},
А. Г. Покровский², Н. Ф. Салахутдинов¹, Т. Г. Толстикова¹

¹Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, Новосибирск, 630090 Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: dasha.halikova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2025

Принята к печати 02.07.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27662

РЕФЕРАТ Лучевая терапия является одним из наиболее широко используемых видов терапии опухолей. Однако применение лучевой терапии ограничивается ее токсичностью по отношению к здоровым тканям. Поиск эффективных радиозащитных средств остается одной из главных целей радиационной онкологии и радиобиологии. В данной работе радиозащитные свойства препарата «Димефосфон», обладающего антиацидотическими, противоопухолевыми, антиоксидантными свойствами, изучали на животных с экспериментальным лучевым поражением. Показано, что 14-дневное введение препарата в дозе 750 мг/кг после однократного облучения мышей CD-1 в дозе 5 Гр оказывает локальный радиозащитный эффект, уменьшая тяжесть радиационно-индуцированного повреждения кишечного эпителия и капсулы селезенки. По результатам метаболомного исследования выявлено достоверное увеличение содержания ключевых метаболитов, отвечающих за антиоксидантные свойства, таких как альфа-токоферол, рибозид никотинамида, N-карбамоил-L-аспартат, аденилосукцинат, что свидетельствует о повышении уровня антиоксидантной защиты под действием препарата «Димефосфон».

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА радиозащитные свойства, лучевое поражение, Димефосфон, метаболомный скрининг.

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания остаются одной из ведущих причин смерти во всем мире. По состоянию на 2023 г. в Российской Федерации выявлено более 670 тысяч новых случаев злокачественных новообразований, прирост данного показателя по сравнению с 2022 г. составил 8.0% [1]. Лучевая терапия (ЛТ) относится к эффективным способам борьбы со злокачественными новообразованиями. Считается, что примерно 50% онкологических больных получают ЛТ, при этом около 70% нуждаются в ее применении, причем в ряде случаев ЛТ является единственным методом лечения рака [2]. Основным фактором, ограничивающим применение ЛТ, является отсутствие селективности в отношении опухолевых клеток, в результате чего происходит нарушение метаболических процессов в здоровых клетках и органах с развитием тяжелых осложнений, в том числе с возникновением лучевого поражения [3]. Появление более селективных методов ЛТ не исключает токсичности по отношению к здоровым тканям, поэтому активно раз-

рабатываются подходы, в которых лучевая терапия сочетается с системной терапией радиопротекторными препаратами. Важно подчеркнуть, что зарегистрированные на территории Российской Федерации радиозащитные средства обладают серьезными побочными эффектами, такими как разрыв селезенки, острый респираторный дистресс-синдром, альвеолярное кровотечение, атриовентрикулярная блокада, что является ограничивающим фактором их широкого применения [4–6]. По этой причине в настоящее время активно изучаются природные соединения на предмет их радиозащитной активности, однако все разработки находятся на стадии доклинических исследований [7, 8]. В связи с этим, поиск эффективных, низкотоксичных препаратов, защищающих здоровые ткани от повреждающего воздействия ионизирующего излучения во время проведения курса ЛТ, остается важной задачей радиационной онкологии и радиобиологии.

Для проведения доклинических исследований новых радиозащитных средств и оптимизации стра-

тегий лечения различных видов опухолей необходимо иметь адекватные животные модели лучевого поражения, которые позволяют надежно и точно воспроизводить основные клинические проявления и патогенетические механизмы развития поражения у человека. Ранее была продемонстрирована пригодность применения излучения рентгеновского спектра с пиковым напряжением 320 кВ для формирования лучевых поражений на моделях *in vivo* [9].

Нами разработана методика экспериментального лучевого поражения лабораторных животных (мышей), позволяющая оценить эффективность и безопасность радиозащитных средств. Для отработки методики в качестве радиопротекторного средства был выбран оригинальный отечественный препарат «Димефосфон». Этот препарат представляет собой водный раствор диметилового эфира 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты (рис. 1), он обладает низкой токсичностью, высокой биодоступностью, легко проникает через гистогематические барьеры [10, 11].

В 1983 г. препарат в виде 15% раствора для перорального и наружного применения был одобрен для клинического использования в качестве антиацидотического и вазоактивного средства [12–14]. Позднее была проведена оценка эффективности трех радиопротекторных соединений (масло облепихи, масляный раствор Евдощенко, препарат «Димефосфон») при лучевой терапии рака гортани. Применение препарата «Димефосфон» приводило к наименьшим количественным различиям в толщине воздушного столба гортани, характеризующей проявление острой лучевой реакции, до начала ЛТ и после получения дозы в 40 Гр [15].

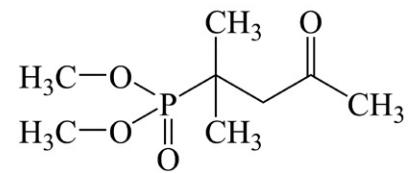
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные

Все манипуляции с животными проводили в строгом соответствии с законодательством РФ, решением «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г. № 81 и положениями Директивы 2010/63/EU Парламента ЕС и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, и были одобрены биоэтической комиссией ЛФИ НИОХ СО РАН (протокол № Р-14-2025-01-01 от 10.01.2025 г.).

Самки аутбредных мышей CD-1 массой 25–30 г были получены из вивария SPF Института цитологии и генетики СО РАН, Россия. Животных содержали при оптимальных условиях температуры ($21 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$), влажности (40–60%), с 12-часовым

Рис. 1. Структурная формула активного вещества препарата «Димефосфон»



циклом день/ночь со свободным доступом к воде и гранулированному корму. Перед экспериментами мышей в течение недели адаптировали к условиям помещения.

Исследуемое соединение

В работе использовали препарат Димефосфон® (ОАО «Татхимфармпрепараты», г. Казань, Россия), который вводили внутривенно в дозе 750 мг/кг по 0.1 мл на 10 г массы тела. Первую дозу вводили за 3 ч до облучения, а затем препарат вводили однократно в этой же дозе каждые 24 ч в течение 14 дней.

Дизайн эксперимента и установка

Для экспериментального моделирования лучевого поражения у мышей использовали рентгеновскую установку X-RAD 320 (Precision X-Ray Inc., Branford, CT, США) с фиксированным расстоянием от источника излучения (SSD 50 см), с фильтром средней жесткости (0.75 мм олово, 0.25 мм медь, 1.5 мм алюминий). Общее облучение мышей ($n = 6$) проводили однократно в дозах 5 и 7.5 Гр при мощности дозы ~ 0.98 Гр/мин. Затем на 4, 7, 11 и 14 сутки после облучения оценивали выживаемость животных, что позволило выбрать дозу облучения для изучения радиозащитного действия препарата.

На следующем этапе оценивали радиозащитные свойства препарата «Димефосфон» на мышах, однократно облученных подобранной дозой. Животных случайным образом делили на три группы ($n = 8$): мыши первой группы (1) получали препарат «Димефосфон» в дозе 750 мг/кг (ДМФН); (2) – «Димефосфон» в дозе 750 мг/кг + общее облучение (ДМФН+ОБЛ); (3) – общее облучение (ОБЛ).

До облучения (0 точка), а затем на 4, 7, 11 и 14 сутки определяли массу тела животных, производили забор крови из ретроорбитального синуса для проведения метаболомного и гематологического анализа. На 14 день всех мышей умерщвляли, органы (тимус, сердце, легкие, печень, селезенка) взвешивали для расчета индекса их массы и забирали для гистологического исследования.

Гематологическое исследование

Общий анализ крови проводили с помощью автоматического гематологического анализатора MINDRAY BC-2800 Vet (Shenzhen Mindray Animal Medical Technology Co. Ltd., Китай). Использовали образцы

периферической крови (20 мкл), собранные в пробирки со стандартным количеством изотонического разбавителя. Определяли общее количество лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, содержание гемоглобина и гематокрит.

Гистологическое исследование

Полученный материал (тимус, сердце, легкие, печень, селезенка) взвешивали для расчета массовых коэффициентов (то есть процентного отношения массы органа к массе тела), а затем селезенку и тонкий кишечник фиксировали в нейтральном забуференном формалине (10%), обезвоживали в этаноле и ксилоле различных концентраций на комплексе MICROM (Carl Zeiss, Германия), после чего образцы тканей заливали в парафин. Срезы толщиной 4 мкм получали на ротационном микротоме, окрашивали гематоксилином-эозином. Образцы исследовали на световом микроскопе при увеличении $\times 100$ с предварительной настройкой света по Келлеру. Морфометрический анализ снимков гистологических препаратов и подсчет расстояния между ворсинками, длины ворсинок кишечно-го эпителия, а также толщины капсулы селезенки проводили в программном обеспечении AxioVision для оценки степени повреждения органов.

Метаболомный скрининг

Пробоподготовка. Для метаболомного анализа готовили образцы сухих пятен цельной крови. Аликвоту крови объемом 10 мкл наносили на абсорбционные карты Whatman 903™ (GE Healthcare, #10534612, США) и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 3 ч. Образцы помещали на хранение при температуре -70°C до момента пробоподготовки, которую проводили в соответствии с протоколом, описанным в работе [16]. Сухие пятна крови вырезали полностью, помещали в полипропиленовые пробирки объемом 0.5 мл и добавляли 150 мкл предварительно охлажденной смеси MeOH-ACN- H_2O (40:40:20, об/об/об). Образец инкубировали при $+4\ldots+5^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин, затем центрифугировали при 16 000 об/мин (около 24000 *g*, центрифуга Eppendorf 5417R) в течение 10 мин при $+4^{\circ}\text{C}$. Супернатант переносили в пластиковые вставки для хроматографических виал и анализировали.

Анализ образцов

Образцы анализировали методом высокоеффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) согласно [17]. Хроматографическое разделение проводили с использованием хроматографа LC-20AD

Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенного автодозатором SIL-20AC (Shimadzu, Япония) и термостатом для колонок СТО-10ASvp. Подвижная фаза состояла из элюента А (раствор 20 мМ карбоната аммония в воде, доведенный 25% водным раствором аммиака до pH 9.8, и 5 об.% ацетонитрила) и элюента Б (100% ацетонитрил). Каждый образец анализировали дважды: в режимах гидрофильной (ГФХ) и обращенно-фазовой (ОФХ) хроматографии. Хроматографию проводили в следующих условиях. Градиент ГФХ: 0 мин – 98% Б, 2 мин – 98% Б, 6 мин – 0% Б, 10 мин – 0% Б. Далее колонку уравновешивали в течение 4 мин. Градиент ОФХ: 0 мин – 0% Б, 1 мин – 0% Б, 6 мин – 98% Б, 16 мин – 98% Б. Далее колонку уравновешивали в течение 3 мин. Скорость потока в каждом анализе – 300 мкл/мин. Объем пробы 2 мкл. Анализ в обоих режимах хроматографии проводили с использованием монолитной колонки (2 \times 60 мм) на основе 1-винил-1,2,4-триазола. Монолитный материал колонки был синтезирован согласно [18]: в стеклянной трубке с внутренним диаметром 2 мм проводили сополимеризацию смеси, состоящей из мономеров стирол/дивинилбензол/1-винил-1,2,4-триазол в объемном соотношении 10 : 50 : 40 соответственно.

Масс-спектрометрическую детекцию проводили с использованием масс-спектрометра API 6500 QTRAP (AB SCIEX, США), оснащенного источником ионизации электрораспылением. Детектировали 489 метаболитов в режиме MRM (multiple reaction monitoring, мониторинг множественных реакций) в области положительной и отрицательной ионизации с переключением полярности. Основные масс-спектрометрические параметры: напряжение источника ионов (IS) 5500 В для положительной и -4500 В для отрицательной ионизации; температура газа-осушителя – 475°C , газ в ячейке соударений (CAD) – «высокий», давление газа-распылителя (GS1), газа-осушителя (GS2) и газовой завесы (CUR) – 33, 33 и 30 фунт/дюйм² соответственно. Потенциал декластеризации (DP) составлял ± 91 В, потенциал входа (EP) ± 10 В, потенциал на выходе из ячейки соударений (CXP) ± 9 В. Время сканирования перехода MRM (dwell time) – 3 мс. Управление устройством и сбор информации осуществляли с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 (AB SCIEX). Переходы ионов-предшественников и фрагментных ионов, названия метаболитов, время фрагментации и соответствующие энергии столкновений адаптированы из [19, 20].

Статистическая обработка данных

Статистический анализ производили с использованием программного обеспечения Statistica

10.0 (StatSoft, США). Нормальность полученных данных проверяли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, при отсутствии нормального распределения U-критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$) или среднего \pm доверительный интервал для непараметрической выборки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Графики построены с использованием библиотеки Seaborn (Python) и программы Origin.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка выживаемости животных после облучения в дозах 5 и 7.5 Гр

На первом этапе исследования подбирали оптимальную дозу облучения для моделирования лучевого поражения у экспериментальных животных. Общее облучение животных в дозе 7.5 Гр сопровождалось 100% летальностью на 11 сутки эксперимента (рис. 2). Таким образом была установлена абсолютно летальная (гибель 100% животных) доза облучения, последующее использование которой не представлялось целесообразным. После однократного облучения мышей в дозе 5 Гр на конец эксперимента (14 сутки) 50% животных оставались живыми, что соответствует сублетальной (гибель 50% животных, LD_{50}) дозе облучения.

Выживаемость, средняя масса и гематологические показатели мышей после облучения в дозе 5 Гр на фоне введения препарата «Димефосфон»

На втором этапе оценивали влияние перорального введения препарата «Димефосфон» на организм экспериментальных животных, подвергнутых однократному общему облучению в дозе 5 Гр.

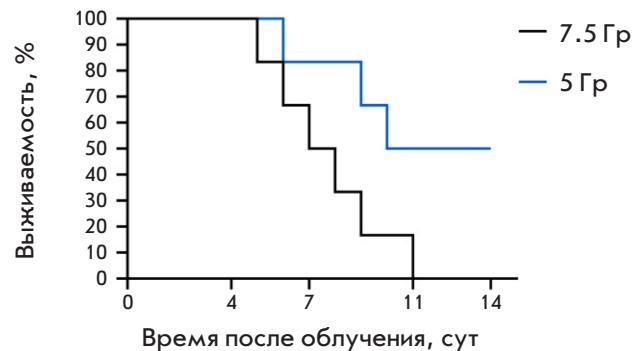


Рис. 2. Выживаемость мышей CD-1 после однократного облучения в дозах 5 и 7.5 Гр ($n = 6$)

Применение препарата «Димефосфон» не увеличило выживаемость животных после воздействия рентгеновского излучения (рис. 3А). На 14 сутки эксперимента выживаемость в группе ОБЛ составляла 50%, в группе ДМФН+ОБЛ – около 40%, что, вероятно, связано с различной радиационной чувствительностью животных [21], поскольку LD_{50} при пероральном введении препарата у мышей составляет 3 г/кг [10]. Кроме того, наблюдалось достоверное снижение средней массы облученных животных относительно исходных значений без статистической разницы между облученными (ДМФН+ОБЛ, ОБЛ) и необлученными (ДМФН) группами (рис. 3Б).

Согласно опубликованным данным, в развитии лучевого поражения выделяют три синдрома: гемопоэтический (возникает при дозах выше 1 Гр), желудочно-кишечный (доза от 6 до 15 Гр) и цереброваскулярный (доза более 20 Гр), то есть после воздействия ионизирующего излучения в первую очередь повреждаются кроветворная система, селезенка, тимус, эпителий кишечника [22].

Динамика гематологических показателей в группах облученных животных была идентичной. На 4

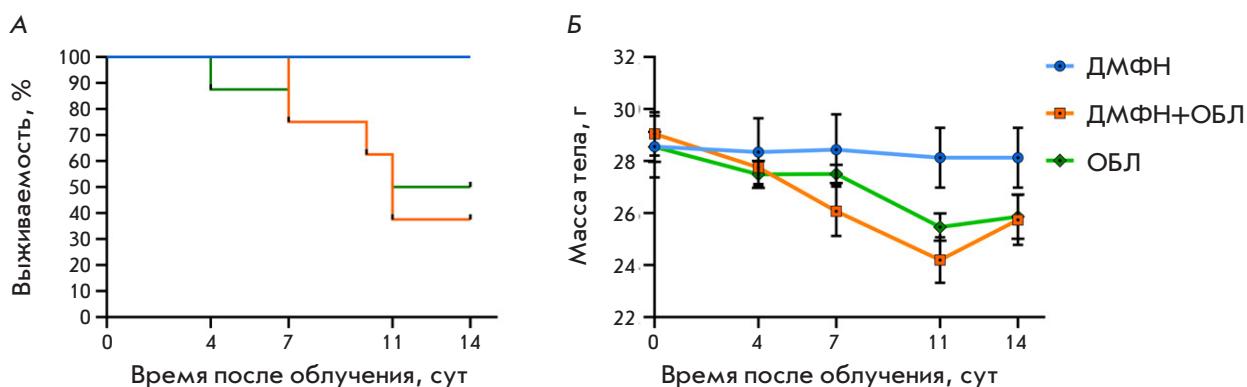


Рис. 3. Эффект перорального введения препарата «Димефосфон» в дозе 750 мг/кг за 3 ч до и ежедневно после общего облучения в дозе 5 Гр у мышей CD-1 ($n = 8$, $M \pm SEM$). А – выживаемость животных, Б – динамика средней массы тела животных

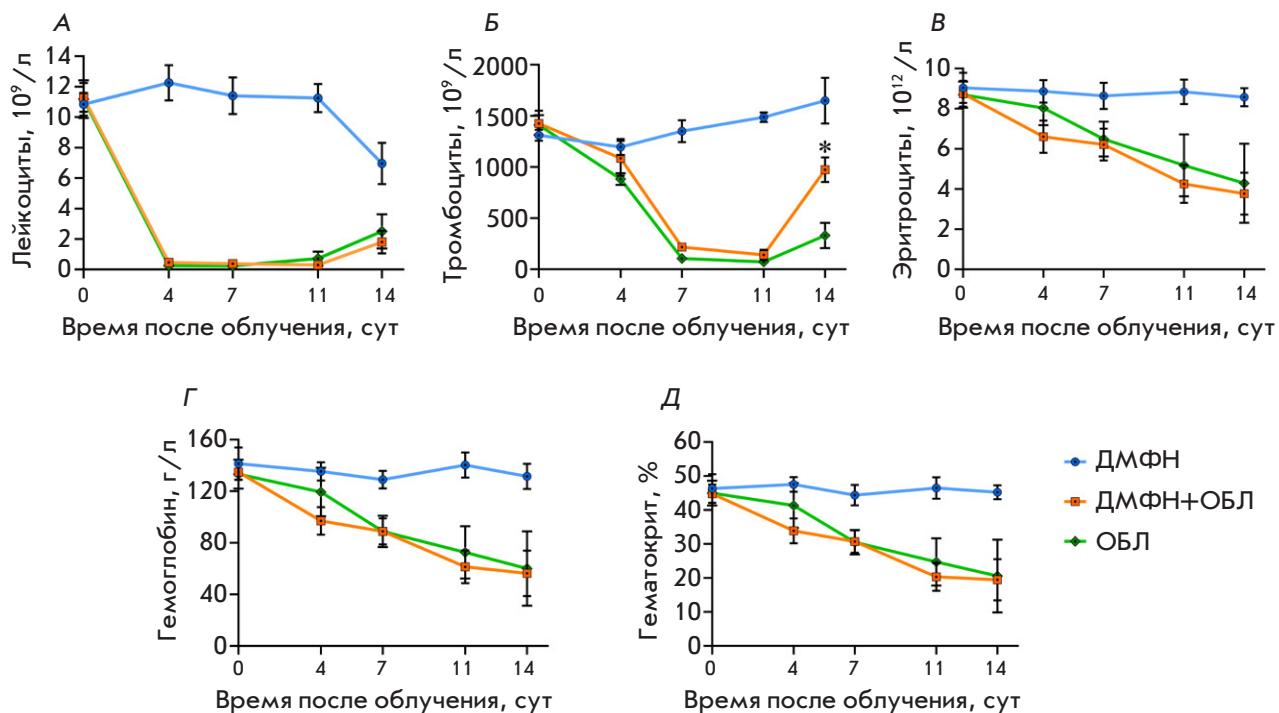


Рис. 4. Динамика гематологических показателей крови мышей CD-1 ($n = 8$, $M \pm SEM$) под действием препарата «Димефосфон» после облучения в дозе 5 Гр. А – лейкоциты, Б – тромбоциты, В – эритроциты, Г – гемоглобин и Д – гематокрит на 4-, 7-, 11-, 14-й день после облучения. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни, $*p < 0.05$ по сравнению с ОБЛ

день после облучения у мышей ДМФН+ОБЛ и ОБЛ наблюдалась острая лейкопения, причем восстановление количества лейкоцитов в обеих группах началось на 14-й день после облучения (рис. 4А). Снижение количества эритроцитов было связано с одновременным снижением гематокрита и гемоглобина с 4-го по 14-й день (рис. 4В–Д). Уровень тромбоцитов резко снизился на 7-й день, но начал восстанавливаться на 14-й день после облучения. Введение препарата «Димефосфон» способствовало статистически значимому ускорению восстановления только уровня тромбоцитов на 14-й день у облученных животных (рис. 4Б).

Гистологическое исследование внутренних органов мышей после облучения в дозе 5 Гр на фоне введения препарата «Димефосфон»

Воздействие рентгеновского излучения привело к статистически значимому изменению массового коэффициента тимуса (табл. 1). Наблюданная острая инволюция тимуса (уменьшение массового коэффициента более чем в 2 раза) в группах ДМФН+ОБЛ и ОБЛ, вероятно, связана с резким сокращением количества Т-лимфоцитов и эпителиальных клеток тимуса [23]. У мышей облученных групп также наблюдалось увеличение массового ко-

эффициента селезенки, однако эффект не был статистически значимым.

Согласно результатам гистологического исследования, мыши группы ДМФН имели типичное строение тонкого кишечника с нормальной длиной ворсинок и глубиной крипты (рис. 5В). Напротив, в группе ОБЛ выявлено радиационно-индукционное повреждение тонкого кишечника: дегенерация и укорочение ворсинок, увеличение расстояния между ними (рис. 5А,Д). Кроме того, толщина слизистой тонкого кишечника была меньше, чем у мышей ДМФН, ДМФН+ОБЛ (рис. 5Б).

Таблица 1. Массовый коэффициент органов (%) мышей CD-1 после общего облучения в дозе 5 Гр ($M \pm SEM$)

Орган	ДМФН	ДМФН+ОБЛ	ОБЛ
Тимус	0.38 ± 0.01	$0.15 \pm 0.02^*$	$0.11 \pm 0.03^*$
Сердце	0.52 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.46 ± 0.02
Легкие	0.98 ± 0.07	1.05 ± 0.07	0.96 ± 0.05
Печень	5.85 ± 0.27	4.78 ± 0.60	5.34 ± 0.44
Селезенка	0.74 ± 0.11	1.18 ± 0.40	1.29 ± 0.23

Примечание. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни, $*p < 0.05$ по сравнению с ДМФН.

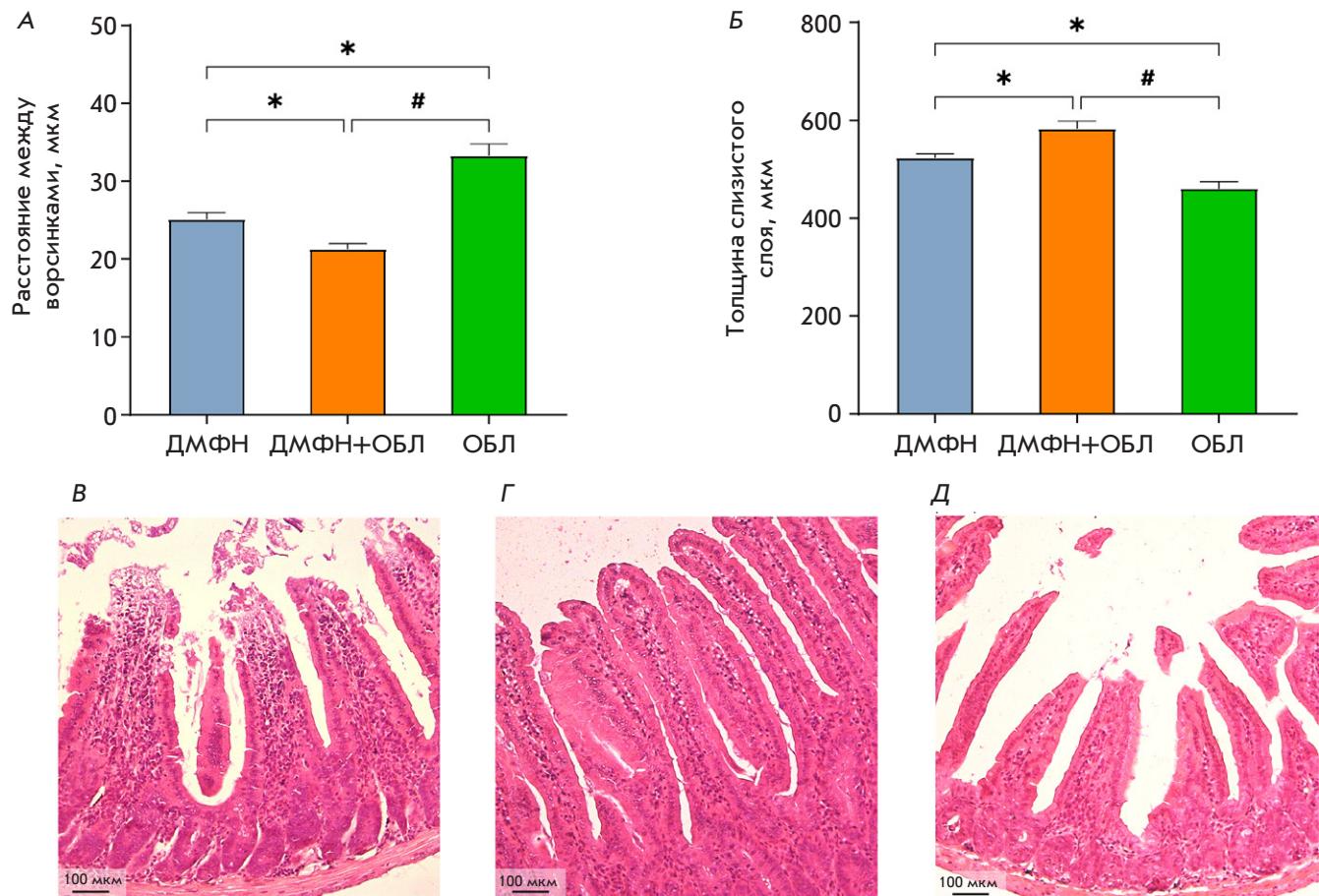


Рис. 5. Влияние препарата «Димефосфон» на повреждение тонкого кишечника мышей CD-1, вызванное облучением. *А* – расстояние между ворсинками, *Б* – толщина слизистого слоя тонкого кишечника ($M \pm SEM$). Гистологическая картина тонкого кишечника в группах ДМФН (*В*), ДМФН+ОБЛ (*Г*) и ОБЛ (*Д*). Окраска гематоксилином-эозином, увеличение $\times 100$. Статистический анализ проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента, $*p < 0.05$ по сравнению с ДМФН, $\#p < 0.05$ по сравнению с ДМФН+ОБЛ

Введение препарата «Димефосфон» на фоне облучения уменьшило радиационно-индуцированное повреждение, что проявлялось в увеличении длины ворсинок, уменьшении расстояния между ними и увеличении глубины крипт (рис. 5А,Г). Толщина слизистого слоя в группе ДМФН+ОБЛ была больше, чем в группе ДМФН, что, вероятно, связано с усилением процессов регенерации в кишечном эпителии (рис. 5Б).

Структура селезенки животных группы ДМФН имела типичное строение и была образована белой и красной пульпой, разделенных маргинальной зоной и покрытой соединительнотканной капсулой (рис. 6Б). На 14 день после облучения структура селезенки изменилась: белая пульпа расширилась за счет клеточной пролиферации, а четкая граница между красной и белой пульпой исчезла (рис. 6Г). Наблюдалась массивная инфильтрация красной пульпы лимфоцитами, которые первоначально рас-

полагались в синусоидах и селезеночных связках. Синусоидальные пространства стали больше, увеличилось их кровенаполнение. Более того, в группе ОБЛ произошло уменьшение толщины капсулы селезенки по сравнению с контрольной группой (рис. 6А), что согласуется с наблюдаемой тенденцией к увеличению массового коэффициента данного органа (табл. 1) и является показателем спленомегалии [24]. Введение препарата «Димефосфон» на фоне облучения не изменило структуру паренхимы селезенки, однако способствовало восстановлению нормальной толщины капсулы селезенки (рис. 6А,Б).

Таким образом, результаты гистологического исследования позволяют предположить местную радиозащитную активность препарата «Димефосфон», выраженную в уменьшении радиационно-индуцированного повреждения тонкого кишечника и воспаления селезенки.

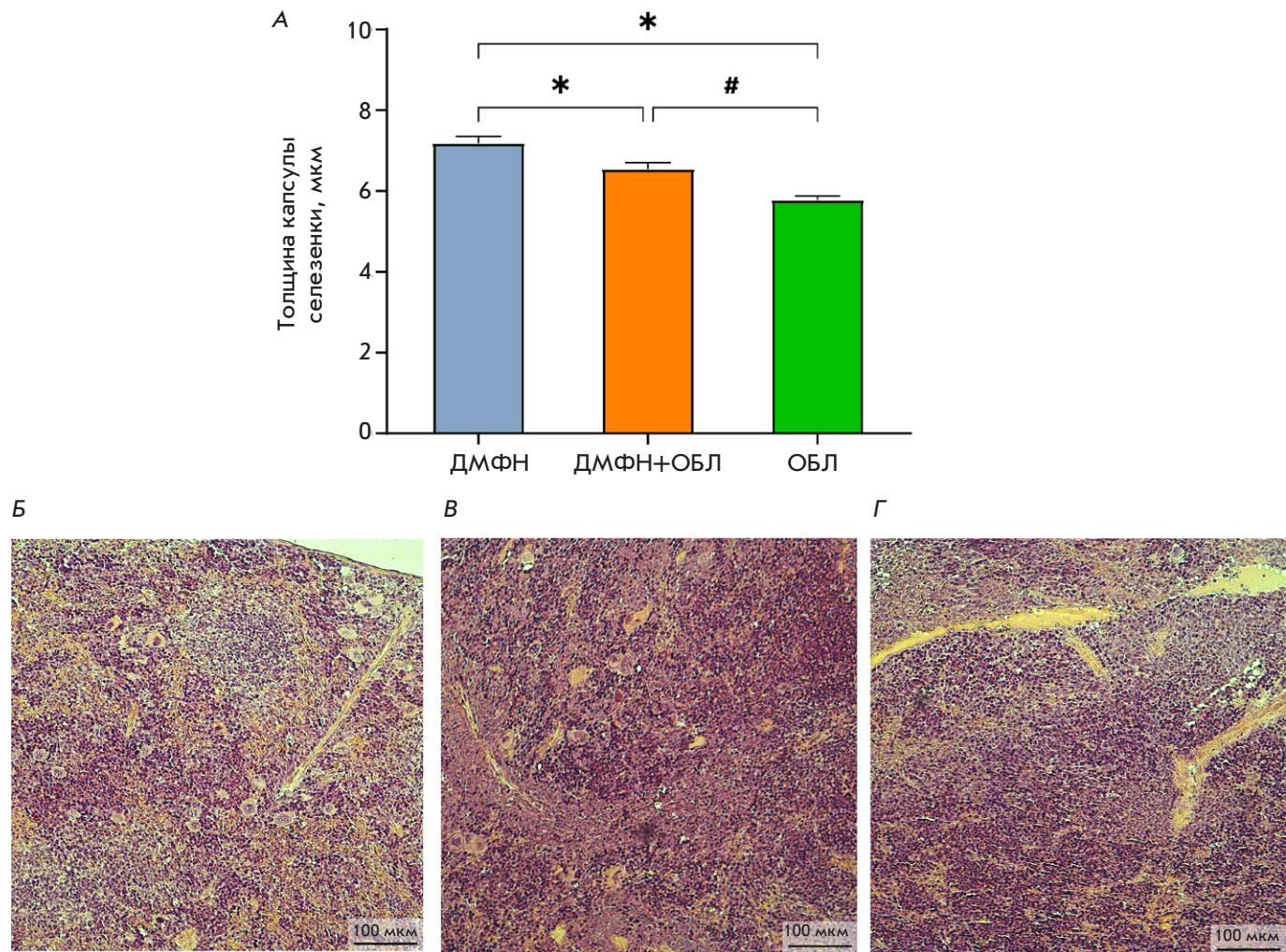


Рис. 6. Влияние препарата «Димефосфон» на повреждение селезенки мышей CD-1, вызванное облучением. А – толщина капсулы селезенки ($M \pm SEM$). Гистологическая картина селезенки в группах ДМФН (Б), ДМФН+ОБЛ (В), ОБЛ (Г). Окраска гематоксилином-эозином, увеличение $\times 100$. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия, $*p < 0.05$ по сравнению с ДМФН, $\#p < 0.05$ по сравнению с ДМФН+ОБЛ

Метаболомный скрининг образцов крови мышей после облучения в дозе 5 Гр на фоне введения препарата «Димефосфон»

Проведено метаболомное исследование 489 метаболитов в группах ДМФН+ОБЛ и ОБЛ в ключевые точки эксперимента. Алгоритм статистического анализа включал исследование метаболитов между 0 и 11 днем, среди которых были выбраны статистически значимо различающиеся метаболиты. Далее проанализировали пересечения множеств и нашли метаболиты, уникальные для одной из групп. Обнаружены 208 метаболитов с отрицательной динамикой (153 метаболита показали отрицательную динамику в обеих группах, 13 – только в группе ОБЛ, 42 – только в группе ДМФН+ОБЛ) и 26 метаболитов с положительной динамикой (15 метаболитов показали положительную динамику

в обеих группах, 5 – характерны только для ОБЛ, 6 – для ДМФН+ОБЛ) (рис. 7).

После облучения в группе ОБЛ произошли нарушения метаболизма токоферола, выраженные в постепенном снижении его содержания на протяжении эксперимента, что делает организм чувствительным к воздействию свободных радикалов. Из рис. 8А видно, что у животных группы ДМФН+ОБЛ содержание токоферола в крови не снижалось, в отличие от группы облученных животных. Альфа-токоферол является мощным жирорастворимым антиоксидантом, эффекты которого заключаются в антиоксидантной и радиозащите посредством поглощения свободных радикалов [25] и непрямого действия на выработку определенных факторов роста и цитокинов [26]. Таким образом, наблюдавшаяся динамика содержания альфа-токоферо-

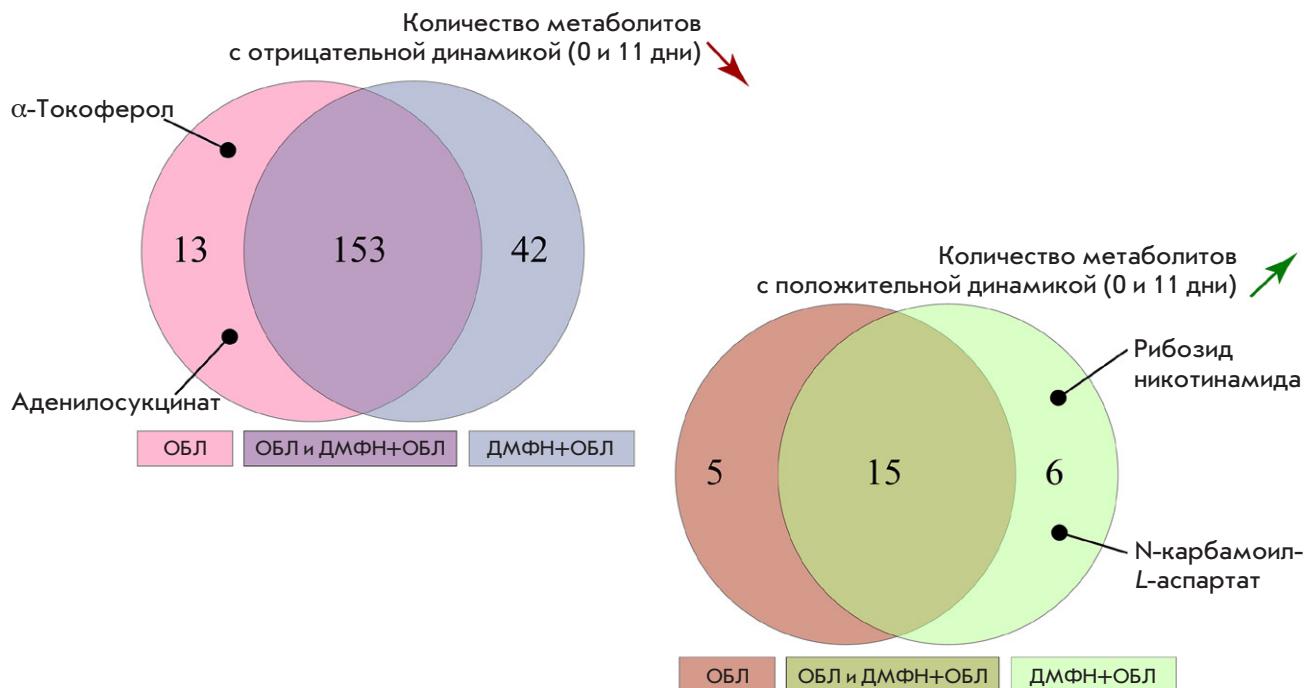


Рис. 7. Диаграммы Эйлера для метаболитов с положительной и отрицательной динамикой

ла может опосредованно свидетельствовать о радиопротекторном механизме препарата.

Содержание аденилосукцината (рис. 8Б) резко снижается в обеих группах до 7 дня после облучения, после чего в группе ДМФН+ОБЛ происходит значимый рост содержания метаболита, не наблюдавшийся в группе ОБЛ. Аденилосукцинат принимает участие в рециркуляции пуринов, энергетическом гомеостазе, а также в снижении воспаления и других форм клеточного стресса [27]. Важно отметить, что содержание пуриновых метаболитов в крови коррелирует с устойчивостью клеток к радиации, причем их экзогенное введение способствует репарации двухцепочечных разрывов ДНК после воздействия радиации [28]. Таким образом, введение препарата «Димефосфон» компенсировало воздействие облучения, увеличивая содержание аденилосукцината в крови, что может свидетельствовать о способности препарата повышать устойчивость организма к радиационному воздействию.

Содержание рибозида никотинамида практически не изменилось после облучения с небольшим подъемом к 7 дню, однако введение препарата привело к резкому повышению содержания данного метаболита в крови мышей к 4 дню, которое сохранялось на этом уровне до окончания эксперимента (рис. 8В). Рибозид никотинамида является предшественником NAD+, который выступает как кофермент многих клеточных реакций, участвующих в физиоло-

гическом гомеостазе различных органов и систем. Показано, что этот метаболит влияет на течение острого лучевого синдрома, а его пероральное применение оказывает радиопротекторный эффект, заключающийся в ингибировании клеточного старения селезенки и нормализации профиля метаболитов в сыворотке крови мышей [29]. Кроме того, недавние исследования доказали, что предшественники NAD+ (в частности, рибозид никотинамида) играют решающую роль в поддержании целостности кишечного барьера [30]. Наблюдаемая в нашем исследовании положительная динамика рибозида никотинамида согласуется с результатами гистологического исследования и может объяснить радиопротекторный эффект препарата в тонком кишечнике.

В группе ОБЛ содержание N-карбамоил-L-аспартата оставалось постоянным, тогда как применение препарата «Димефосфон» приводило к повышению его содержания на 7 и 11 дни (рис. 8Г). Согласно данным [31], уровень этого метаболита снижается в тканях кишечника мышей после однократного общего гамма-облучения. N-карбамоил-L-аспартат представляет собой ранний интермедиат *de novo* синтеза пиримидинов, необходимого для пролиферации клеток и восстановления поврежденной ткани. N-карбамоил-L-аспартат образуется при конденсации карбамоилфосфата с аспартатом, катализируемой аспартат-карбамоилтрансферазой. Повышение содержания N-карбамоил-L-аспартата

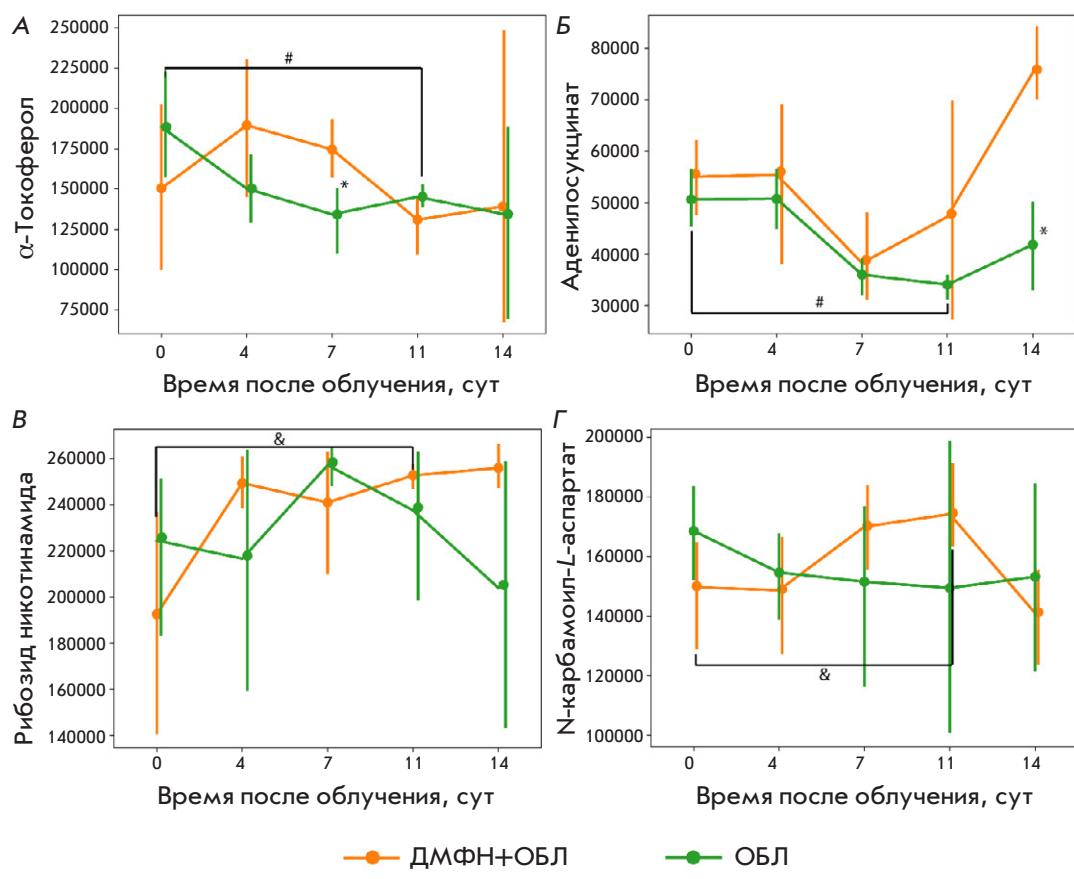


Рис. 8. Динамика содержания статистически значимо различающихся метаболитов в крови мышей CD-1 групп ДМФН+ОБЛ и ОБЛ. А – альфа-токоферол, Б – аденилосукцинат, В – рибозид никотинамида, Г – N-карбамоил-L-аспартат. Данные представлены в виде среднего \pm доверительный интервал для непараметрической выборки. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни, * $p < 0.05$ между группами ДМФН+ОБЛ и ОБЛ, # $p < 0.05$ между 0 и 11 днями в группе ОБЛ, & $p < 0.05$ между 0 и 11 днями в группе ДМФН+ОБЛ

в группе ДМФН+ОБЛ может отражать активацию синтеза пиримидинов, направленного на репарацию эпителия, и участие этого соединения в адаптивном ответе на радиационно-индуцированное повреждение. Это согласуется с установленным нами восстановлением слизистой оболочки кишечника под действием препарата.

В ходе исследования выявлено изменение содержания альфа-токоферола, аденилосукцината, рибозида никотинамида и N-карбамоил-L-аспартата. Установленные различия в их уровнях между группами ОБЛ и ДМФН+ОБЛ могут служить биохимическими маркерами радиозащитного эффекта препарата. Перечисленные метаболиты участвуют в антиоксидантных процессах в клетках, а обнаруженные метаболомные изменения отражают процессы, которые на уровне тканей проявляются снижением повреждений слизистой оболочки тонкого кишечника и уменьшением толщины капсулы селезенки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволили выбрать дозу облучения и охарактеризовать основные пока-

затели поражения организма для дальнейшего изучения потенциально перспективных радиозащитных средств. Также установлено, что препарат «Димефосфон» уменьшает радиационно-индуцированное повреждение слизистой оболочки тонкого кишечника и капсулы селезенки, способствует восстановлению количества тромбоцитов в крови мышей CD-1 на фоне однократного облучения. При этом анализ других основных гематологических показателей и выживаемости животных не выявил проявлений радиозащитного эффекта препарата «Димефосфон». Полученные данные метаболомного анализа, а именно достоверное увеличение содержания альфа-токоферола, рибозида никотинамида, N-карбамоил-L-аспартата, аденилосукцината в крови животных, получавших «Димефосфон», согласуются с результатами гистологического исследования слизистой кишечника и селезенки и свидетельствуют о наличии антиоксидантной активности у препарата «Димефосфон». ●

Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(проект № 25-25-00119).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каприн АД, Старинский ВВ, Шахзадова АО. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. 262 с.
- Martin OA, Martin RF. Cancer Radiotherapy: Understanding the Price of Tumor Eradication. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:261. doi: 10.3389/fcell.2020.00261
- Вельшер ЛЗ, Космынин АА, Бяхов МЮ, Дудицкая ТК, Решетов ДН. Таргетная терапия – новый подход в лечении местно-распространенного рака орофарингеальной зоны. *Acta Naturae.* 2012;4(1):84-87.
- Dale DC, Crawford J, Klippel Z, Reiner M, Osslund T, Fan E, Morrow PK, Allcott K, Lyman GH. A Systematic Literature Review of The Efficacy, Effectiveness, and Safety of Filgrastim. *Support Care Cancer.* 2018;26(1):7-20. doi: 10.1007/s00520-017-3854-x
- Lee M, Yee J, Kim JY, Kim JY, An SH, Lee KE, Gwak HS. Risk Factors for Neutropenia and Febrile Neutropenia Following Prophylactic Pegfilgrastim. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2019;15(4):231-237. doi: 10.1111/ajco.13152
- Andreassen CN, Grau C, Lindgaard JC. Chemical Radioprotection: A Critical Review of Amifostine as a Cytoprotector in Radiotherapy. *Semin Radiat Oncol.* 2003;13(1):62-72. doi: 10.1053/srao.2003.50006
- Mun GI, Kim S, Choi E, Kim CS, Lee YS. Pharmacology of Natural Radioprotectors. *Arch Pharm Res.* 2018;41(11):1033-1050. doi: 10.1007/s12272-018-1083-6
- Raj S, Manchanda R, Bhandari M, Alam MS. Review on Natural Bioactive Products as Radioprotective Therapeutics: Present and Past Perspective. *Curr Pharm Biotechnol.* 2022;23(14):1721-1738. doi: 10.2174/1389201023666220110104645
- Scott BR, Lin Y, Saxton B, Chen W, Potter CA, Belinsky SA. Modeling Cell Survival Fraction and Other Dose-Response Relationships for Immunodeficient C.B-17 SCID Mice Exposed to 320-kV X Rays. *Dose Response.* 2021;19(2):15593258211019887. doi: 10.1177/15593258211019887
- Визель АА, Визель АО, Шукина ЛИ. Диметилоксобутилфосфонилдиметилат (Димефосфон): применение в пульмонологии и фтизиатрии. *Практическая пульмонология.* 2013;(3):40-44.
- Максимов МЛ, Малыхина АИ, Шикалева АА. Фармакотерапия, проверенная временем: от механизмов к клинической эффективности. *РМЖ.* 2020;9:71-76.
- Студенцова ИА, Данилов ВИ, Хафизьянова РХ, Гараев РС, Мокринская ИС, Визель АО, Муслинкин АА. Итоги клинической апробации димефосфона как вазоактивного средства, нормализующего функции нервной системы. *Казанский медицинский журнал.* 1995;76(5):214-218.
- Mironov VF, Buzykin BI, Garaev RS, Tatarinov DA, Kashapov LR, Chestnova RV, Nabiullin VN, Il'yasov AV, Zobova VV. Dimephosphone analogs: A pharmacological aspect. *Russ Chem Bull.* 2014;63:2114-2125. doi:10.1007/s11172-014-0708-2
- Полуэктов МГ, Плыдымова ИГ, Голубев ВЛ. Возможности применения препарата димефосфон в неврологии и нейрохирургии. *Доктор.Ру.* 2015;106-107(5-6):5-10.
- Гилева ТГ, Лукин АВ, Нюшкин АА, Агачев АР, Студенцова ИА, Визель АО. Оценка эффективности радиопротекторных соединений при лучевой терапии рака горла. *Казанский медицинский журнал.* 1994;75(5):374-375. doi: 10.17816/kazmj90563
- Li K, Naviaux JC, Monk JM, Wang L, Naviaux RK. Improved Dried Blood Spot-Based Metabolomics: A Targeted, Broad-Spectrum, Single-Injection Method. *Metabolites.* 2020;10(3):82. doi: 10.3390/metabo10030082
- Basov NV, Rogachev AD, Aleshkova MA, Gaisler EV, Sotnikova YS, Patrushev YV, Tolstikova TG, Yarovaya OI, Pokrovsky AG, Salakhutdinov NF. Global LC-MS/MS Targeted Metabolomics Using a Combination Of HILIC and RP LC Separation Modes on an Organic Monolithic Column Based on 1-vinyl-1,2,4-triazole. *Talanta.* 2024;267:125168. doi: 10.1016/j.talanta.2023.125168
- Patrushev YV, Sotnikova YS, Sidel'nikov VN. A Monolithic Column with a Sorbent Based on 1-Vinyl-1,2,4-Triazole for Hydrophilic HPLC. *Prot Met Phys Chem Surf.* 2020;56:49-53. doi:10.1134/S2070205119060248
- Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, Asara JM. A Positive/Negative Ion-Switching, Targeted Mass Spectrometry-Based Metabolomics Platform for Bodily Fluids, Cells, and Fresh and Fixed Tissue. *Nat Protoc.* 2012;7(5):872-881. doi: 10.1038/nprot.2012.024
- Li K, Naviaux JC, Bright AT, Wang L, Naviaux RK. A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics. *Metabolomics.* 2017;13(10):122. doi: 10.1007/s11306-017-1264-1
- Таирбеков МГ, Петров ВМ. Медико-биологические эффекты ионизирующих излучений. М.: МИФИ, 2005. 106 с.
- Macià I, Garau M, Lucas Calduch A, López EC. Radiobiology of the Acute Radiation Syndrome. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2011;16(4):123-130. doi: 10.1016/j.rpor.2011.06.001
- Horie K, Namiki K, Kinoshita K, Miyauchi M, Ishikawa T, Hayama M, Maruyama Y, Hagiwara N, Miyao T, Murata S, Kobayashi TJ, Akiyama N, Akiyama T. Acute Irradiation Causes a Long-Term Disturbance in the Heterogeneity and Gene Expression Profile of Medullary Thymic Epithelial Cells. *Front Immunol.* 2023;14:1186154. doi: 10.3389/fimmu.2023.1186154
- Tripathi AM, Khan S, Chaudhury NK. Radiomitigation by Melatonin in C57BL/6 Mice: Possible Implications as Adjuvant in Radiotherapy and Chemotherapy. *In Vivo.* 2022;36(3):1203-1221. doi: 10.21873/invivo.12820
- Tucker JM, Townsend DM. Alpha-tocopherol: Roles in Prevention and Therapy of Human Disease. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(7):380-387. doi: 10.1016/j.biopha.2005.06.005
- Singh VK, Beattie LA, Seed TM. Vitamin E: Tocopherols and Tocotrienols as Potential Radiation Countermeasures. *J Radiat Res.* 2013 Nov 1;54(6):973-988. doi: 10.1093/jrr/rrt048
- Rybalka E, Kourakis S, Bonsett CA, Moghadaszadeh B, Beggs AH, Timpani CA. Adenylosuccinic Acid: An Orphan Drug with Untapped Potential. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023;16(6):822. doi: 10.3390/ph16060822
- Zhou W, Yao Y, Scott AJ, Wilder-Romans K, Dresser JJ, Werner CK, Sun H, Pratt D, Sajjakulnukit P, Zhao SG, Davis M, Nelson BS, Halbrook CJ, Zhang L, Gatto F, Umemura Y, Walker AK, Kachman M, Sarkaria JN, Xiong J, Morgan MA, Rehemtualla A, Castro MG, Lowenstein P, Chandrasekaran S, Lawrence TS, Lyssiotis CA, Wahl DR. Purine Metabolism Regulates DNA Repair and Therapy Resistance in Glioblastoma. *Nat Commun.* 2020;11(1):3811. doi: 10.1038/s41467-020-17512-x
- Li W, Wang X, Dong Y, Huo Q, Yue T, Wu X, Lu L, Zhang J, Zhao Y, Dong H, Li D. Nicotinamide Riboside Intervention Alleviates Hematopoietic System Injury of Ionizing Radiation-Induced Premature Aging Mice. *Aging Cell.* 2023;22(11):e13976. doi: 10.1111/ace.13976
- Niño-Narvío J, Rojo-López MI, Martínez-Santos P, Rossell J, Ruiz-Alcaraz AJ, Alonso N, Ramos-Molina B, Mauricio D, Julve J. NAD⁺ Precursors and Intestinal Inflammation: Therapeutic Insights Involving Gut Microbiota. *Nutrients.* 2023;15(13):2992. doi: 10.3390/nu15132992
- Cheema AK, Suman S, Kaur P, Singh R, Fornace AJ Jr, Datta K. Long-Term Differential Changes in Mouse Intestinal Metabolomics after γ and Heavy Ion Radiation Exposure. *PLoS One.* 2014;9(1):e87079. doi: 10.1371/journal.pone.0087079

УДК 543.632.562.1

Хиральный хроматографический анализ аминокислот с предколоночной модификацией о-фталевым альдегидом: улучшение определения энантиомеров с помощью ион-парных реагентов

Н. В. Панин¹, И. В. Пирогов², Д. Ф. Гуранда¹, В. К. Швядас^{1,3*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119234 Россия²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119234 Россия³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119234 Россия

*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 20.05.2025

Принята к печати 05.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27703

РЕФЕРАТ Разработка эффективных и доступных методов хирального анализа аминокислот является важной научной и практической задачей. Одной из наиболее распространенных и удобных методик является хроматографическое определение отдельных энантиомеров аминокислот с предварительным превращением энантиомеров в диастереомеры, которые затем можно разделить на обычных ахиральных колонках. Нами показано, что добавление ион-парных реагентов в состав элюента и варьирование их структуры позволяют регулировать эффективность хирального анализа аминокислот, основанного на хроматографическом определении и разделении диастереомерных изоиндололов, полученных при предколоночной модификации аминокислот под действием о-фталевого альдегида в присутствии N-ацетил-L-цистеина. Использование ион-парных реагентов позволяет добиться лучшего разделения пиков диастереомерных изоиндололов, при этом время анализа можно существенно сократить за счет увеличения ионной силы. Таким образом, добавление ион-парных реагентов и оптимизация состава подвижной фазы являются важным подходом в инженерии хирального анализа аминокислот наряду с синтезом новых хиральных SH-соединений и подбором стационарных фаз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА хиральный анализ аминокислот, о-фталевый альдегид, N-ацетил-L-цистеин, предколоночная модификация, условия ВЭЖХ, ион-парные реагенты, разделение диастереомерных изоиндололов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОРА – о-фталевый альдегид; НАС – N-ацетил-L-цистеин; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ИПР – ион-парный реагент; ТВА – бромид тетрабутиламмония; ОТМА – бромид октилтриметиламмония; ХДР – хиральный дериватизирующий SH-реагент; ВТСС – этиловый эфир N-*трет*-бутилтиокарбамоил-L-цистеина; НАР – N-ацетил-D-пеницилламин; НМС – N-(R)-манделил-L-цистеин; DiC – N,N-диметил-L-цистеин; IBLC – N-изобутирил-L-цистеин; НРРС – N-фенилацетил-(R)-фенилглицил-L-цистеин; МР – 1-меркапто-2-пропанол; ВС – Вос-L-цистеин; у.е. – условные единицы.

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость определения отдельных энантиомеров в общем содержании аминокислот и других аминосоединений является важной задачей

как в фундаментальных исследованиях и медицинской диагностике, так и при характеристике исходного сырья и продуктов фармацевтической и пищевой промышленности [1–12]. Существенное

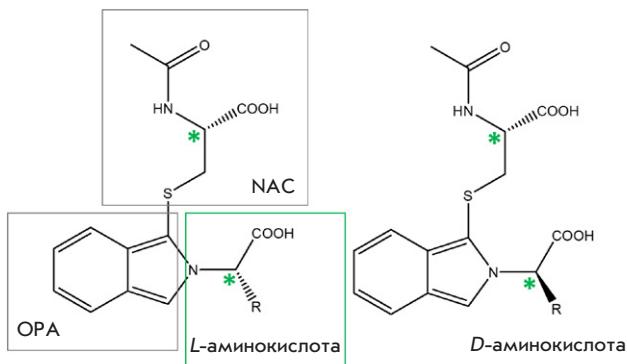


Рис. 1. Диастереомерные изоиндолольные аддукты, образующиеся при модификации аминокислот при помощи ОРА и хиального тиола (N-ацетил-L-цистеина). R – боковой радикал аминокислоты

внимание к стереоизомерии аминокислот в окружающей среде в пребиотических условиях уделяется также в исследованиях, посвященных происхождению жизни [13, 14]. Масштабность и сложность задач определения отдельных энантиомеров аминокислот в сложных смесях существенно возросла в последнее время в связи с необходимостью разработки высокоэффективных методов хиальной метаболомики [15–17]. При системном изучении живых систем в постгеномную эру необходимы методы эффективного, быстрого и широкодоступного хиального анализа аминокислот как строительных блоков физиологически активных соединений и маркеров различных патологических процессов. Наибольшее распространение в хиальном анализе аминосоединений получили хроматографические методы, в первую очередь высокоеффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с предварительным превращением энантиомеров в диастереомеры, которые затем можно разделить на обычных ахиральных колонках. Одной из наиболее доступных, удобных и эффективных методик является предколоночная модификация аминогрупп о-фталевым альдегидом (OPA) и хиальным дериватизирующим SH-реагентом (ХДР) [18, 19]. Такая модификация аминосоединений протекает достаточно быстро, в отличие от методики с использованием нингидрина нет необходимости повышения температуры, образующиеся диастереомерные изоиндолы, как правило, стабильны в условиях анализа и отличаются временами удерживания на стандартных ВЭЖХ-колонках. Изоиндолы имеют характерный максимум поглощения при 340 нм с коэффициентом молярного поглощения 6000 $M^{-1}cm^{-1}$ и являются хорошими флуорофорами, что позволяет определять фемтомоли аминосоединений при использовании флуоресцентных детекторов, если чувствитель-

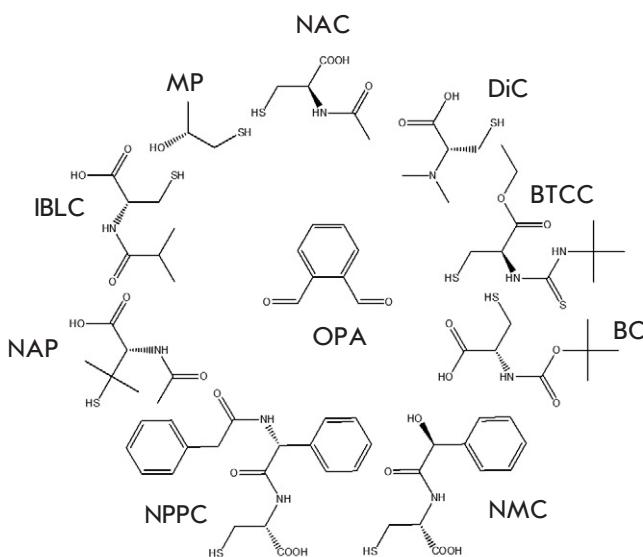


Рис. 2. Хиальные тиолы, используемые для предколоночной модификации с ОРА

ность недостаточна при спектрофотометрической регистрации [20, 21].

В наиболее известной версии этого метода при определении энантиомеров α -аминокислот используется весьма дешевый и доступный ХДР – N-ацетил-L-цистеин (NAC) (рис. 1) [18], однако не для всех соединений этого класса, а также других аминосоединений удается добиться необходимого разделения. С целью улучшения эффективности данной методики предложены аналоги NAC (рис. 2): N-изобутирил-L-цистеин [22], этиловый эфир N-трет-бутилиокарбамоил-L-цистеина (BTCC) [23], Бос-L-цистеин, N-ацетил-(R)-пеницилламин (NAP) [24], N-фенилацетил-(R)-фенилглицил-L-цистеин (NPPC) [25], N-(R)-манделил-L-цистеин (NMC) [26, 27], N,N-диметил-L-цистеин (DiC) [28], 1-меркапто-2-пропанол (MP) [29] и другие SH-реагенты.

Использование SH-реагентов различной структуры позволяет существенно расширить применение методики для определения энантиомеров широкого круга аминосоединений – аминокислот, первичных аминов и аминоспиртов. Так, если в случае традиционного NAC удается добиться приемлемого разделения только незначительного числа алифатических аминов, то при использовании R-NMC, содержащего в своей структуре два хиальных центра и большое число внутримолекулярных контактов, можно разделить целый ряд энантиомеров аминов и аминоспиртов, в том числе неразделяемых даже на хиальных колонках [26]. Однако большинство предложенных SH-соединений малодоступны, так как не являются коммерческими реагентами и в основном использу-

ются лишь предложившими их научными группами для решения ограниченного круга аналитических задач. Это затрудняет оценку перспектив более широкого применения новых SH-реагентов.

Наряду с созданием новых ХДР альтернативным подходом для улучшения эффективности хроматографического определения диастереомеров аминосоединений может быть инженерия самого аналитического процесса – стационарной и подвижной фазы, а также условий анализа. Одной из неизученных возможностей инженерии подвижной фазы в обращенно-фазовой ВЭЖХ для более эффективного разделения диастереомеров является добавление ион-парных реагентов. На перспективность такого подхода указывает опыт применения ион-парных реагентов для улучшения хроматографического разделения структурно подобных соединений [30–32]. Введение ион-парного реагента, содержащего заряженную функциональную группу и неполярные фрагменты (алкильные радикалы), может привести к увеличению удерживания анализаторов на хроматографической колонке за счет сорбции реагента на поверхности обращенно-фазового адсорбента и изменения условий взаимодействия с анализатором. Так, улучшение разделения органических кислот наблюдали при добавлении в подвижную фазу солей четвертичного аммония, среди которых наибольшее распространение получил бромид тетрабутиламмония (ТВА) [30].

В данной работе впервые исследована возможность использования ион-парных реагентов для более эффективного хроматографического разделения диастереомеров, получаемых в результате предколоночной дериватизации α -аминокислот под действием ОРА и хирального тиола НАС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы

o-Фталевый альдегид (OPA; 99%, Koch Light, Англия), N-ацетил-L-цистеин (НАС; 99%, AppliChem, Германия), фенилаланин («Реахим», Россия), глутамат («Аурат», Россия), лейцин, аспарагин и аргинин (Reanal, Венгрия), бромид тетрабутиламмония (ТВА), бромид октилтриметиламмония (ОТМА) (GmbH, Германия). Компоненты буферных растворов, кислоты, щелочи – препараты отечественного производства марок «х.д.» и «ч.д.а.». Метанол (для анализа, PanReac, Испания), ацетонитрил (0 сорт, «Криохром», Россия).

ВЭЖХ-анализ

ВЭЖХ-анализ проводили в хроматографической системе Perkin Elmer 200 Series: колонка для об-

ращенно-фазовой хроматографии Kromasil Eternity 5-C18 4.6 × 250 мм, объем вкло 10 мкл, скорость потока 1 мл/мин. Для приготовления подвижной фазы с заданной концентрацией ацетонитрила использовали двухканальный режим работы системы: канал А – 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 10% ацетонитрила; канал Б – 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 80% ацетонитрила.

При изучении влияния ИПР элюирование проводили в изократическом режиме при использовании одного канала А. В состав подвижной фазы на основе 5 мМ фосфатного буфера pH 6.8 добавляли ТВА или ОТМА в конечной концентрации 5 мМ и в разных экспериментах 15, 20 или 30% ацетонитрила. ВЭЖХ-анализ при добавлении ИПР проводили после предварительного уравновешивания колонки в течение 1 ч для максимальной воспроизводимости результатов. При изучении влияния ионной силы в канал А дополнительно добавляли NaCl в конечной концентрации 50 мМ. Изоиндольные диастереомеры детектировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Интенсивность поглощения измеряли в мкВ (у.е.). Управление ВЭЖХ-системой и обработка данных – TotalChrom Navigator 6.3.2.

Предколоночная модификация

Модификацию первичных аминогрупп проводили в автоматическом режиме при использовании программной функции автодозатора Derivatization следующим образом: в ячейку, содержащую 500 мкл 0.1 М боратного буфера pH 9.6, с помощью иглы автодозатора последовательно вносили 20 мкл 5 мМ раствора аминокислоты, 20 мкл 10 мМ метанольного раствора ОРА и 20 мкл 40 мМ раствора НАС с последующим перемешиванием реакционной смеси иглой автодозатора в автоматическом режиме. Подготовленную таким образом смесь оставляли на 15 мин, после чего (в случае необходимости) добавляли 50 мкл 50 мМ раствора ион-парного реагента для предварительного уравновешивания системы и затем анализировали с помощью ВЭЖХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разделение энантиомеров аминокислот после предколоночной модификации

Модельный ряд разделяемых энантиомеров включал α -аминокислоты с различными физико-химическими характеристиками бокового радикала: глутаминовую кислоту, аргинин, фенилаланин, лейцин и аспарагин. На первом этапе хроматографический анализ после предколоночной модификации под действием ОРА и НАС проводили на обычной ахиральной C18-колонке при нейтральном pH 6.8

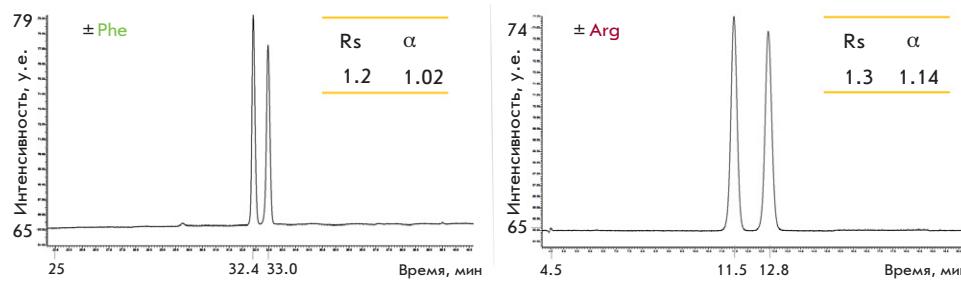


Рис. 3. Хроматограммы изоиндолильных производных энантиомеров фенилаланина и аргинина, полученных в результате предколоночной модификации ОРА в присутствии НАС. Градиентный режим элюирования: 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 0–10 мин 10% CH_3CN , 10–60 мин 10–40% CH_3CN

в градиентном режиме элюирования (0–10 мин: 10% CH_3CN , 10–60 мин: 10–40% CH_3CN). В этих условиях наблюдали разделение диастереомерных изоиндолильных производных только в случае аргинина и фенилаланина (рис. 3) и для улучшения разделения других аналитов в подвижную фазу на следующем этапе добавляли ион-парные реагенты.

Влияние добавки ион-парного реагента

В качестве ион-парных агентов были выбраны соли четвертичного аммония с различными алкильными заместителями, поскольку разделяемые изоиндолильные аддукты в условиях хроматографического анализа при pH 6.8 содержат две отрицательно заряженные карбоксильные группы. Добавление в элюент ион-парного реагента – бромида тетрабутиламмония (ТВА) – приводит к хроматографическому разделению изоиндолильных производных энантиомеров лейцина и глутаминовой кислоты, а также существенному улучшению в случае фенилаланина (рис. 4). Эффективный хиральный анализ энантиомеров глутамата достигается при более низкой концентрации органического растворителя в элюенте.

Интересно, что добавление данного ИПР не приводит к улучшению хроматографического разделения аргинина, так как образование ион-парного ассоциата с ТВА, по-видимому, затруднено из-за наличия в боковом радикале аминокислоты поло-

жительно заряженной гуанидиновой группы, и эффективный хиральный анализ аргинина можно проводить в «обычном» режиме (см. рис. 3).

Влияние структуры ион-парного реагента

При изучении влияния структуры ион-парного реагента на разделение изоиндолильных производных энантиомеров аминокислот наряду с симметричным ТВА был использован асимметричный ИПР – бромид октилтриметиламмония ОТМА (рис. 5).

По сравнению с ТВА добавление ОТМА приводит к уменьшению времени выхода изоиндолильных производных глутаминовой кислоты, фенилаланина и лейцина. При этом для отрицательно заряженной глутаминовой кислоты, в отличие от нейтральных фенилаланина и лейцина, не только сокращается время анализа, но и улучшается разделение по сравнению с ТВА (рис. 5). Этот эффект можно объяснить тем, что при добавлении в подвижную фазу несимметричного ОТМА длинный алифатический радикал глубоко и прочно связывается не-подвижной C18-фазой, происходит формирование классического сильного анионообменника [33], на котором по конкурирующему механизму происходит разделение анионов. На ионообменный механизм сорбции анионов указывает тот факт, что удерживание сильно зависит от ионной силы элюента, которая является основным средством регулирования прочности удерживания анионов.

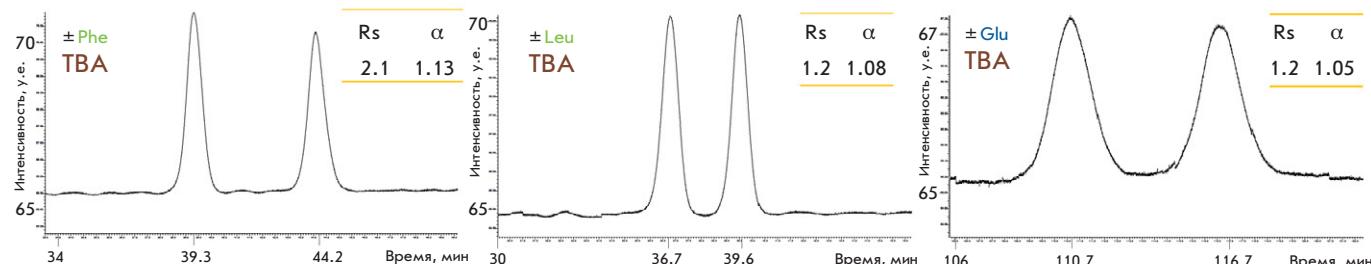


Рис. 4. Эффект добавления ИПР в подвижную фазу при проведении хроматографического анализа изоиндолильных производных, полученных в результате предколоночной модификации энантиомеров фенилаланина, лейцина и глутамата под действием ОРА в присутствии НАС. Изократический режим, 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 5 мМ ТВА, 20% CH_3CN (в случае Glu), 30% CH_3CN (в случае Leu, Phe)

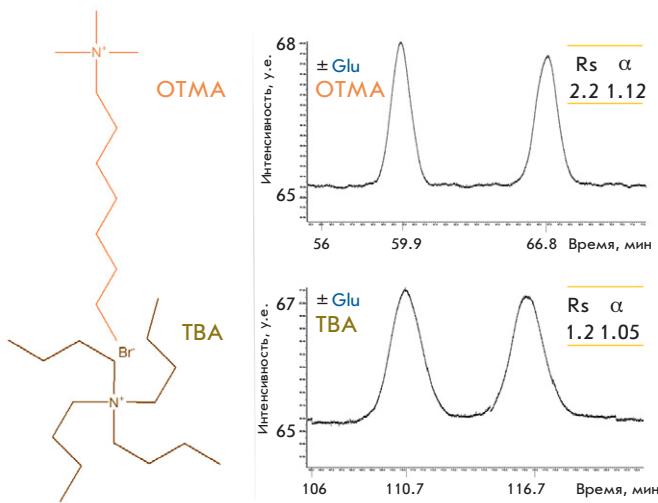


Рис. 5. Влияние симметричного (TBA) и асимметричного (OTMA) ИПР на хроматографическое разделение изоиндолевых производных, полученных в результате предколоночной модификации энантиомеров глутаминовой кислоты под действием ОРА в присутствии NAC. Изократический режим: 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 20% CH_3CN , 5 мМ ИПР

Влияние ионной силы

Чтобы изучить влияние ионной силы на эффективы, обусловленные добавлением в подвижную фазу ион-парных реагентов, в элюент, содержащий OTMA, добавляли соль NaCl в концентрации 50 мМ. Исследование показало, что увеличение ионной силы приводит к существенному уменьшению времени удерживания диастереомерных изоиндолов и сокращению времени анализа (рис. 6, слева и по центру). В этих условиях также начинают разделяться изоиндолевые производные полярного незаряженного аспарагина (рис. 6, слева). Улучшить разделение можно при более низких концентрациях органического растворителя в элюенте (сравните рис. 6 справа и по центру).

Проведенные эксперименты позволили установить, что добавлением ион-парных реагентов в состав элюента и варьированием их структуры можно регулировать эффективность хирального анализа аминокислот, основанного на хроматографическом определении и разделении диастереомерных изоиндолов, полученных при предколоночной модификации аминокислот под действием о-фталевого альдегида в присутствии N-ацетил-L-цистеина. С использованием ион-парных реагентов можно добиться лучшего разделения пиков определяемых изоиндолов фенилаланина, лейцина, глутаминовой кислоты и аспарагина, и, хотя это сопровождается более длительным удерживанием анализов на колонке, время анализа можно сократить при использовании асимметричного ИПР (OTMA) и увеличении ионной силы элюента. Характерное влияние различных факторов на эффективность хроматографического разделения изоиндолевых производных энантиомеров аминокислот на примере глутаминовой кислоты представлено на рис. 7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка эффективных и доступных методов хирального анализа аминокислот является важной задачей как для научных исследований, медицинской диагностики, так и для характеристики широкого круга продуктов фармацевтической и пищевой промышленности. Хроматографическое определение отдельных энантиомеров природных и синтетических аминокислот с использованием ахиральных колонок после предколоночной модификации образцов под действием ОРА в присутствии хиральных SH-соединений представляет одну из наиболее распространенных и удобных методик. Проведенное исследование показало, что при использовании ион-парных реагентов можно добиться лучшего разделения пиков определяемых диастереомерных изоиндолов. Варьирование

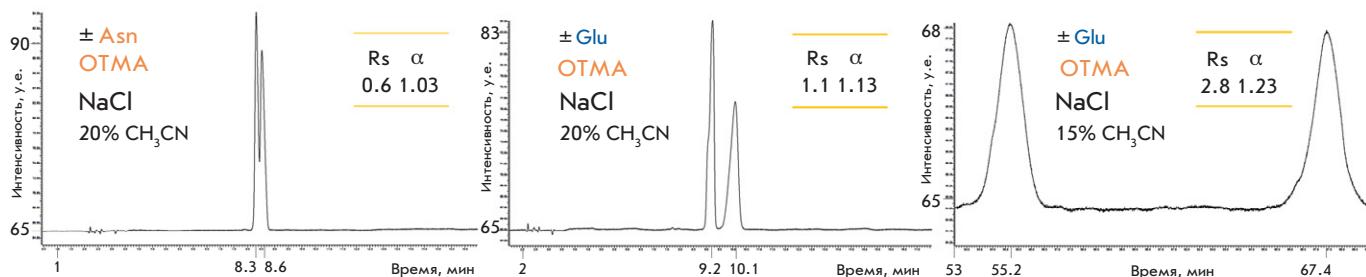


Рис. 6. Хроматограммы изоиндолевых производных энантиомеров глутаминовой кислоты и аспарагина, полученных в результате предколоночной модификации ОРА в присутствии NAC. Изократический режим: 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8, 5 мМ OTMA, 50 мМ NaCl, 20% CH_3CN (слева и по центру) и 15% CH_3CN (справа)

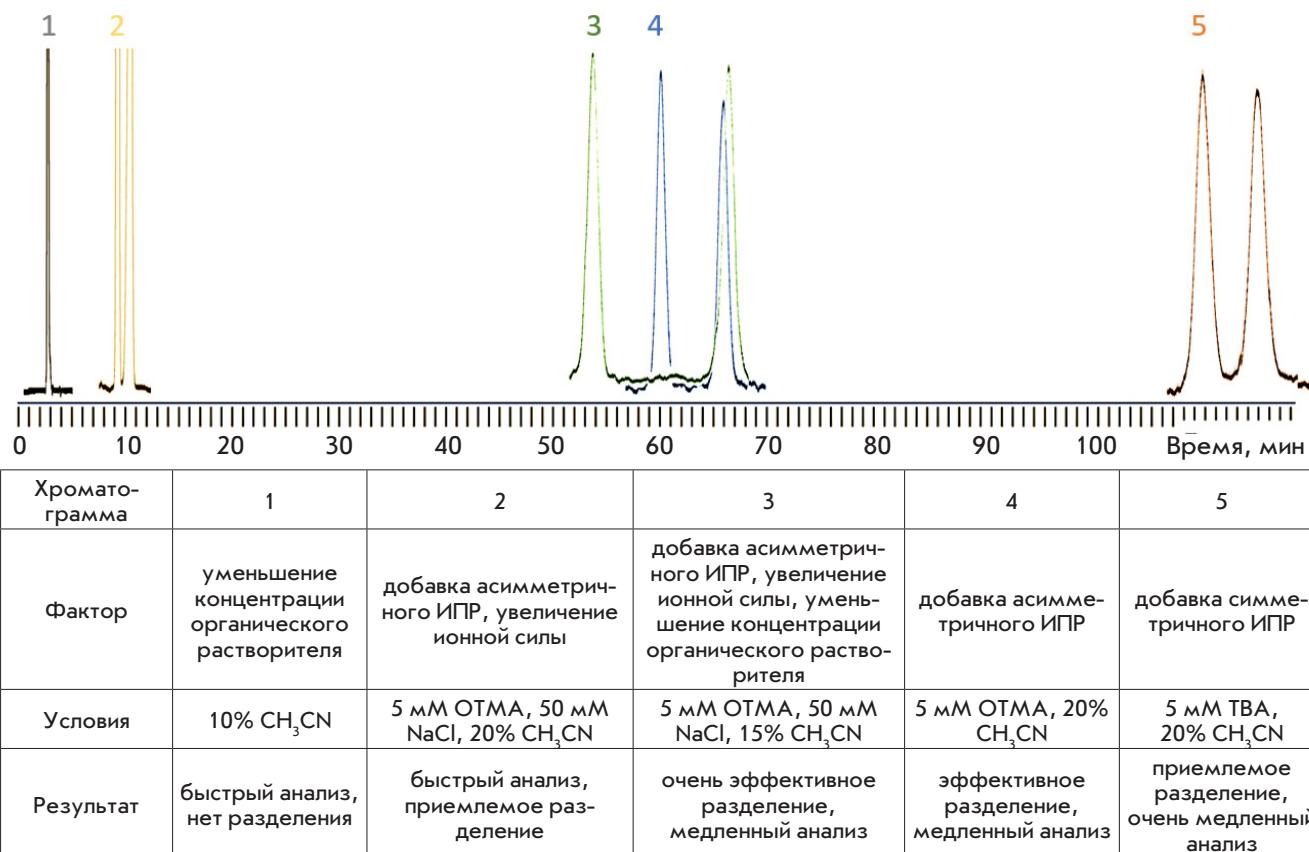


Рис. 7. Влияние различных факторов на скорость анализа и эффективность хроматографического разделения изоиндолильных производных энантиомеров глутаминовой кислоты, полученных в результате предколоночной модификации ОРА в присутствии НАС. Изократический режим: 5 мМ фосфатный буфер pH 6.8

структуре ион-парного реагента и увеличение ионной силы подвижной фазы способствуют более эффективному разделению диастереомеров и уменьшению времени анализа. Таким образом, добавление ион-парных реагентов в состав подвижной фазы является важным фактором инженерии хирального анализа аминокислот наряду

с синтезом хиральных SH-соединений и подбором стационарных фаз. ●

Исследование выполнено по гостеме
НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ
119042590056-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Knol MGE, Wulfmeyer VC, Müller RU, Rinschen MM. Amino acid metabolism in kidney health and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2024;20:771–788. <https://doi.org/10.1038/s41581-024-00872-8>.
- Chen J, Cui L, Lu S, Xu S. Amino acid metabolism in tumor biology and therapy. *Cell Death and Disease*. 2024;15:42. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06435-w>.
- Gałęzowska G, Ratajczyk J, Wolska L. Determination of amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography: Critical review. *Amino Acids*. 2021;53:993–1009. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03002-x>.
- Ksenofontov AL, Boyko AI, Mkrtchyan GV, Tashlitsky VN, Timofeeva AV, Graf AV, Bunik VI, Baratova LA. Analysis of free amino acids in mammalian brain extracts. *Biochemistry Moscow*. 2017;82(10):1183–1192. <https://doi.org/10.1134/>
- Pereira V, Pontes M, Câmara JS, Marques JC. Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure. *J. Chromatogr A*. 2008;1189(1–2):435–443. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.014>.
- Cuchiaro H, Laurens LML. Total Protein Analysis in Algae via Bulk Amino Acid Detection: Optimization of Amino Acid Derivatization after Hydrolysis with O-Phthalaldehyde 3-Mercaptopropionic Acid (OPA-3MPA). *J. Agric. Food Chem.* 2019;67(19):5672–5679. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00884>.
- Hall AE, Moraru CI. Comparative effects of high pressure processing and heat treatment on in vitro digestibility of pea protein and starch. *Science of Food*. 2022;6(1):1–12. <https://doi.org/10.1038/s41538-021-00116-0>.

8. Tanwar S, Bhushan R. Enantioresolution of Amino Acids: A Decade's Perspective, Prospects and Challenges. *Chromatography*. 2015;78:1113–1134. <https://doi.org/10.1007/s10337-015-2933-8>.
9. Ilisz I, Péter A, Lindner W. State-of-the-art enantioseparations of natural and unnatural amino acids by high-performance liquid chromatography. *Trends Anal. Chem.* 2016;81:11–22. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.016>.
10. Grishin DV, Zhdanov DD, Pokrovskaya MV, Sokolov NN. D-amino acids in nature, agriculture and biomedicine. *All Life*. 2019;13(1):11–22. <https://doi.org/10.1080/21553769.2019.1622596>.
11. Uifălean A, Iacobescu M, Salantă LC, Heghes SC, Moldovan R-C, Iuga C-A. Biological and Analytical Perspectives on D-Amino Acids in Cancer Diagnosis and Therapy. *Pharmaceuticals*. 2025;18:705. <https://doi.org/10.3390/ph18050705>.
12. Pollegioni L, Kustrimovic N, Piubelli L, Rosini E, Rabattoni V, Sacchi S. d-amino acids: new functional insights. *The FEBS Journal*. 2025. doi: 10.1111/febs.70083.
13. Nemoto A, Horie M, Imai EI, Honda H, Hatori K, Matsuno K. Enantiomeric Excess of Amino Acids in Hydrothermal Environments. *Orig. Life Evol. Biosph.* 2005;35:167–174. <https://doi.org/10.1007/s11084-005-0638-y>.
14. Jiang L, Dziedzic P, Spacil Z, Zhao GL, Nilsson L, Ilag LL, Córdova A. Abiotic synthesis of amino acids and self-crystallization under prebiotic conditions. *Scientific Reports*. 2014;4:1–6. <https://doi.org/10.1038/srep06769>.
15. Kimura T, Hamase K, Miyoshi Y, Yamamoto R, Yasuda K, Mita M, Rakugi H, Hayashi T, Isaka Y. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. *Scientific Reports*. 2016;6:26137. <https://doi.org/10.1038/srep26137>.
16. Chang X, Zhang Y, Chen X, Li S, Mei H, Xiao H, Ma X, Liu Z, Li R. Gut microbiome and serum amino acid metabolome alterations in autism spectrum disorder. *Scientific Reports*. 2024;14:4037. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54717-2>.
17. Lella C, Nestor L, De Bundel D, Vander Heyden Y, Van Eeckhaut A. Targeted Chiral Metabolomics of D-Amino Acids: Their Emerging Role as Potential Biomarkers in Neurological Diseases with a Focus on Their Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis upon Chiral Derivatization. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(22):12410. <https://doi.org/10.3390/ijms252212410>.
18. Nimura N, Kinoshita T. o-Phthalaldehyde – N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis. *J Chromatogr A*. 1986;352:169–177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83377-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83377-X).
19. García Alvarez-Coque MC, Medina Hernández MJ, Villanueva Camañas RM, Mongay Fernández C. Studies on the formation and stability of isoindoles derived from amino acids, o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine. *Anal. Biochem.* 1989;180(1):172–176. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90107-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90107-3).
20. Švedas VJK, Galaev IJ, Borisov IL, Berezin IV. The interaction of amino acids with o-phthalaldehyde: a kinetic study and spectrophotometric assay of the reaction product. *Anal. Biochem.* 1980;101:188–195. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90059-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90059-7).
21. Meyer MW, Meyer VR, Ramseyer S. The kinetics of diastereomeric amino acids with o-phthalaldehyde. *Chirality*. 1991;3(6):471–475. <https://doi.org/10.1002/chir.530030611>.
22. Brückner H, Westhauser T, Godel H. Liquid chromatographic determination of d- and l-amino acids by derivatization with o-phthalaldehyde and N-isobutyryl-L-cysteine applications with reference to the analysis of peptidic antibiotics, toxins, drugs and pharmaceutically used amino acids. *J Chromatogr A*. 1995;711(1):201–215. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00158-J](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00158-J).
23. Nimura N, Fujiwara T, Watanabe A, Sekine M, Furuchi T, Yohda M, Yamagishi A, Oshima T, Homma H. A novel chiral thiol reagent for automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and its application to the aspartate racemase assay. *Anal. Biochem.* 2003;315:262–269. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00705-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00705-4).
24. Buck RH, Krummen K. High-performance liquid chromatographic determination of enantiomeric amino acids and amino alcohols after derivatization with ophthalaldehyde and various chiral mercaptans. *J Chromatogr A*. 1987;387:255–265. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94529-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94529-7).
25. Шаповалова ИВ, Гуранда ДТ, Швядас ВК. Новое N-ацильное производное (S)-цистеина для количественного определения энантиомеров аминосоединений методом ВЭЖХ с предколоночной модификацией орто-фталевым альдегидом. *Биоорганическая химия*. 2004;30(5):451–457.
26. Guranda DT, Kudryavtsev PA, Khimiuk AY, Švedas VK. Efficient enantiomeric analysis of primary amines and amino alcohols by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization using novel chiral SH-reagent N-(R)-mandelyl-(S)-cysteine. *J Chromatogr A*. 2005;1095(1-2):89–93. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.125>.
27. Chernobrovkin MG, Shapovalova EN, Guranda DT, Kudryavtsev PA, Švedas VK, Shpigun OA. Chiral high-performance liquid chromatography analysis of α -amino acid mixtures using a novel SH reagent-N-R-mandelyl-L-cysteine and traditional enantiomeric thiols for precolumn derivatization. *J Chromatogr A*. 2007;1175(1):89–95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.034>.
28. Lkhagva A, Tai H-C. Dimethylcysteine (DiCys)/o-Phthalaldehyde Derivatization for Chiral Metabolite Analyses: Cross-Comparison of Six Chiral Thiols. *Molecules*. 2021;26(24):7416. <https://doi.org/10.3390/molecules26247416>.
29. Naghashian-Haghig A, Hemmateenejad B, Shamsipur M. Determination of enantiomeric excess of some amino acids by second-order calibration of kinetic-fluorescence data. *Anal. Biochem.* 2018;550:15–26. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.04.004>.
30. Сычев КС. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. Москва: Техносфера; 2010:192–197.
31. Cecchi T. Ion Pairing Chromatography. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2008;38(3):161–213. <https://doi.org/10.1080/10408340802038882>.
32. Sagi-Kiss V, Li Y, Carey MR, Grover SJ, Siems K, Cirulli F, Berry A, Musillo C, Wilson ID, Want EJ, Bundy JG. Ion-Pairing Chromatography and Amine Derivatization Provide Complementary Approaches for the Targeted LC-MS Analysis of the Polar Metabolome. *J. Proteome Res.* 2022;21:1428–1437. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00030>.
33. Сапрыкин ЛВ, Сапрыкина ЛВ. Некоторые аспекты практического применения динамического модифицирования в ВЭЖХ на силикагелевых сорбентах. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2006;6(2):284–301.

УДК 57.017, 57.043

Исследование потенциала пептидного препарата Семакс и его производного для коррекции патологических нарушений в животной модели болезни Альцгеймера

А. И. Радченко¹, Е. В. Кузбова¹, А. А. Апостол¹, В. А. Миткевич^{2*}, Л. А. Андреева³, С. А. Лимборская³, Ю. В. Степенко¹, В. С. Шмигерева¹, А. В. Солин¹, М. В. Корокин¹, М. В. Покровский¹, Н. Ф. Мясоедов³, А. А. Макаров²

¹ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, 308015 Россия

²ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

³ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182 Россия

*E-mail: mitkevich@gmail.com

Поступила в редакцию 03.09.2025

Принята к печати 29.09.25

DOI: 10.32607/actanaturae.27808

РЕФЕРАТ Болезнь Альцгеймера – одно из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний настоящего времени, значимость которого все более возрастает по мере старения населения, была описана более 100 лет назад. За все время ее изучения не удалось подобрать средства, которые были терапевтически эффективными или существенно замедляли патологический процесс, будучи при этом достаточно безопасными. В этой связи значительное внимание обращено на разработку и применение пептидных препаратов, имеющих природное происхождение и не вызывающих побочных эффектов. В настоящей работе определено действие известного нейропротективного пептида Семакс и его производного на поведенческие характеристики и развитие амилоидоза у трансгенных мышей линии APPswe/PS1dE9/Blg, являющихся моделью болезни Альцгеймера. С использованием тестов «Открытое поле», «Распознавание нового объекта» и «Лабиринт Барнса» обнаружено улучшение когнитивных функций у мышей под действием как Семакса, так и его производного. Гистологическое исследование показало, что данные пептиды снижают число амилоидных включений в коре и гиппокампе головного мозга животных. Полученные результаты показывают перспективность использования Семакса и его производных для разработки методов лечения и коррекции болезни Альцгеймера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Альцгеймера, пептидный препарат, поведенческое тестирование, гистологический анализ, амилоидоз.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – болезнь Альцгеймера; Аβ – бета-амилоидный пептид; APP/PS1 – трансгенные мыши линии APPswe/PS1dE9/Blg; АКТГ(4–7) – фрагмент адренокортикотропного гормона; Гептапептид – пептид Met-Glu-Asp-Arg-Pro-Gly-Pro; WT – дикий тип, мыши линии C57Bl6/Chg.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) на сегодняшний день занимает одну из лидирующих позиций в нейродегенеративных заболеваниях пожилого и старческого возраста [1–4]. Прогрессирующая форма БА может вызываться церебральными нарушениями, интоксикацией, инфекцией, дефектами в легочной и кро-

веносной системах, которые вызывают снижение поступления кислорода в мозг, дефицитом питательных веществ и витамина В12, опухолями [5–8]. БА является наиболее распространенным типом деменции и может быть определена как медленно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся формированием сенильных

бляшек и нейрофибриллярных клубков в результате накопления бета-амилоидного пептида ($\text{A}\beta$) и белка тау в наиболее пораженной области мозга, медиальной височной доле и неокортикальных структурах [9–11].

На сегодняшний день рынок лекарственных препаратов, применяемых для лечения болезни Альцгеймера, достаточно мал [12, 13]. В связи с этим постоянно идет поиск новых субстанций, с помощью которых можно минимизировать снижение когнитивных функций, обусловленное прогрессированием заболевания [14, 15].

Важную роль в этих исследованиях играют животные модели БА, позволяющие детально изучать действие препаратов на ключевые характеристики заболевания. Одной из таких линий являются трансгенные мыши APPswe/PS1dE9/Blg (APP/PS1), используемые для изучения механизмов БА и способов их коррекции [16].

Большое значение в настоящее время придается разработке лекарств на основе природных регуляторных пептидов, которые обладают мягким действием и отсутствием значительных побочных эффектов [17]. Особое внимание привлекает Семакс – одно из известных и давно используемых лекарственных средств пептидной природы Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro. Семакс является гибридной молекулой, содержащей в своем составе фрагмент адренокортикотропного гормона АКТГ(4–7) и трипептид Pro-Gly-Pro, обеспечивающий повышенную устойчивость соединения к действию пептидаз. Семакс не обладает гормональной активностью, входит в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения» (Приложение № 1 к распоряжению Правительства РФ от 12 октября 2019 г. № 2406-р). Он используется для лечения неврологических патологий и стрессовых состояний. Обладает ноотропным действием, стимулирующим процессы обучения, внимания и формирования памяти у животных и людей [18–22]. Именно это свойство привлекательно для использования в терапии БА. Предварительное испытание Семакса на ограниченном контингенте больных БА показало возможность его применения для профилактики и лечения болезни Альцгеймера [23]. Однако для широкого внедрения препарата необходимо дальнейшее, более подробное исследование его действия на различные характеристики БА [24, 25]. Кроме того, целесообразно исследовать и другие производные данного пептидного препарата, учитывающие в своей структуре особенности, способные улучшить физиологические свойства потенциального лекарственного средства. В данной ра-

боте использован пептид, являющийся производным от Семакса, в последовательности которого произведены две замены (His-Phe на Asp-Arg) привели к появлению внутри его структуры сочетания Glu-Asp-Arg. Ранее с использованием клеточных моделей БА была показана позитивная роль трипептида Glu-Asp-Arg в улучшении функционального состояния нейронов [26].

В представленной работе исследовали действие Семакса и его производного, Гептапептида Met-Glu-Asp-Arg-Pro-Gly-Pro, на поведение мышей линии APP/PS1 и амилоидную нагрузку в тканях головного мозга с целью определения терапевтического потенциала этих пептидов при развитии патологии Альцгеймеровского типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные

Эксперименты проведены с использованием 60 самцов мышей линии APPswe/PS1dE9/Blg (APP/PS1) на смешанном генетическом фоне с животными C57Bl6/Chg и 20 самцов линии C57Bl6/Chg (дикий тип, WT). Условия содержания животных соответствовали действующим санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Животных содержали по 10 особей в клетке при температуре 22°C, с постоянным наличием воды и корма, с 12-часовым дневным освещением (с 8 до 20 ч). Лабораторные животные со статусом «свободно от специфических патогенов» (SPF) были получены на базе НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ» (г. Белгород). При работе соблюдались требования Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 24.06.1998 года, правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ Р 53434-2009) и директивы Европейского сообщества (86/609 ЕС). Все этапы работы проведены с соблюдением правила 3R Берча–Рассела.

Синтез пептидов и их характеристики

Пептид Met-Glu-Asp-Arg-Pro-Gly-Pro (Гептапептид) на основе адренокортикотропного гормона синтезировали методами классической пептидной химии в растворе с использованием защищенных и свободных L-аминокислот. Индивидуальность полученного соединения подтверждали высокоеэффективной жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией.

Семакс – синтетический пептидный препарат, являющийся аналогом АКТГ4–10, полностью лишенный гормональной активности, был получен как описано ранее [4, 18, 25]. Все аминокислоты L-формы.

Схема эксперимента

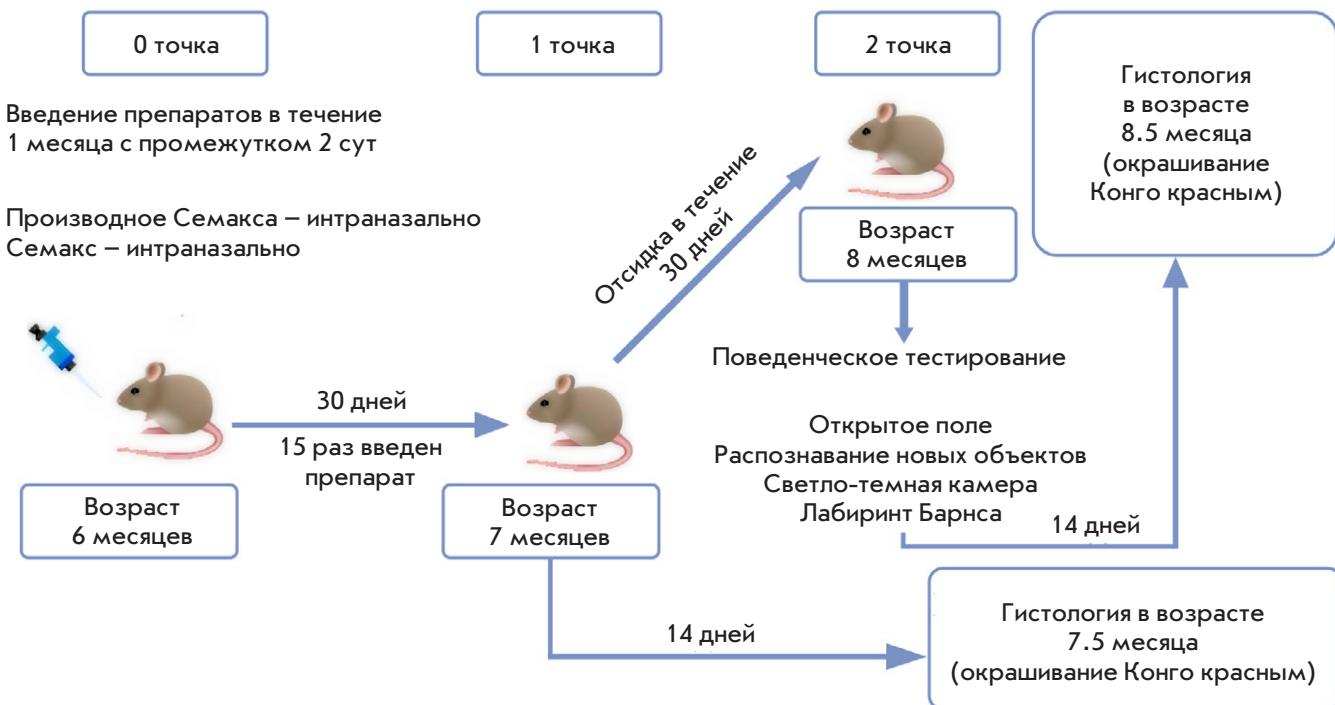


Рис. 1. Схема эксперимента исследования действия Семакса и Гептапептида на мышах линии APP/PS1

Формирование экспериментальных групп

В ходе исследования были сформированы четыре экспериментальные группы мышей. Первая группа (группа «APP/PS1») является положительным контролем, в нее входили животные линии APP/PS1 с подтвержденными проявлениями патологии Альцгеймеровского типа. Вторая группа (группа «WT») – отрицательный контроль – животные дикого типа. В третью и четвертую группы входили животные линии APP/PS1, которым, начиная с возраста 6 месяцев, интраназально вводили Семакс (группа «Семакс») или его производное (группа «Гептапептид») в дозировке 50 мкг на 1 кг. Препараты вводили животным в течение одного месяца с временным промежутком 1 раз в 2 сут (всего 15 введений). Затем группы животных делили пополам. Первая половина животных каждой группы (по 10 особей) была направлена на гистологические исследования в возрасте 7.5 месяца. Вторая половина животных находились в отсидке без введения препаратов в течение 1 месяца. В возрасте 8 месяцев эти животные были протестированы в поведенческих установках в течение 14 дней. Были проведены тесты: «Открытое поле», «Распознавание нового

объекта» и «Лабиринт Барнса». По окончании тестирования проводили гистологические исследования срезов мозга животных (рис. 1).

Поведенческое тестирование

Тест «Открытое поле». Данный тест позволяет оценить двигательную активность, исследовательскую реакцию и тревожность животных. Животных помещали на арену с основанием 50 × 50 см, выполненную из непрозрачного оргстекла с высотой стенок 50 см (OpenScience, Россия). Тестирование одной мыши проводили в течение 5 мин при домашнем освещении – 35–40 Лк. При проведении теста в онлайн-режиме фиксировали: общее число передвижений животного; общее время движения в секундах; общее пройденное расстояние (см); средняя скорость всех передвижений (см/с); время покоя (с); расстояние пробежек по периферии (см); общее время пробежек по периферии (с); расстояние пробежек в центре (см); время в центре (с); число пересечений центра. Для записи и обработки данных использовали программное обеспечение EthoVision (Версия 16, Нидерланды).

Тест «Распознавание нового объекта». Тест используется для оценки когнитивных функций животных, в частности памяти, путем определения предпочтения животного нового объекта знакомому. Тест разделен на 3 фазы: привыкание, обучение и адаптация, фаза тестирования. Первым днем теста «Распознавание нового объекта» является тест «Открытое поле». На второй день теста животное также помещали на арену на 5 мин, при этом в определенные зоны ставили два объекта (игрушки) одинакового цвета. На третий день животное также помещали на арену на 5 мин, при этом один из объектов заменяли новым другого цвета. При помощи программного обеспечения EthoVision фиксировали следующие показатели: двигательная активность, количество подходов к новому и старому объекту и время, проведенное возле них. После анализа данных рассчитывали индекс предпочтения нового объекта по формуле:

$$PI = \frac{b}{b + a} \cdot 100\%,$$

где a – количество подходов к старому объекту;
 b – количество подходов к новому объекту.

Тест «Лабиринт Барнса». Данный тест использовали для исследования пространственного обучения и памяти животного. Цель теста «Лабиринт Барнса» – исследование мышью пространства, запоминание местоположения выхода с использованием конфигурации дистальных визуальных сигналов, расположенных вокруг области тестирования. Установка представляет собой арену диаметром 122 см, которая содержит 40 отверстий диаметром 5 см, одно из которых является выходом (убежище). Дистальные визуальные сигналы – это четыре черно-белые картинки с различными фигурами и узорами, которые расположены в разных частях света: север, юг, запад, восток.

Тест «Лабиринт Барнса» проводили в течение 5 дней, четыре из которых тренировочные и обучающие, пятый день является тестовым. В течение четырех дней животных помещали на арену на 3 мин. По прошествии этого времени, если грызун сам находил убежище, то норку вместе с мышью вытаскивали и аккуратно переносили в домашнюю клетку, если же животное не могло самостоятельно найти убежище, тогда экспериментатор помогал ему в этом, осторожно подталкивая к норке. У каждого грызуна в течение одного обучающего дня было четыре попытки с промежутком 15 мин. На пятый день норку удаляли и отверстие закрывали перегородкой. Животное помещали на арену на 5 мин. При помощи программного обеспечения EthoVision

фиксировали пройденное расстояние, скорость, время нахождения выхода и время, проведенное в зоне убежища.

Гистология

Животных подвергали эвтаназии цервикальной дислокацией и препарировали ткани для анализа. Диссектировали мозг и фиксировали в растворе Карнua (6 частей 96% этилового спирта, 3 части хлороформа, 1 часть ледяной уксусной кислоты) в течение ночи. Дегидратировали ткань в последовательной серии растворов этанола с увеличивающейся концентрацией: 75% 1 ч, 96% (I) 5 мин, 96% (II) 45 мин, 100% (I) 5 мин, 100% (II). Далее инкубировали в течение 30 мин в смеси 100% этиловый спирт–хлороформ (1:1), 1 ч хлороформ (I), оставляли на ночь в хлороформе (II), после чего ткани пропитывали парафином (3 смены по 1 ч) при 600°C. Парафиновые блоки подготавливали на станции для заливки Leica EG1160 (Leica Biosystems). Парафиновые срезы толщиной 8 мкм монтировали на предметные стекла с полилизиновым покрытием.

Из зоны мозга толщиной 400 мкм формировали пять стекол, содержащих 10 срезов мозга, на каждое предметное стекло помещали каждый пятый срез мозга. Далее срезы депарафинизировали в течение 20 мин в ксиоле, регидратировали последовательной инкубацией в растворах этанола: 10 мин в 100%, 5 мин – 95%, 5 мин – 50%, далее 3 раза по 5 мин промывали в деионизованной воде. Срезы окрашивали раствором красителя Конго красный (0.5% Конго красного в 50% этиловом спирте) в течение 5 мин и дифференцировали в растворе 0.2% КОН в 80% этиловом спирте в течение 1 мин, промывали 3 раза по 5 мин в деионизованной воде и заключали в среду на водной основе Immu-MountTM (Thermo Scientific).

После проведения фиксации мозга, дегидратации, инкубации и пропитывании парафином производили нарезку ткани и ее окрашивание в Конго красном. В ходе исследования подсчитывали общее число бляшек в каждой группе на всех срезах мозга в зоне коры и гиппокампа и рассчитывали среднее арифметическое значение. Подсчет амилоидных бляшек проводили в программе QuPath v0.5.1.

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных использованы методы описательной статистики. Все поведенческое тестирование имело параметрическое распределение по Н-критерию Крускала–Уоллиса. Для межгруппового сравнения в тесте «Лабиринт Барнса» применяли дисперсионный анализ (2 way-

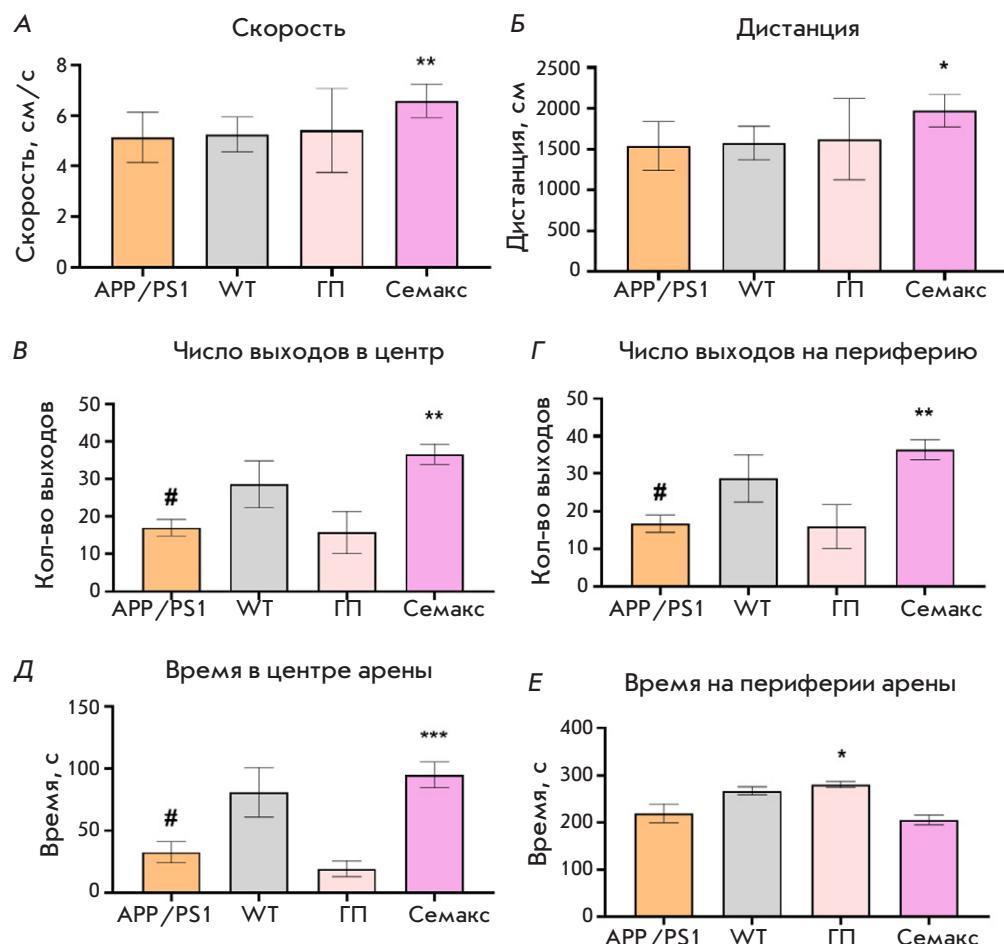


Рис. 2. Результаты тестирования «Открытое поле». Скорость передвижения (A), пройденная дистанция (B), число выходов в центр арены (C), число выходов на периферию арены (Г), время, проведенное в центре арены (Д), время, проведенное на периферии арены (Е). Здесь и далее: APP/PS1 (APPswe/PS1dE9/Blg), WT (животные дикого типа), ГП (животные APP/PS1, получавшие Гептапептид), Семакс (животные APP/PS1, получавшие Семакс); * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (по отношению групп с препаратами к мышам линии APP/PS1), # – $p > 0.05$ (по отношению мышей линии APP/PS1 к животным дикого типа) (Н-критерий Крускала–Уоллиса). Количество животных в каждой группе, $n = 10$

ANOVA) с использованием обобщенных линейных моделей (GLM). Межгрупповые сравнения изменений переменных результатов в гистологии проводили по критерию Колмогорова–Смирнова. Также для контроля частоты ошибок первого рода при множественной проверке гипотез использовали поправку Сидака, которая корректирует критерий значимости в зависимости от количества запланированных сравнений. Различия определяли на уровне значимости 0.05. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние Семакса и Гептапептида на поведение животных

На первом этапе исследования было оценено поведение мышей в teste «Открытое поле» (рис. 2). Сравнительный анализ поведения животных из групп WT и APP/PS1 показал, что развитие патологии у мышей APP/PS1 приводит к статистически значимому снижению числа их выходов в центр

арены, выходов на периферию арены и времени, проведенному в центре арены. Все указанные нарушения в поведении APP/PS1 животных были предотвращены введением препарата Семакс. Кроме того, введение Семакса привело к тому, что животные стали в целом более активными. Увеличились скорость и расстояние, пройденное животными. Введение Гептапептида привело к статистически значимому, в сравнении с группой животных APP/PS1, увеличению времени, проведенному на периферии арены. При этом Гептапептид не влиял статистически значимо на скорость, дистанцию, число выходов на периферию и в центр арены и время, проведенное в центре.

Далее был проведен тест «Распознавание нового объекта» (рис. 3). На третий день теста животные из группы APP/PS1 проходили большее расстояние и имели большую скорость передвижения, чем животные группы WT. В то же время интерес к исследованию нового объекта у мышей APP/PS1 был достоверно ниже, чем у мышей дикого типа. Индекс предпочтения между этими двумя группами не различался.

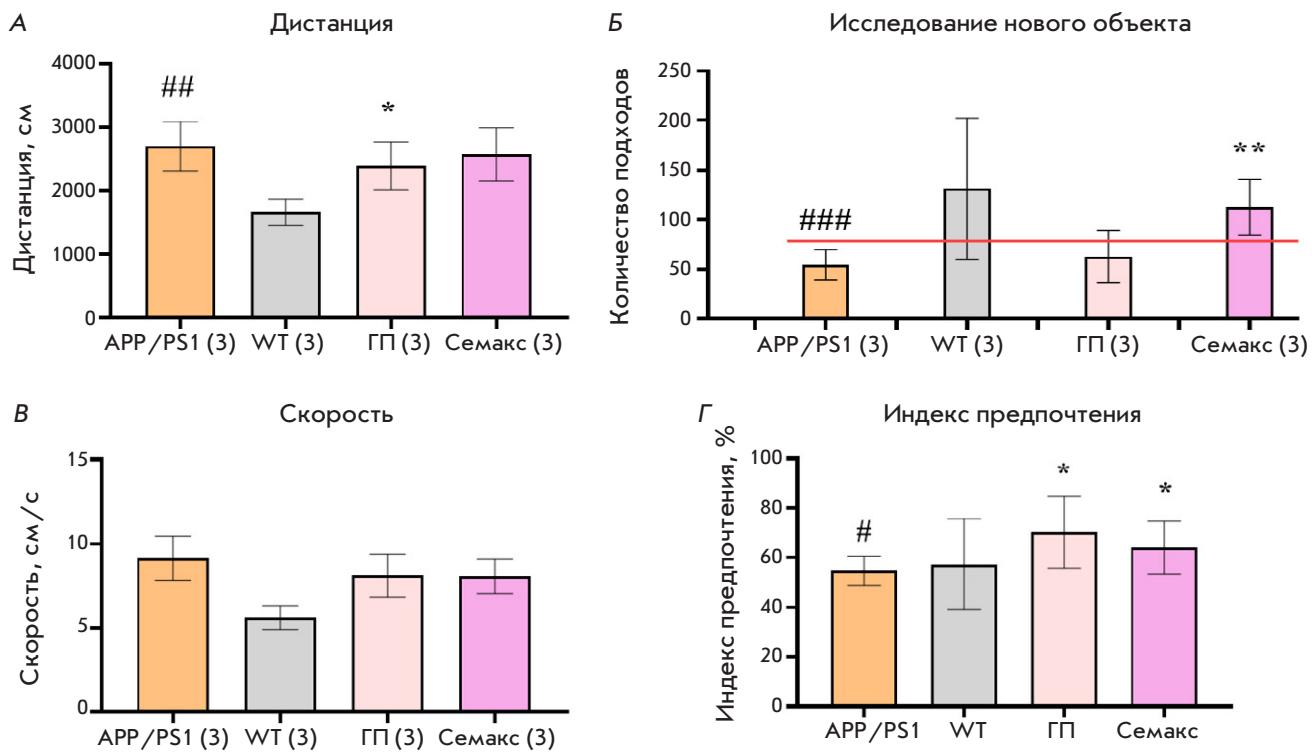


Рис. 3. Результаты тестирования «Распознавание нового объекта» на третий день. Пройденная дистанция (A), количество подходов к новой игрушке на третий день (B), скорость передвижения (C), индекс предпочтения (D); * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ (по отношению групп с препаратами к мышам линии APP/PS1), # – $p > 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (по отношению мышей линии APP/PS1 к животным дикого типа) (Н-критерий Крускала–Уоллиса). $n = 10$

Введение Гептапептида не повлияло на скорость животных, проходимую ими дистанцию и исследование нового объекта. Однако индекс предпочтения у этих животных вырос почти на 30% по сравнению с мышами APP/PS1. Введение Семакса статистически значимо повышало у животных интерес к новому объекту и индекс предпочтения нового объекта.

Следующим был проведен тест «Лабиринт Барнса». На первом этапе тестирования животные обучались в течение 4 дней (рис. 4). Скорость и пройденное расстояние у всех исследуемых групп статистически не различались за исключением животных, принимавших Семакс. Введение данного препарата статистически значимо повысило скорость и позволило пройденное животными расстояние. На второй и третий день теста у этих животных отмечено достоверное снижение латентного времени нахождения убежища, однако на четвертый день теста они показали ухудшение результатов.

На пятый день теста «Лабиринт Барнса» проводили тестовый экспериментальный заход животных на арену, результаты которого представлены на рис. 5. Животные линии APP/PS1 проходили большее расстояние, имели большую скорость пере-

движения, а также медленнее находили зону «убежища», чем животные дикого типа.

Введение Гептапептида привело к статистически значимому, в сравнении с группой животных линии APP/PS1, уменьшению пройденной дистанции и скорости, повышению времени, проведенного в зоне «убежища», а также к снижению латентного периода нахождения «убежища». При этом Гептапептид статистически значимо не влиял на количество заходов в зону «убежища». Препаратор Семакс статистически значимо снижал скорость и расстояние, время в зоне «убежища», количество заходов в зону «убежища», а также латентный период нахождения зоны «убежища». Таким образом, введение как Гептапептида, так и Семакса привело к выраженной коррекции поведенческих параметров животных линии APP/PS1 до уровня, сопоставимого с показателями у животных дикого типа.

Результаты гистологических исследований

Гистологическое исследование проводилось с целью оценить влияние введения препаратов Семакс и Гептапептид на развитие амилоидоза у мышей APP/PS1. Эксперименты были проведены в двух

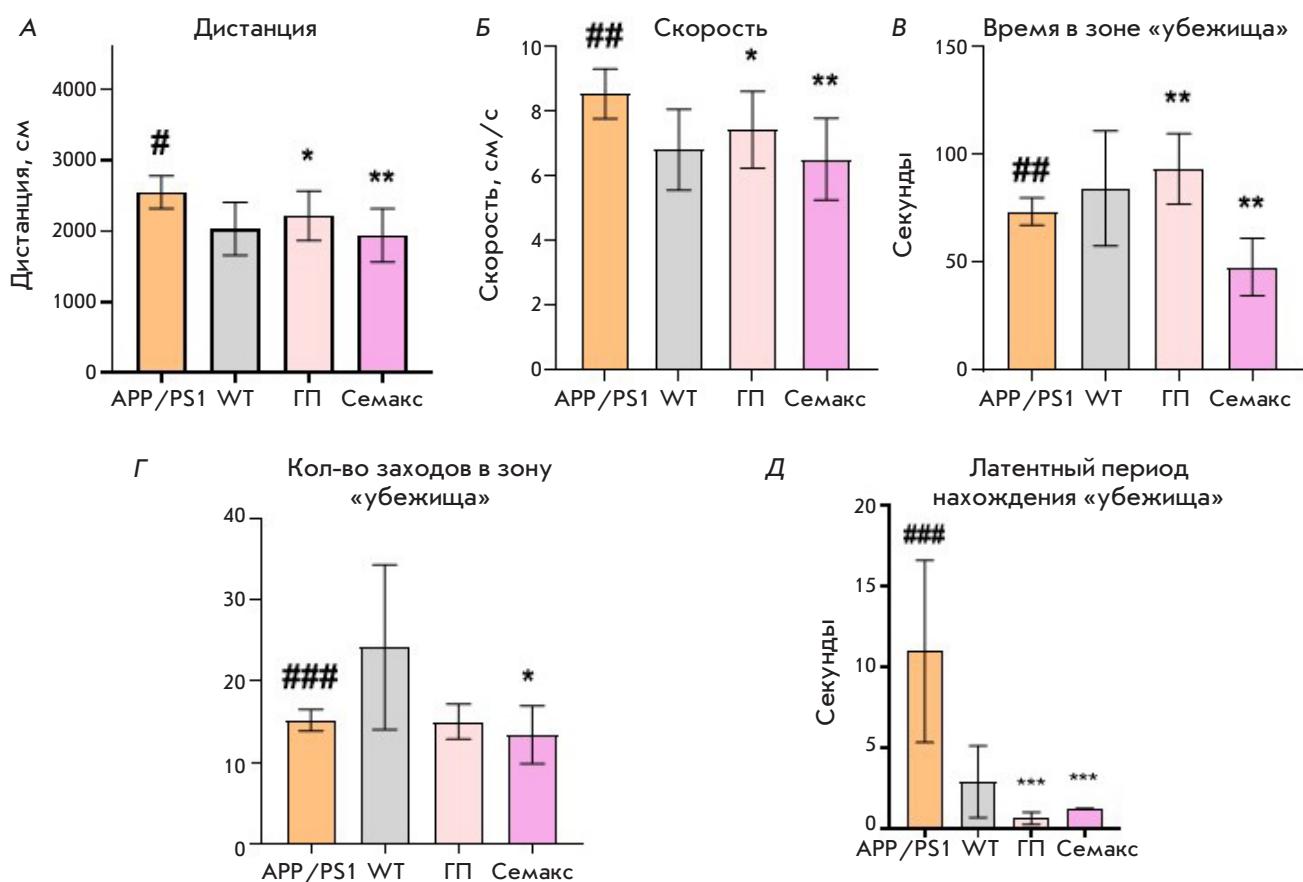
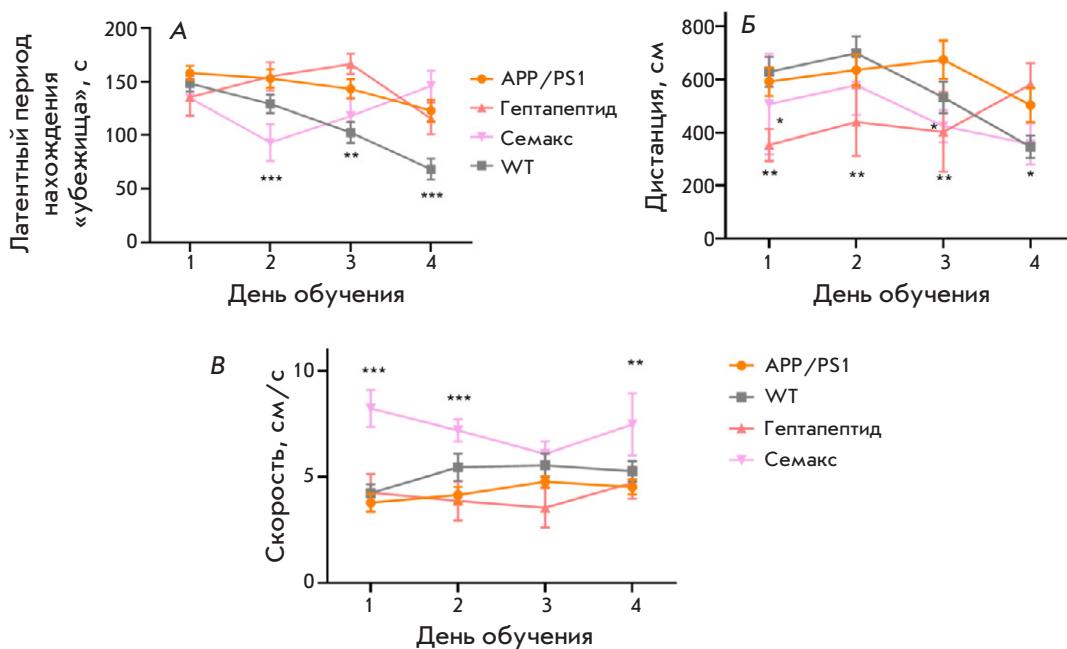


Рис. 5. Результаты тестирования «Лабиринт Барнса» (5 день). Пройденное расстояние (А), скорость передвижения (Б), время, проведенное в зоне «убежища» (В), количество заходов в зону «убежище» (Г), латентный период нахождения зоны «убежища» (Д); * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (по соотношению групп с препаратами и мышью линии APP/PS1), # – $p > 0.05$, ## – $p < 0.01$, ##### – $p < 0.001$ (по соотношению мышь линии APP/PS1 и животных дикого типа) (Н-критерий Крускала–Уоллиса). $n = 10$

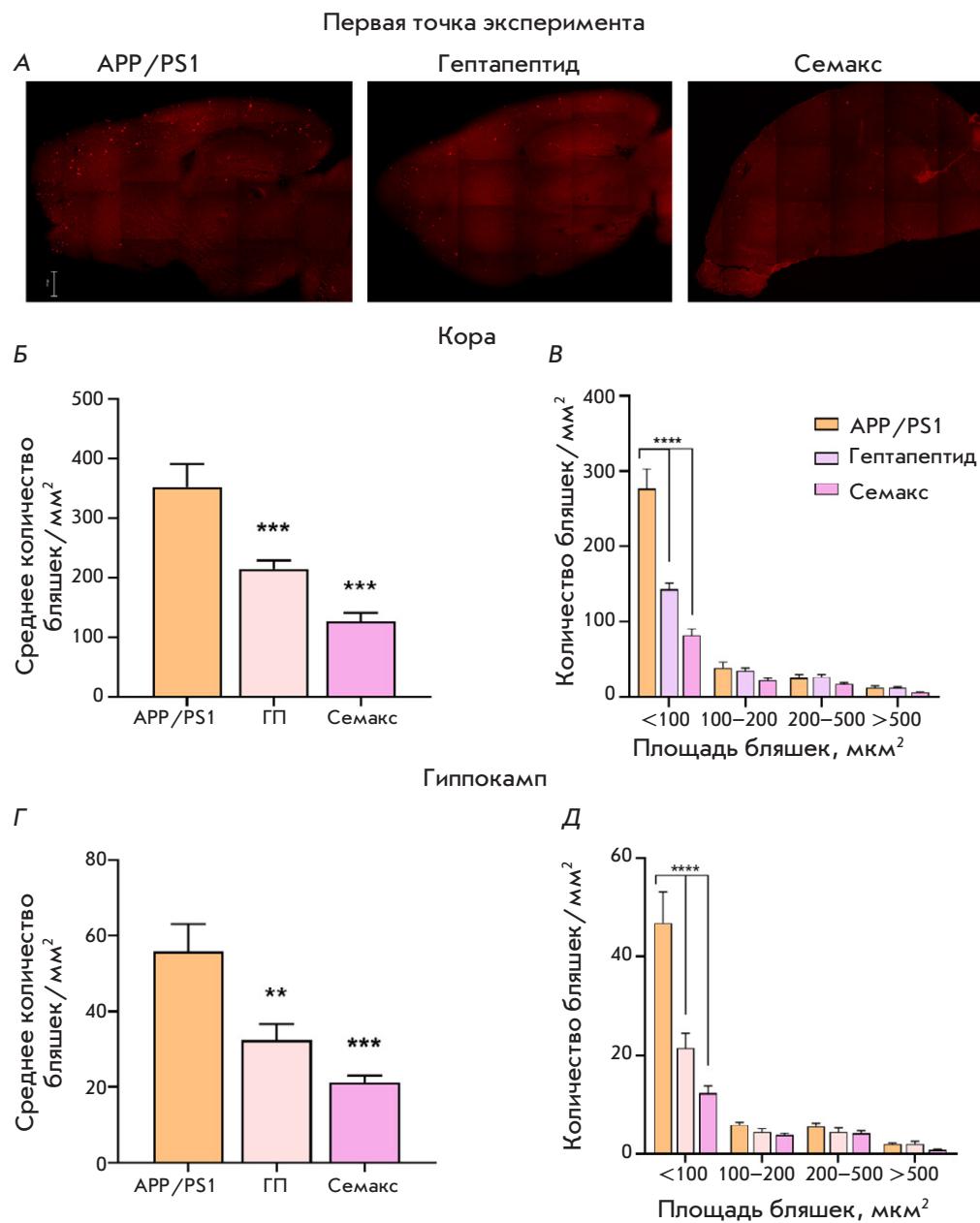


Рис. 6. Результаты гистологического исследования мышей APP/PS1 в возрасте 7.5 месяца (А). Репрезентативные микрофотографии срезов головного мозга контрольных животных, которым вводили Гептапептид и Семакс. Амилоидные бляшки окрашены в ярко-красный цвет. Масштабная линейка: 500 мкм. Среднее число амилоидных бляшек (Б, Г) и распределение бляшек по размерам (В, Д) в мозге мышей линии APP/PS1 в коре (Б, Г) и гиппокампе (Д) на первой точке эксперимента. ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.001$ Критерий Колмогорова–Смирнова, **** – $p < 0.0001$, поправка Сидака на множественные сравнения. $n = 10$**

временных точках: установлен уровень амилоидных бляшек в мозге животных через 2 недели после введения препаратов (возраст 7.5 месяца) и через полтора месяца (возраст 8.5 месяца).

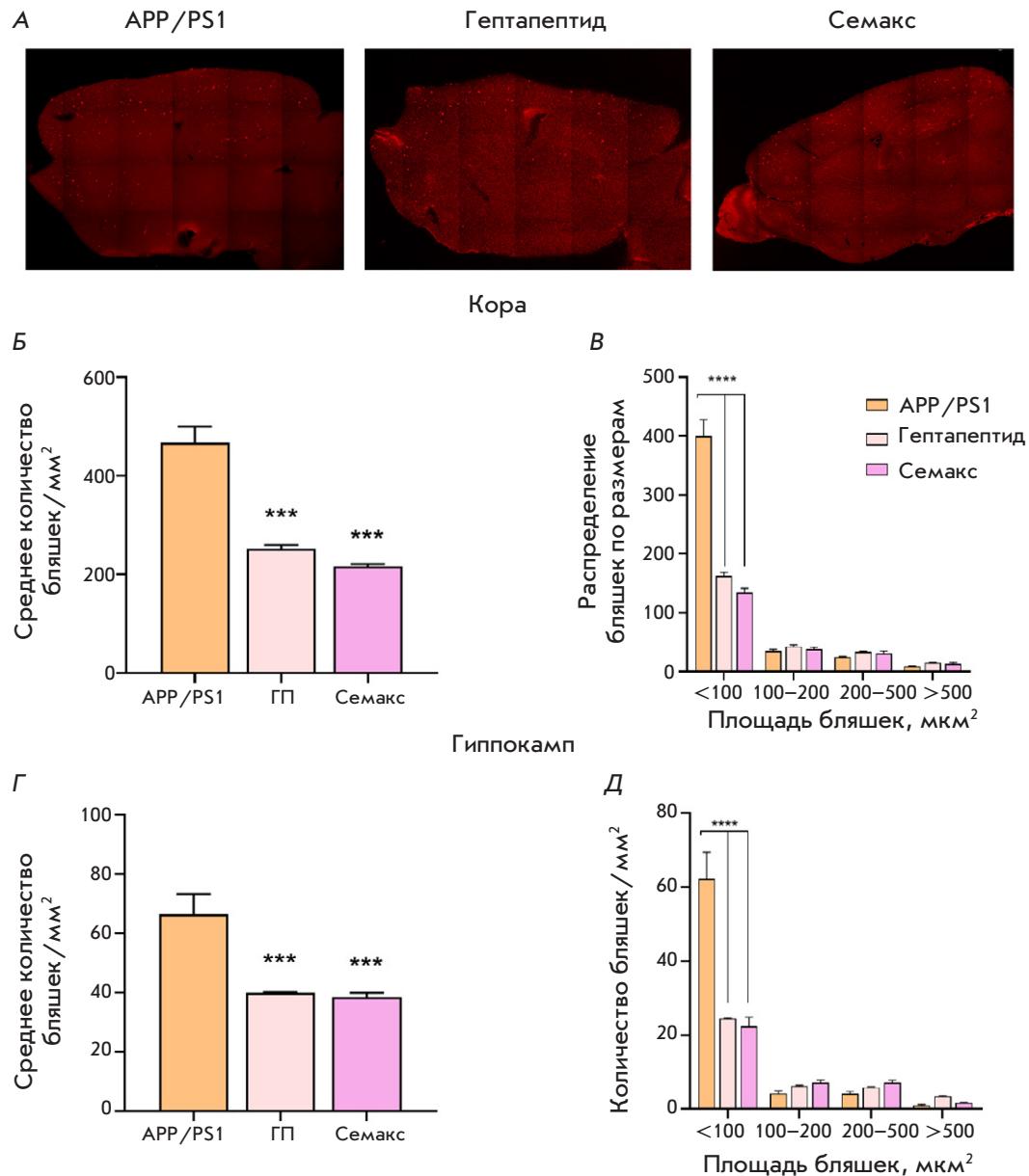
У животных 7.5 месяца терапия препаратами Гептапептид и Семакс привела к снижению количества амилоидных бляшек в зоне коры в 1.6 и 2.8 раза соответственно, по сравнению с животными, не получающими препараты (рис. 6). Анализ распределения амилоидных бляшек по размерам показал, что основная их часть представлена включениями размером менее 100 мкм^2 – это включения, которые образовались в недавнем времени и с возрастом они будут только увеличиваться.

Гептапептид и Семакс значительно снизили представленность именно этой популяции бляшек.

Анализ амилоидных бляшек в зоне гиппокампа показал такую же тенденцию, как в коре (рис. 6). Количество амилоидных включений у мышей в группе «Гептапептид» было в 1.7 раза меньше, чем у группы «APP/PS1», в группе «Семакс» в 2.6 раза меньше. В наибольшей степени снижение количества бляшек под действием препаратов затронуло популяцию амилоидных включений площадью до 100 мкм^2 .

У животных APP/PS1 в возрасте 8.5 месяца значительно возросло количество амилоидных бляшек как в коре, так и в гиппокампе (рис. 7). При этом защитное действие Гептапептида и Семакса сохрани-

Вторая точка эксперимента



лось практически на том же уровне, как и у животных в возрасте 7.5 месяца. Количество амилоидных включений в коре мышей в группе «Гептапептид» было в 1.8 раза меньше, чем в группе «APP/PS1», в группе «Семакс» в 2.2 раза меньше. У мышей группы «Гептапептид» бляшек в гиппокампе было в 1.6 раза меньше, чем в группе «APP/PSEN1», в группе «Семакс» – в 1.7 раза меньше. Анализ распределения амилоидных бляшек выявил наибольшее снижение числа бляшек размером до 100 мкм² у получавших препараты мышей в возрасте как 7.5, так и 8.5 месяца.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пептид Семакс, обладающий нейропротекторными и ноотропными свойствами, является стимулятором памяти пролонгированного действия [17]. Предложенные нами модификации Семакса, в результате которых был получен Гептапептид, предположительно могли усилить влияние пептида на основные патологические признаки БА.

Тестирование поведения животных показало, что у мышей APP/PS1 по сравнению с мышами дикого типа значительно ухудшены поведенческие и когнитивные характеристики. После курсового

Рис. 7. Результаты гистологического исследования мышей APP/PS1 в возрасте 8.5 месяца. Репрезентативные микрофотографии срезов головного мозга контрольных животных и мышей, которым вводили Гектапептид и Семакс (А). Амилоидные бляшки окрашены в ярко-красный цвет. Среднее число амилоидных бляшек (Б, Г) и распределение бляшек по размерам (В, Д) в мозге мышей линии APP/PS1 в коре (Б, В) и гиппокампе (Г, Д) на первой точке эксперимента. *** – $p < 0.001$ Критерий Колмогорова–Смирнова, **** – $p < 0.0001$, поправка Сидака на множественные сравнения). $n = 10$

введения препаратов пептидов многие из них были полностью или частично восстановлены. В тестах «Открытое поле» и «Распознавание нового объекта» значимый позитивный эффект продемонстрировал Семакс. В случае теста «Лабиринта Барнса» Гептапептид улучшал некоторые поведенческие параметры животных линии APP/PS1 до уровня показателей у животных дикого типа. Семакс в данном тесте оказывал положительное действие на еще большее число параметров.

Таким образом, через месяц после курсового введения пептидов наблюдалось улучшение ряда поведенческих и когнитивных характеристик животных с патологией Альцгеймеровского типа.

Наиболее яркие результаты были получены при изучении гистологических препаратов мозга животных. Через 2 недели после месячного курсового введения пептидных препаратов амилоидные бляшки определялись в коре головного мозга и в гиппокампе. В этот период у животных группы APP/PS1 среднее число амилоидных бляшек превышало 350 на мм^2 , тогда как в группе «Гептапептид» это число было снижено в 1.6 раза, а в группе «Семакс» еще больше – в 2.8 раза. При этом пептиды в основном снижали количество бляшек малого размера (меньше 100 мкм^2), что свидетельствует о том, что они препятствуют образованию новых бляшек. В области гиппокампа среднее число бляшек было ожидаемо меньшим – более 50 на мм^2 . У мышей группы APP/PS1 также наблюдалось снижение числа бляшек под действием пептидов: в 1.7 раза меньшее в группе «Гептапептид» и в 2.6 раза меньшее в группе «Семакс». Таким образом, на данном этапе курсовое введение того или другого пептида значительно снижает количество образующихся амилоидных бляшек в обоих отделах мозга, причем наиболее эффективное действие оказывает Семакс.

Следующий этап гистологического исследования был проведен на образцах мозга животных через 1.5 месяца после введения препаратов. За это время в коре головного мозга животных группы APP/PS1 среднее число бляшек (на мм^2) превысило 400. В группах «Гептапептид» и «Семакс» этот показа-

тель хотя и немного увеличился, но остался значительно сниженным (в 1.8 и 2.2 раза соответственно). Сходные результаты получены и в образцах гиппокампа. Таким образом, оба пептида вызвали снижение амилоидных включений в тканях, которое сохраняется в течение 1.5 месяца после их введения. Действие этих пептидов может быть основано на важном свойстве, присущем многим пептидам – на способности аллостерически взаимодействовать с различными рецепторами, меняя их воздействие на контролируемые сигнальные пути [27].

Предложенная ранее концепция «амилоидных матриц» основана на долговременном взаимодействии измененных форм бета-амилоида с белками-партнерами, включая альфа-4-никотиновый ацетилхолиновый receptor. Образованные комплексы могут служить затравками патологической агрегации интактных молекул бета-амилоида, генерируя формирование амилоидных бляшек [28, 29]. Таким образом, можно предположить, что оба изучаемых пептида связываются аллостерически с рецепторами, включая ацетилхолиновые, и тем самым меняют их конфигурацию, приводя к невозможности или резкому снижению их связывания с измененной формой бета-амилоида. Тогда именно этот путь образования амилоидных бляшек может тормозиться под действием исследованных нами пептидов, причем это торможение сохраняется более месяца после их курсового введения.

Полученные данные показывают, что интраназальное введение препаратов Семакс и Гептапептид приводит к улучшению когнитивных функций у мышей с моделью болезни Альцгеймера. При этом и Семакс и Гептапептид значительно снижают амилоидную нагрузку в мозге животных. Эти результаты демонстрируют перспективность использования Семакса и его производных для разработки методов лечения и коррекции болезни Альцгеймера. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (грант № 19-74-30007, поведенческие тесты, гистология) и Госзадания НИЦ «Курчатовский институт» (дизайн и синтез пептидов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, et al. Alzheimer's Disease. *Lancet*. 2016;388:505-517. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01124-1
- Kuhla A, Ruhlmann C, Lindner T, et al. APPswe/PS1dE9 mice with cortical amyloid pathology show a reduced NAA/Cr ratio without apparent brain atrophy: A MRS and MRI study. *NeuroImage Clinical*. 2017;15:581-586. doi:10.1016/j.nic.2017.06.009
- Konttinen H, Cabral-da-Silva MEC, Ohtonen S, et al. PSEN1ΔE9, APPswe, and APOE4 Confer Disparate Phenotypes in Human iPSC-Derived Microglia. *Stem Cell Reports*. 2019;13(4):669-683. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.08.004
- Koroleva SV, Myasoedov NF. Semax – Universal Drug for Therapy and Research. *Biology Bulletin*. 2018;45(6):589-600. doi: 10.1134/S000233291806005X. EDN: BDOQJJ
- Cummings J, Lee G, Ritter A, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Transl Res Clin Interv*.

- 2019;5:272-293. doi: 10.1016/j.trci.2019.05.008
6. Bairamova SP, Petelin DS, Akhaphkin RV, Kudryashov NV, Sorokina OY, Semin SA, Panfilova V, Volel BA. The endogenous neurosteroid system and its role in the pathogenesis and therapy of mental disorders. *Research Results in Pharmacology*. 2023;9(1):61-69. doi.org/10.18413/rrpharmacology.9.10015
7. Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18(11):1106-1125. doi:10.2174/1570159X18666200528142429
8. Stepenko YV, Shmigerova VS, Kostina DA, Shchelykina OV, Zhernakova NI, Solin AV, Koroleva NV, Markovskaya VA, Dudnikova OV, Bolgov AA. Study of the neuroprotective properties of the heteroreceptor EPOR/CD131 agonist of peptide structure in tau-proteinopathy modeling. *Research Results in Pharmacology*. 2024;10(2):41-47. doi: 10.18413/rrpharmacology.10.492
9. Platt B, Drever B, Koss D, et al. Abnormal cognition, sleep, EEG and brain metabolism in a novel knock-in Alzheimer mouse, PLB1. *PLoS*. 2011;6:e27068. doi: 10.1371/journal.pone.0027068
10. Lysikova EA, Kukharsky MS, Chaprov KD, et al. Behavioural impairments in mice of a novel FUS transgenic line recapitulate features of frontotemporal lobar degeneration. *Genes Brain and Behavior*. 2019;18:e12607. doi: 10.1111/gbb.12607
11. Forest KH, Alfulaij N, Arora K, Taketa R, Sherrin T, Todorovic C, Lawrence JLM, Yoshikawa GT, Ng HL, Hruby VJ, Nichols RA. Protection against β -amyloid neurotoxicity by a non-toxic endogenous N-terminal β -amyloid fragment and its active hexapeptide core sequence. *J Neurochem*. 2018;144(2):201-217. doi: 10.1111/jnc.14257
12. Kozin SA, Barykin EP, Mitkevich VA, et al. Anti-amyloid therapy of Alzheimer's disease: Current state and prospects. *Biochem. Mosc.* 2018;83:1057-1067. doi: 10.1134/S0006297918090079
13. Istrate AN, Tsvetkov PO, Mantsyzov AB, et al. NMR solution structure of rat α β (1-16): toward understanding the mechanism of rats' resistance to Alzheimer's disease. *Bioophys J*. 2012;102(1):136-143. doi: 10.1016/j.bpj.2011.11.4006
14. Cummings J, Fox N. Defining Disease Modifying Therapy for Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimer's Dis*. 2017;4(2):109-115. doi: 10.14283/jpad.2017.12
15. Sengupta A, Nilson N, Kayed R. The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*. 2016;6:42-49. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.03.035
16. Lysikova EA, Kuzubova EV, Radchenko AI, Patrakhanov EA, Chaprov KD, Korokin MV, Deykin AV, Gudyrev OS, Pokrovskii MV. APPswe/PS1de9/Blg Transgenic Mouse Line for Modeling Cerebral Amyloid Angiopathy in Alzheimer's Disease. *Mol Biol (Mosk.)*. 2023;57(1):85-94. doi: 10.31857/S0026898423010081. EDN: AXGEVN
17. Ashmarin IP, Nezavibatko VN, Myasoedov NF, Kamensky AA, Grivennikov IA, Ponomareva-Stepnaya MA, Andreeva LA, Kaplan AY, Koshelev VB, Ryasina TV. Nootropic analogue of adrenocorticotropin 4-10 Semax (The experience of desing and investigation over 15 years). *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 1997;47(2):420-430. EDN: MOXKPP
18. Мясоедов НФ, Гривенников ИА. Нейропептиды и их аналоги в регуляции функций нервной системы млекопитающих, включая человека. От синтеза и изучения механизмов их действия до создания лекарственных средств нового поколения. *Проблемы и перспективы молекулярной генетики*. М.: Наука. 2004;2:195-236.
19. Potaman VN, Antonova LV, Dubynin VA, Zaitzev DA, Kamensky AA, Myasoedov NF, Nezavibatko VN. Entry of the synthetic ACTH(4-10) analogue into the rat brain following intravenous injection. *Neurosci Lett*. 1991;127:133-136. doi: org/10.1016/0304-3940(91)90912-d
20. Пономарева-Степная МА, Бахарев ВД, Незавибатко ВН, Андреева ЛА, Алфеева ЛЮ, Потаман ВН. Сравнительные исследования аналогов АКТГ(4-10) стимуляторов обучения и памяти. *Хим.-фарм. ж.* 1986;20(6):667-670.
21. Levitskaya NG, Glazova NYu, Sebentsova EA, Andreeva LA, Myasoedov NF, Manchenko DM, Vilensky DA, Kamensky AA. Investigation of the Spectrum of Physiological Activities of the Heptapeptide Semax, an ACTH 4-10 Analogue. *Neurochemical J*. 2008;2(1-2):95-101. doi:10.1134/S1819712408010182. EDN: LLKPDT
22. Levitskaya NG, Sebentsova EA, Glazova NYu, Voskresenskaya OG, Andreeva LA, Alfeeva LYu, Kamenskii AA, Myasoedov NF. Study on the neurotropic activity of the products of Semax enzymatic degradation. *Dokl. Biol. Sci.* 2000;372(1-6):243-246. EDN: CDIQZA
23. Patent RUS № 2384343/20.03.2010. Byul. № 8. Mjasoedov NF, Gavrilova SI, Kalyn JaB, Kolykhalov IV, Mikhajlova NM, Selezneva ND, Sokolova ON, Tiganov AS, Andreeva LA. *Agent and method for prevention and treatment of the patients with Alzheimer's disease*. EDN: UQIOJW
24. Ilina AR, Popovich IG, Ryzhak GA, Khavinson VKh. Prospects for use of short peptides in pharmacotherapeutic correction of Alzheimer's disease. *Adv Geront*. 2024;37(1-2):10-20. doi: 10.34922/AE.2024.37.1-2.001. EDN: SPXNED
25. Пономарева-Степная МА, Незавибатко ВН, Антонова ЛВ, Андреева ЛА, Алфеева ЛЮ, Потаман ВН, Каменский АА, Ашмарин ИП. Аналог АКТГ(4-10) стимулятор обучения пролонгированного действия. *Хим.- фарм. ж.* 1984;18(7):790-795.
26. Ryzhak GA, Ilina AR. Prospects of using peptide drugs for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Problems of Geroscience*. 2024;4(8):223-226. doi: 10.37586/2949-4745-4-2024-223-226. EDN: RCJZKF
27. Vyunova TV, Andreeva LA, Shevchenko KV, Myasoedov NF. An integrated approach to study the molecular aspects of regulatory peptides biological mechanism. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2019;62(12):812-822. doi.org/10.1002/jlcr.3785
28. Kozin SA, Makarov AA. The convergence of Alzheimer's disease pathogenesis concepts. *Mol Biol. (Moscow)*. 2019;53(6):1020-1028. doi: 10.1134/S0026898419060107. EDN: JAYLXH
29. Barykin EP, Garifulina AI, Kruykova EV, Spirova EN, Anashkina AA, Adzhubei AA, Shelukhina IV, Kasheverov IE, Mitkevich VA, Kozin SA, Hollmann M, Tsetlin VI, Makarov AA. Isomerization of Asp7 in Beta-Amyloid Enhances Inhibition of the alpha7 Nicotinic Receptor and Promotes Neurotoxicity. *Cells*. 2019;8(8):771-787. doi: 10.3390/cells8080771

УДК 577.2

Рекомбинантная продукция, видоспецифическая активность на канале TRPA1 и важная роль N-концевого остатка токсина ProTx-I из яда тарантула *Thrixopelma pruriens*

М. А. Шулепко¹, М. Джан¹, Е. А. Живов^{2,3}, Д. С. Кульбацкий², А. С. Парамонов², Ю. Чэ¹, А. В. Кузнецов¹, А. В. Попов^{2,4}, М. П. Кирпичников^{2,5}, З. О. Шенкарев^{2,3*}, Е. Н. Люкманова^{1,2,3,5*}

¹Биологический факультет, Шэньчжэньский МГУ-ППИ Университет, провинция Гуандун, Шэньчжэнь, 518172 Китай

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

³Московский центр перспективных исследований, Москва, 123592 Россия

⁴Курчатовский комплекс медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт», Краснодарский край, Сочи, 354376 Россия

⁵Междисциплинарная научно-образовательная школа «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология», биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

E-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru; lyukmanova_ekaterina@smbu.edu.cn

Поступила в редакцию 11.12.2024

Принята к печати 03.08.2025

DOI: 10.32607/actanatureae.27590

РЕФЕРАТ Токсин ProTx-I из яда тарантула *Thrixopelma pruriens* ингибирует потенциал-зависимые натриевые (Na_v), калиевые и кальциевые каналы, а также хемочувствительный канал TRPA1, влияя на процессы их активации. Благодаря активности в отношении каналов Na_v 1.7, Na_v 1.8 и TRPA1, участвующих в восприятии и распространении болевых сигналов, ProTx-I может рассматриваться в качестве модели для создания анальгетиков нового поколения. ProTx-I состоит из 35 аминокислотных остатков, при этом три дисульфидные связи в его структуре образуют мотив ингибиторного цистинового узла, что затрудняет рекомбинантную продукцию токсина. Разработка эффективной системы продукции ProTx-I необходима для изучения механизма действия токсина на молекулярном уровне. В представленной работе мы сравнили ряд подходов к бактериальной продукции дисульфидодержащих токсинов. Цитоплазматическая экспрессия ProTx-I в составе слитого растворимого белка с тиоредоксином или глутатион-S-трансферазой не позволила получить правильно свернутый токсин. В то же время ProTx-I с природной структурой был получен в ходе «прямой» экспрессии в виде цитоплазматических телец включения с последующей ренатурацией, а также при секреции в периплазматическое пространство в слитой конструкции с мальтозосвязывающим белком. Активность рекомбинантного ProTx-I была изучена электрофизиологическими методами на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих каналы TRPA1 крысы и человека. Токсин показал большую активность на канале крысы, чем на канале человека ($IC_{50} = 250 \pm 70$ и 840 ± 190 нМ соответственно). Также было обнаружено, что наличие дополнительного N-концевого остатка метионина у токсина, полученного в ходе «прямой» экспрессии, значительно ослабляет активность ProTx-I.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА цистиновый узел, TRPA1, токсин, влияющий на активацию, бактериальная продукция, дисульфид-богатые белки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АИС – аллилизотиоцианат; GST – глутатион-S-трансфераза; ИСК – ингибиторный цистиновый узел; МВР – мальтозосвязывающий белок; Na_v – потенциал-зависимый натриевый канал; TRX – тиоредоксин; ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид.

ВВЕДЕНИЕ

Яды пауков – богатый источник полипептидных токсинов, действующих на различные мембранные рецепторы и ионные каналы [1–3]. Многие токсины пауков принадлежат к семейству ноттинов – небольших (20–50 а.о.) β -структурных пептидов, содержащих в своей структуре консервативный мотив «ингибиторного цистинового узла» (ICK) [4], образованный тремя дисульфидами C1–C4, C2–C5 и C3–C6. Такая пространственная структура обеспечивает высокую физико-химическую и протеолитическую стабильность ноттинов, что делает мотив ICK перспективной основой для дизайна новых пептидных препаратов [5].

Среди ноттинов пауков выделяют мембранотропные токсины, влияющие на активацию или инактивацию натриевых (Na_v), калиевых и кальциевых потенциал-зависимых каналов (так называемые *gating modifier toxins*) [6]. Токсин ProTx-I (Protoxin-I или β/ω -theraphotoxin-Tp1a, 35 а.о.) – мембранотропный ноттин перуанского зеленого бархатного тарантула *Thrixopelma pruriens*. ProTx-I эффективно ингибитирует ряд потенциал-зависимых каналов [7], а также хемочувствительный канал TRPA1 [8]. Среди мишней ProTx-I каналы $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ и TRPA1 являются перспективными терапевтическими мишениями для лечения боли и неврологических воспалительных синдромов [9–11]. Изучение механизма действия ProTx-I на эти каналы может дать информацию, необходимую для создания новых анальгетиков и других биомедицинских препаратов.

Первым шагом, необходимым для изучения механизма действия ProTx-I, а также для дизайна новых вариантов этого ноттина, является разработка эффективной системы продукции. Традиционно небольшие полипептидные токсины, включая ноттины пауков, получают методами пептидного синтеза с последующей ренатурацией для формирования правильной системы дисульфидных связей [12]. Кроме того, рекомбинантные ноттины получают в клетках *Pichia pastoris* [12–14] и в клетках *Escherichia coli* [15, 16]. Однако при цитоплазматической продукции происходит накопление этих белков в виде нерастворимых телец включения [17, 18]. Для получения дисульфид-богатых токсинов в клетках *E. coli* применяют: (1) «прямую» экспрессию с последующим выделением пептида из телец включения и ренатурацией; (2) получение в виде слитых конструкций с белками, способствующими замыканию дисульфидных связей и повышающими уровень продукции, такими как, например, тиоредоксин A (TRX) или глутатион-S-трансфераза (GST); (3) секрецию рекомбинантных пептидов в периплазматическое пространство *E. coli*, в котором происходит образование дисульфидных связей [17, 19].

Мы сравнили эти подходы к бактериальной продукции ProTx-I и впервые получили корректно свернутый рекомбинантный токсин, активность которого охарактеризовали на каналах TRPA1 человека и крысы. Полученные данные показали значительную видоспецифичность ингибирующего действия ProTx-I, а также влияние N-концевой последовательности токсина на его активность. Разработанная система бактериальной продукции открывает новые возможности для получения мутантных и меченых изотопами вариантов ProTx-I для дальнейших структурных и функциональных исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Конструирование экспрессионных векторов**

Ген *ProTx-I* был сконструирован на основе аминокислотной последовательности P83480 из базы данных UniProt. Нуклеотидная последовательность гена была оптимизирована с учетом частоты использования кодонов в *E. coli*. Векторы для цитоплазматической экспрессии слитых белков TRX-ProTx-I и GST-ProTx-I получены путем клонирования гена *ProTx-I* в векторы *pET-32a(+)* (Novagene, США) и *pET-32a(+)/GST* по сайтам KpnI/BamHI и BamHI/HindIII соответственно. Плазмида *pET-32a(+)/GST* была получена ранее путем замены последовательности гена *TRX* в плазмиде *pET-32a(+)* на последовательность гена *GST*. Вектор для бактериальной секреции слитого белка MBP-ProTx-I получен путем клонирования гена *ProTx-I* по сайтам KpnI и SacI в плазмиду *pLICC-MBP-APETx2* (Addgene, #72668) [20]. Вектор для прямой экспрессии *Met-ProTx-I* получали путем клонирования гена *ProTx-I* в вектор *pET-22b(+)* (Novagene) по сайтам NdeI и BamHI. В этом случае N-конец молекулы ProTx-I содержал дополнительный остаток метионина, кодируемый стартовым кодоном ATG. Для продукции 6His-Met-ProTx-I на 5'-конец гена *ProTx-I* вставляли дополнительную последовательность, кодирующую 6His-tag, и линкерную последовательность, содержащую остаток метионина. Далее этот ген клонировали в вектор *pET-22b(+)* по сайтам NdeI и BamHI. Схема использованных конструкций приведена на рис. 1.

Бактериальная продукция слитых белков TRX-ProTx-I, GST-ProTx-I и MBP-ProTx-I

Для получения слитых белков TRX-ProTx-I и GST-ProTx-I штаммы *E. coli* BL21(DE3) и SHuffle T7 Express (NEB) трансформировали векторами *pET-32a(+)/TRX-ProTx-I* и *pET-32a(+)/GST-ProTx-I* соответственно. MBP-ProTx-I производили в штамме *E. coli* Rosetta-gami (DE3). Клетки вы-

ращивали на среде TB (12 г бактотриптона, 24 г дрожжевого экстракта, 4 мл глицерина, 2.3 г KH_2PO_4 , 12.5 г K_2HPO_4 на 1 л среды, pH 7.4), содержащей 100 мкг/мл ампциллина (Sigma, США) до $\text{OD}_{600} \sim 0.6$. Экспрессию индуцировали, добавляя 0.1 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ, Sigma). Клетки культивировали в течение 16 ч при 20°C в случае GST-ProTx-I или 72 ч при 13°C в случае MBP-ProTx-I и TRX-ProTx-I.

Бактериальная продукция Met-ProTx-I и 6His-Met-ProTx-I

Met-ProTx-I и 6His-Met-ProTx-I получали в штамме *E. coli* BL21(DE3), трансформированном векторами *pET-22b(+)/Met-ProTx-I* или *pET-22b(+)/6His-Met-ProTx-I* соответственно. Для получения Met-ProTx-I клетки выращивали на среде TB при 37°C до $\text{OD}_{600} \sim 0.6$ и индуцировали экспрессию, добавляя 0.2 мМ ИПТГ. Для получения 6His-Met-ProTx-I клетки выращивали на среде SB (32 г бактотриптона, 20 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, pH 7.4) при 37°C до $\text{OD}_{600} \sim 6.0$ и индуцировали экспрессию 1 мМ ИПТГ. После индукции культивирование продолжали в течение 18 ч при 37°C.

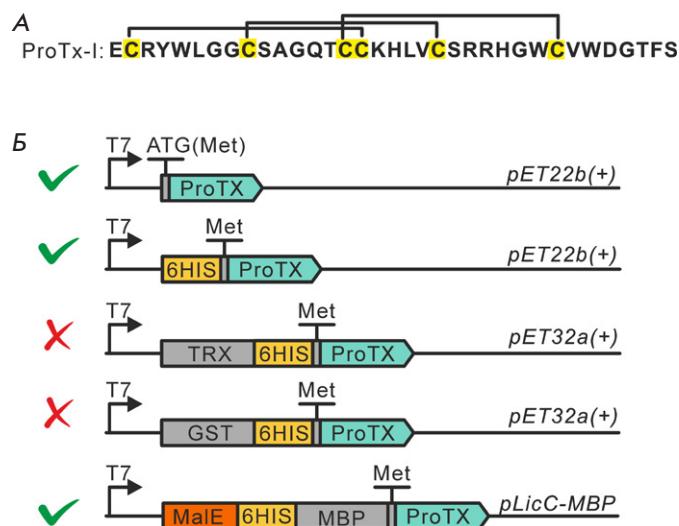


Рис. 1. Дизайн генетических конструкций для получения ProTx-I в клетках *E. coli*. А – аминокислотная последовательность токсина ProTx-I. Остатки цистеинов показаны желтым цветом, линиями обозначены дисульфидные связи. Б – схемы генетических конструкций. Сверху вниз: векторы для «прямой» продукции Met-ProTx-I и 6His-Met-ProTx-I; векторы для цитоплазматической продукции ProTx-I в виде слитых белков с TRX и GST; вектор для секреции ProTx-I в виде слитого белка с MBP. Зелеными галочками отмечены конструкции, с использованием которых удалось получить рекомбинантный ProTx-I в структурированном виде

Выделение и хроматографическая очистка слитых белков TRX-ProTx-I, GST-ProTx-I и MBP-ProTx-I

Клетки собирали центрифугированием при 10000 g в течение 20 мин и 4°C. Клеточный осадок ресуспенсировали в буфере А (20 мМ Трис-HCl, 300 мМ NaCl, pH 8.0) в присутствии 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF, Sigma). Клетки разрушали ультразвуком (Branson Digital Sonifier, США) при выходной мощности прибора 500 Вт и 4°C в течение 6 мин. Суспензию центрифугировали при 30000 g в течение 30 мин при 4°C. Очистку слитых белков осуществляли с помощью металлоаффинной хроматографии на смоле Ni-Sepharose FastFlow (Cytiva, США), предварительно уравновешенной в буфере А. Рекомбинантные белки элюировали ступенчатым градиентом концентрации имидазола (Macklin, Китай) от 20 до 500 мМ.

Выделение и очистка восстановленных Met-ProTx-I и 6His-Met-ProTx-I

Выделение сульфитированного Met-ProTx-I из цитоплазматических телец включения и его хроматографическую очистку в денатурирующих условиях проводили согласно протоколам, описанным ранее [19]. После хроматографии Met-ProTx-I восстанавливали 500-кратным молярным избытком дитиотреитола (ДТТ, Sigma). Цитоплазматические тельца включения, содержащие 6His-Met-ProTx-I, солюбилизировали в денатурирующем буфере (20 мМ Трис-HCl, 300 мМ NaCl, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 8 М мочевина, pH 8.0) в течение 3 ч, центрифугировали и супернатант наносили на хроматографическую смолу Ni-Sepharose FastFlow, уравновешенную денатурирующим буфером. 6His-Met-ProTx-I элюировали ступенчатым градиентом концентрации имидазола (20–500 мМ). Перед гидролизом с помощью BrCN (Sigma) в хроматографические фракции 6His-Met-ProTx-I добавляли 500-кратный молярный избыток ДТТ.

Гидролиз рекомбинантных белков с помощью BrCN

Полученные рекомбинантные белки 6His-Met-ProTx-I, TRX-ProTx-I, GST-ProTx-I и MBP-ProTx-I в концентрации 4 мг/мл гидролизовали, добавляя 0.3 М HCl и 50-кратный молярный избыток (по отношению к остаткам метионина) BrCN. Реакцию проводили в течение ночи в темноте при комнатной температуре. Затем BrCN удаляли выпариванием на приборе Centrivap (Labconco, США), оснащенном криогенной ловушкой.

Ренатурация Met-ProTx-I и ProTx-I

Ренатурацию Met-ProTx-I и ProTx-I (полученного в результате гидролиза 6His-Met-ProTx-I с помо-

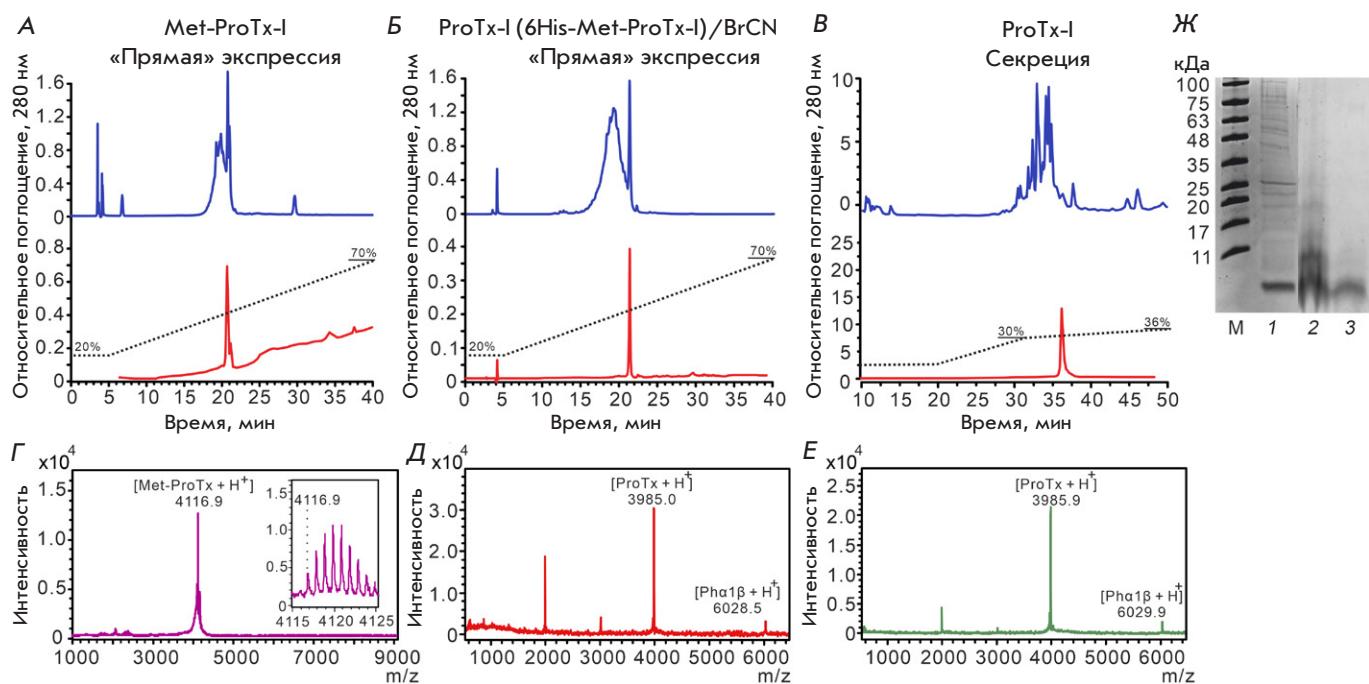


Рис. 2. Анализ рекомбинантных вариантов ProTx-I методами ВЭЖХ, масс-спектрометрии и SDS-ПААГ-электрофореза. *А, Б, В* – репрезентативные хроматограммы ВЭЖХ-очистки (верхняя панель) и ВЭЖХ-анализ очищенных вариантов ProTx-I (нижняя панель), полученных разными способами: ренатурированный Met-ProTx-I (*А*), ренатурированный ProTx-I после гидролиза 6His-Met-ProTx-I с помощью BrCN (*Б*), ProTx-I после гидролиза секретируемого MBP-ProTx-I с помощью BrCN (*В*). *Г–Е* – MALDI-MS-спектры вариантов ProTx-I, представленных на панелях (*А–В*). В образцы, показанные на *Д* и *Е*, дополнительно добавляли токсин Pha1β. На *Д* и *Е* также наблюдаются двухзарядные ионы [ProTx-I+2H⁺] и [Pha1β+2H⁺]. *Ж* – электрофоретический анализ препаратов ProTx-I, полученных в результате «прямой» экспрессии: *М* – маркер (BioSharp BL712A); 1 – Met-ProTx-I до ренатурации; 2 – ProTx-I, полученный в результате гидролиза 6His-Met-ProTx-I с помощью BrCN, до ренатурации; 3 – препарат с дорожки 2 после ренатурации

щью BrCN) инициировали переносом рекомбинантных белков в ренатурирующий буфер (0.1 М Трис-HCl, 2 М мочевина, 1.5 mM GSH и 0.15 mM GSSG, pH 7.5) с помощью гель-фильтрации на хроматографических колонках NAP-25 (Cytiva). Финальная концентрация рекомбинантных токсинов в ренатурирующем буфере составляла 0.02 мг/мл.

Хроматографическая очистка и анализ рекомбинантных вариантов ProTx-I с помощью ВЭЖХ
ВЭЖХ рекомбинантных вариантов ProTx-I проводили на колонке Jupiter C4 (A300, 4.6 × 250 мм, Phenomenex) с использованием хроматографов Vanquish Core и Ultimate 3000 (ThermoFisher, США). Токсины элюировали градиентом ацетонитрила в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 1 мл/мин. Полученные препараты токсинов лиофилизировали.

Масс-спектрометрия

Препарат Met-ProTx-I анализировали в рефлекторном режиме детекции положительно заряженных ионов на спектрометре Rapiflex MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия). В результате было получено

значение m/z (4116.9 Да, *рис. 2Г*), близкое к ожидаемой мономоноизотопной массе [Met-ProTx-I+H⁺] 4116.7 Да, соответствующей молекуле токсина с замкнутыми дисульфидными связями.

Анализ вариантов ProTx-I, полученных в результате гидролиза 6His-Met-ProTx-I (*рис. 2Д*) или бактериальной секреции (*рис. 2Е*), проводили на спектрометре Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия). Для калибровки спектрометра использовали продукты автолиза трипсина. Молекулярные массы ProTx-I – 3985.0 и 3985.9 Да, – полученные в обоих случаях, соответствовали расчетной мономоноизотопной массе ProTx-I (3985.7 Да, [ProTx-I+H⁺]) в пределах погрешности измерения. В обоих случаях для проверки калибровки в образцы дополнительно добавляли токсин Pha1β (расчетная масса 6029.5 Да [Pha1β+H⁺]), для которого были получены массы 6028.5 и 6029.9 Да соответственно.

ЯМР-спектроскопия

Спектры ЯМР измеряли в водном растворе (5% D₂O, pH 4.5, 30°C), используя ЯМР-спектрометр AVANCE-800 (Bruker) с рабочей частотой протонов 800 МГц. В качестве положительного контроля кор-

ректной пространственной структуры использовали коммерческий препарат токсина, полученный путем химического синтеза (Smartox Biotechnology Inc., Франция).

Электрофизиологические эксперименты

Регистрацию токов через TRPA1 человека и крысы [21] проводили в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих эти каналы. Выделение ооцитов, инъекция мРНК и запись экспериментов описаны ранее в [22]. Все растворы готовили в день эксперимента на основе ND-96 без кальция, содержащего (в мМ) 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂ и 10 HEPES при pH 7.4. Токи стимулировали аппликацией 100 мкМ AITC (Sigma-Aldrich), раствор добавляли вручную в перфузционную камеру, запись токов проводили с пилообразным изменением напряжения как описано в [22]. Для каждого ооцита последовательно записывали три ответа на аппликацию AITC, а также последующий ток утечки в присутствии специфического ингибитора TRPA1 HC030031 (Sigma-Aldrich). Амплитуду первого ответа использовали для нормирования данных, полученных на разных ооцитах. Для возбуждения второго ответа AITC подавали вместе с ProTx-I или HC030031. Амплитуду этого ответа измеряли, нормировали, усредняли между разными ооцитами и использовали для построения кривых доза-ответ. Кривые доза-ответ аппроксимировали уравнением Хилла:

$$Y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{[ProTx-I]}{EC_{50}}\right)^{nH}},$$

где *nH* – коэффициент Хилла.

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе GraphPad Prism 9.0. Для сравнения амплитуд токов при определенных концентрациях токсина использовали либо двусторонний *t*-критерий Стьюдента, либо однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и критерий Даннетта для множественного сравнения. Сравнение параметров кривых доза-ответ осуществляли с помощью F-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продукция ProTx-I в слитой конструкции с TRX и GST

Для получения рекомбинантного ProTx-I были протестированы пять различных подходов. ProTx-I получали в виде слитых с белками-партнерами растворимых белков: TRX, GST и мальтозосвязывающим белком (MBP), а также с шестью N-концевыми остатками гистидина (6His-tag) и без них в виде цитоплазматических телец включения (рис. 1). Эффективность рекомбинантной продукции токсинов

пауков в связке с TRX и GST показана ранее [23–26], а эффективность продукции в виде цитоплазматических телец включения с последующей ренатурацией продемонстрирована нами для ряда дисульфид-богатых белков, включая токсины из яда змей и белки человека семейства Ly6/uPAR [27].

Культивирование клеток BL21(DE3), трансформированных плазмидой *pET-32a/ProTx-I*, при 37°C приводило к получению слитого белка TRX-ProTx-I в нерастворимом виде, в то время как понижение температуры культивирования клеток до 13°C позволило получить растворимый белок с выходом 20 мг/л бактериальной культуры. Поскольку молекула ProTx-I не содержит остатки метионина, мы использовали BrCN для гидролиза слитого белка [28] по дополнительному остатку метионина, введенному перед первым остатком ProTx-I. Анализ очищенного препарата ProTx-I с помощью MALDI подтвердил ожидаемую молекулярную массу токсина с замкнутыми дисульфидными связями. Однако сравнение ¹Н-ЯМР-спектров рекомбинантного токсина и коммерческого препарата ProTx-I выявило отсутствие корректной пространственной структуры у рекомбинантного ProTx-I (рис. 3А, Д). Использование GST в качестве белка-партнера также не позволило получить ProTx-I в структурированном виде. Эти результаты подчеркивают необходимость анализа пространственной структуры рекомбинантных токсинов, поскольку их получение в растворимом виде с белками-партнерами и с ожидаемой молекулярной массой не гарантирует правильного сворачивания белковой молекулы и образования корректных дисульфидных связей.

Получение Met-ProTx-I из телец включения

Ген *ProTx-I* содержит на 5'-конце стартовый кодон ATG, необходимый для инициации трансляции, поэтому итоговый рекомбинантный продукт при его получении в виде цитоплазматических телец включения содержит дополнительный N-концевой остаток метионина (рис. 1Б). Для очистки Met-ProTx-I мы использовали ранее разработанный протокол, включающий солюбилизацию токсина из цитоплазматических телец включения в денатурированном виде с остатками цистеина, химически модифицированными до S-сульфоната, и последующую ионообменную хроматографию на смоле DEAP-spheronite-OH [27]. Выход денатурированного Met-ProTx-I на этой стадии составил 6 мг/л бактериальной культуры. Очищенный препарат Met-ProTx-I обрабатывали ДТТ для снятия S-сульфонатных групп с остатков цистеина, затем удаляли ДТТ с помощью гель-фильтрации и переносили токсин в буфер для ренатурации. Протокол ренатурации токсина был основан на протоколе, опубликованном

ранее для химически синтезированного ProTx-I [29] и сходен с используемыми нами протоколами для ренатурации других дисульфид-богатых белков [27]. Ренатурированный Met-ProTx-I, очищенный с помощью ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила (рис. 2A), имел природную структуру (рис. 3Б), однако эффективность ренатурации токсина при таком подходе оказалась крайне низкой. Конечный выход ренатурированного продукта составил всего ~ 0.05 мг/л бактериальной культуры.

Получение ProTx-I с природной N-концевой последовательностью

Низкая эффективность ренатурации Met-ProTx-I могла быть связана с недостаточной чистотой препарата перед ренатурацией. Для повышения чистоты токсина перед ренатурацией и, как следствие, повышения выхода ренатурированного ProTx-I в N-концевую последовательность ProTx-I ввели последовательность 6His-tag. Похожий подход использовали ранее для рекомбинантной продукции других токсинов пауков [30]. Известно, что дополнительные остатки в N-концевой последовательности токсинов могут влиять на их структуру и активность [31], поэтому для получения токсина с природной N-концевой последовательностью после 6His-tag был введен дополнительный остаток метионина для последующего гидролиза с помощью BrCN (рис. 1Б). Выход 6His-Met-ProTx-I после очистки с помощью металл-хелатной хроматографии составил ~ 13 мг/л бактериальной культуры. Таким образом, введение 6His-tag в N-концевую последовательность позволило не только увеличить чистоту препарата токсина перед ренатурацией (рис. 2Ж), но и поднять уровень продукции токсина, что находится в согласии с нашим более ранним наблюдением, согласно которому N-концевая последовательность может влиять на выход рекомбинантных белков [32]. Денатурированный препарат токсина 6His-Met-ProTx-I гидролизовали с помощью BrCN, далее ренатурацию проводили аналогично препарату Met-ProTx-I. Конечный выход ренатурированного препарата ProTx-I с природной N-концевой последовательностью составил после ВЭЖХ (рис. 2Б) 0.3 мг/л бактериальной культуры. Таким образом, введение 6His-tag в молекулу ProTx-I позволило не только повысить продукцию токсина, но и получить пептид с природной последовательностью в структурированном виде, что подтверждено данными ЯМР-спектроскопии (рис. 3В).

Секреция ProTx-I

Альтернативным способом продукции белков с корректно замкнутыми дисульфидными связями в клет-

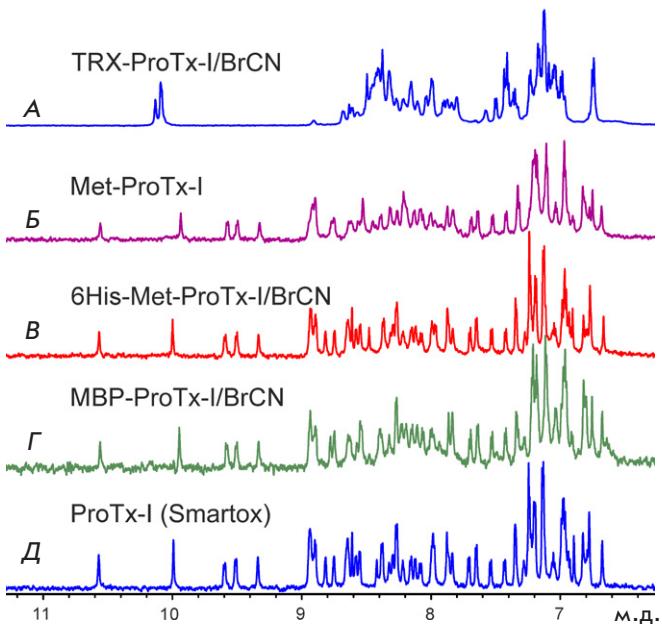


Рис. 3. 1D ^1H -ЯМР-спектры вариантов ProTx-I (рН 4.5, 30°C). А – спектр неправильно свернутого ProTx-I, полученного в результате продукции слитого белка TRX-ProTx-I и гидролиза BrCN. Б – спектр Met-ProTx-I, полученного в виде телец включения и последующей ренатурации. В – спектр ProTx-I, полученного в виде телец включения (конструкция 6His-Met-ProTx-I), после гидролиза BrCN и ренатурации. Г – спектр ProTx-I, полученного в результате секреции слитой конструкции MBP-ProTx-I и гидролиза BrCN. Д – спектр коммерческого препарата ProTx-I, полученного методом химического синтеза

ках *E. coli* является секреция в периплазматическое пространство [20]. Для повышения уровня продукции токсина использовали слитую конструкцию с MBP, а для секреции в периплазматическое пространство в N-концевую последовательность MBP вводили сигнальный пептид MalE [33] (рис. 1Б). Для последующего отщепления ProTx-I от MBP перед последовательностью токсина встраивали остаток метионина. На этом этапе мы использовали штамм *E. coli* Rosetta-gamiTM (производное OrigamiTM), хорошо зарекомендовавший себя для получения дисульфид-богатых белков, включая токсины животных [34, 35]. Для увеличения выхода белка в растворимом виде мы понижали температуру культивирования клеток после индукции до 13°C, что позволяет замедлить скорость синтеза белка и способствует формированию корректно замкнутых дисульфидных связей [36]. Выход белка MBP-ProTx-I после очистки из суммарного клеточного лизата с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии составил 75 мг/л бактериальной культуры. Далее белок MBP-ProTx-I гидролизовали с помощью BrCN, и ProTx-I с природной N-концевой последовательностью очищали с помощью ВЭЖХ (рис. 2В). Финальный выход секреции

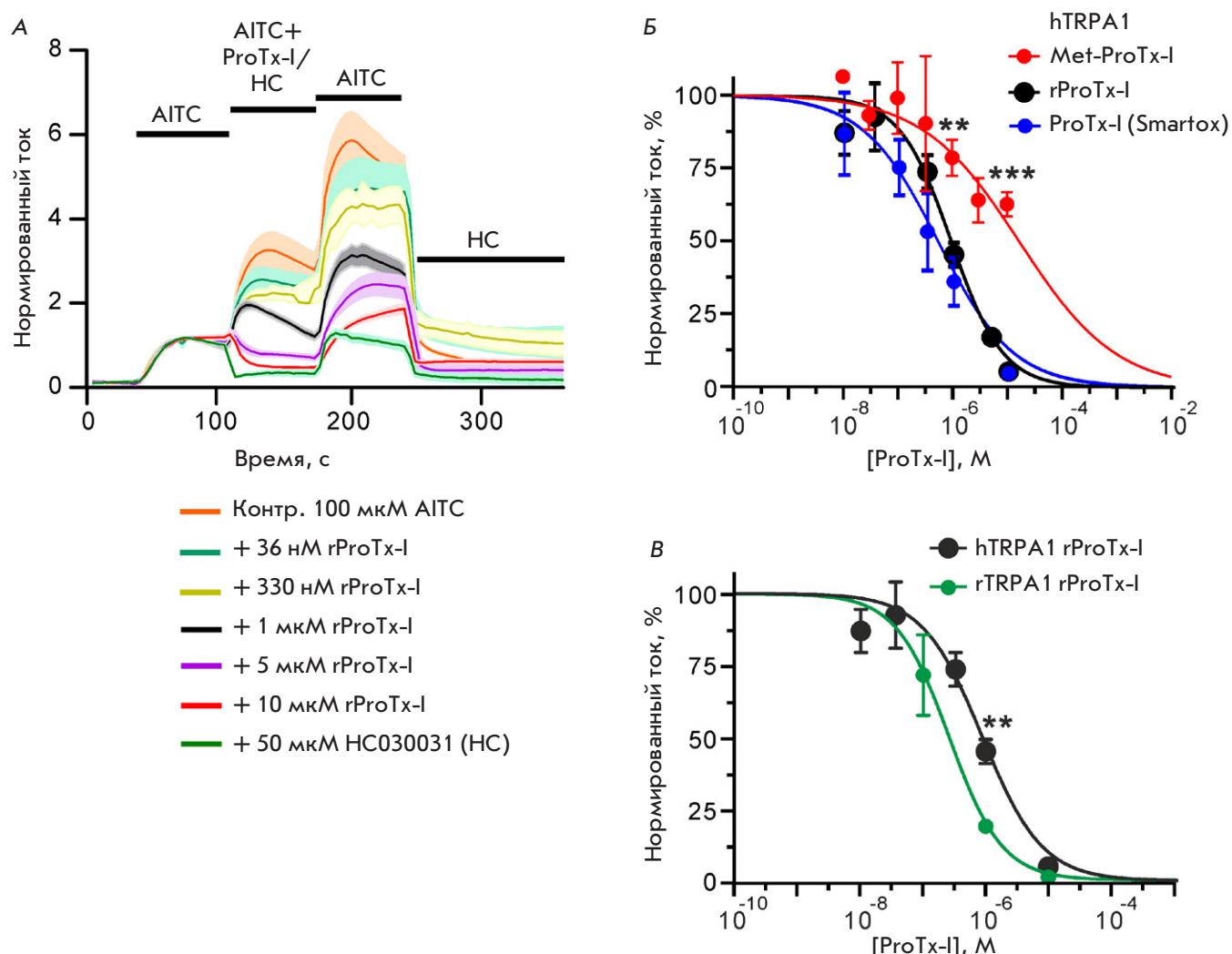


Рис. 4. Действие вариантов ProTx-I на направленные наружу AITC-индуцированные токи в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих TRPA1. А – усредненные нормированные записи токов через канал TRPA1 человека в отсутствие и в присутствии селективного антагониста HC030031 или ProTx-I. Данные представлены как среднее \pm SEM (линии и затененные области соответственно, $n = 3$ –6 ооцитов). Периоды аппликации веществ показаны горизонтальными линиями. Б – кривые доза–ответ для ингибиции TRPA1 человека рекомбинантными препаратами rProTx-I, Met-ProTx-I и коммерческим ProTx-I (Smartox). **($p < 0.01$) и ***($p < 0.001$) указывают на значительное отличие амплитуды тока между препаратом Met-ProTx-I и препаратами rProTx-I и ProTx-I (Smartox) согласно критерию ANOVA/Данннетт. Различие в значениях IC_{50} для соответствующих кривых, аппроксимированных уравнением Хилла (табл. 1), статистически значимо с $p < 0.0001$ (F-тест). В – кривые доза–ответ для рекомбинантного препарата rProTx-I в отношении TRPA1 человека (hTRPA1) и крысы (rTRPA1). Различие в значениях IC_{50} для этих кривых статистически значимо с $p = 0.006$ (F-тест). **($p < 0.01$) указывает на значительное отличие амплитуды токов на каналах крысы и человека согласно двустороннему t-тесту. Данные на Б и В (среднее \pm SEM, $n = 3$ –6 ооцитов) нормированы на ответ, записанный без ProTx-I (100%)

Таблица 1. Параметры уравнения Хилла для анализа кривых ингибиции

Рецептор/токсин	IC_{50} , мкМ	Коэффициент Хилла
hTRPA1/Met-ProTx-I	8.9 ± 7.0	$=1.0^*$
hTRPA1/ProTx-I (Smartox)	0.41 ± 0.16	0.68 ± 0.24
hTRPA1/rProTx-I	0.84 ± 0.19	0.91 ± 0.18
rTRPA1/rProTx-I	0.25 ± 0.07	1.03 ± 0.26

*При анализе кривой доза–ответ для этого варианта токсина коэффициент Хилла предполагали равным 1.0.

емого корректно свернутого ProTx-I (рис. 3Г) составил ~ 0.15 мг/л бактериальной культуры. Небольшие отличия в положении отдельных сигналов в ЯМР-спектрах рекомбинантного и коммерческого токсина (рис. 3Г, Д) объясняются вариацией pH в образцах (в пределах 0.1 ед.).

N-концевая последовательность ProTx-I влияет на взаимодействие токсина с TRPA1

Активность химически синтезированного ProTx-I была показана ранее на клетках HEK293, экспрессирующих рецепторы TRPA1 человека и мыши [8]. В настоящей работе сравнили функциональную активность Met-ProTx-I и ProTx-I, полученного в результате гидролиза 6His-Met-ProTx-I, на канале TRPA1 человека, экспрессированного в ооцитах *X. laevis*. В соответствии с [8] обнаружили, что 10 мкМ рекомбинантного ProTx-I почти полностью ингибирует ток через канал TRPA1, индуцированный 100 мкМ ковалентного агониста аллилизотиоцианата (AITC) (рис. 4А). Этот эффект был аналогичен эффекту 50 мкМ HC030031 – селективного антагониста TRPA1 (рис. 4А).

Сравнение кривых доза-ответ рекомбинантного и коммерческого ProTx-I подтвердило близкие свойства препаратов (рис. 4Б, табл. 1). Параметры кривых (IC_{50} и коэффициент Хилла) статистически не различались. Однако анализ Met-ProTx-I выявил драматическое статистически значимое падение активности этого варианта токсина. Так, при концентрации 10 мкМ рекомбинантный и синтетический ProTx-I ингибировали токи до $\sim 5\%$, а Met-ProTx-I только до $\sim 60\%$, а значение IC_{50} увеличилось на порядок (рис. 4Б, табл. 1). Таким образом, N-концевая аминокислотная последовательность токсина критически важна для взаимодействия с рецептором. Примечательно, что ранее полученные данные об активном сайте ProTx-I не включали N-концевые остатки [8].

ProTx-I ингибирует TRPA1 крысы эффективнее, чем канал человека

Сравнение активности рекомбинантного ProTx-I на каналах TRPA1 крысы и человека выявило более высокую активность токсина по отношению к рецептору крысы ($IC_{50} \sim 250$ и 840 нМ соответственно, разница в IC_{50} статистически значима, рис. 4Б,

табл. 1). Примечательно, что ранее проведенное сравнительное исследование ProTx-I на TRPA1 человека и мыши, наоборот, выявило большую активность на канале человека [8]. Разница в действии токсина на рецепторы человека, крысы и мыши может объясняться значительными различиями в аминокислотной последовательности внеклеточных петель S1-S2 и S3-S4 канала TRPA1 – основного сайта взаимодействия токсина [8]. Так, консервативный остаток Glu754 (нумерация дана для канала человека) заменен у мыши на Gly, а Glu825 в канале человека – на Asp у крысы и Asn у мыши. Кроме того, имеются и другие точечные отличия. В результате в канале мыши два отрицательно заряженных остатка в сайте связывания токсина заменены нейтральными остатками, что, вероятно, и ослабляет связывание положительно заряженной молекулы токсина (заряд +2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые разработана система рекомбинантной продукции токсина ProTx-I. Показано, что ProTx-I проявляет разную активность по отношению к каналам TRPA1 человека и крысы, а модификация N-концевой последовательности ProTx-I может привести к инактивации токсина. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект № 22-14-00326).

Работа Ю. Чэ поддержанна проектом министерства образования провинции Гуандун Китая (№ 2022KCXTD034).

Работа М.А. Шулепко, А.В. Кузнецова и Е.Н. Люкмановой поддержанна ключевым специальным проектом министерства образования провинции Гуандун Китая (№ 2023ZDZX2072).

Работа А.В. Попова (конструирование экспрессионных векторов) была выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» с использованием оборудования ЦКП «Примат».

Авторы выражают благодарность ЦКП «Протеом человека» Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (Москва, Россия) за масс-спектрометрические измерения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuhn-Nentwig L, Stöcklin R, Nentwig W. Venom Composition and Strategies in Spiders. In: *Advances in Insect Physiology*. Vol 40. Elsevier; 2011:1–86. doi: 10.1016/B978-0-12-387668-3.00001-5
2. Peigneur S, de Lima ME, Tytgat J. *Phoneutria nigriventer* venom: A pharmacological treasure. *Toxicon*. 2018;151:96–110. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.07.008
3. Lyukmanova EN, Shenkarev ZO. Toxins from Animal Venom—A Rich Source of Active Compounds with High Pharmacological Potential. *Toxins*. 2024;16(12):512. doi: 10.3390/toxins16120512
4. Cardoso FC, Lewis RJ. Structure-Function and Therapeutic Potential of Spider Venom-Derived Cysteine Knot Peptides Targeting Sodium Channels. *Front Pharmacol*. 2019;10:366. doi: 10.3389/fphar.2019.00366
5. Kintzing JR, Cochran JR. Engineered knottin peptides as diagnostics, therapeutics, and drug delivery vehicles. *Curr*

- Opin Chem Biol.* 2016;34:143–150. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.08.022
6. Milescu M, Bosmans F, Lee S, Alabi AA, Kim JI, Swartz KJ. Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(10):1080–1085. doi: 10.1038/nsmb.1679
7. Middleton RE, Warren VA, Kraus RL, et al. Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry.* 2002;41(50):14734–14747. doi: 10.1021/bi026546a
8. Gui J, Liu B, Cao G, et al. A Tarantula-Venom Peptide Antagonizes the TRPA1 Nociceptor Ion Channel by Binding to the S1–S4 Gating Domain. *Current Biology.* 2014;24(5):473–483. doi:10.1016/j.cub.2014.01.013
9. Maatuf Y, Geron M, Priel A. The Role of Toxins in the Pursuit for Novel Analgesics. *Toxins (Basel).* 2019;11(2). doi:10.3390/toxins11020131
10. Souza Monteiro de Araujo D, Nassini R, Geppetti P, De Logu F. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2020;24(10):997–1008. doi: 10.1080/14728222.2020.1815191
11. Dormer A, Narayanan M, Schentag J, et al. A Review of the Therapeutic Targeting of SCN9A and $\text{Na}_v1.7$ for Pain Relief in Current Human Clinical Trials. *J Pain Res.* 2023;16:1487–1498. doi: 10.2147/JPR.S388896
12. Moore SJ, Cochran JR. Engineering knottins as novel binding agents. *Methods Enzymol.* 2012;503:223–251. doi: 10.1016/B978-0-12-396962-0.00009-4
13. Fitches EC, Pyati P, King GF, Gatehouse JA. Fusion to snowdrop lectin magnifies the oral activity of insecticidal ω -Hexatoxin-Hv1a peptide by enabling its delivery to the central nervous system. *PLoS One.* 2012;7(6):e39389. doi: 10.1371/journal.pone.0039389
14. Yang S, Pyati P, Fitches E, Gatehouse JA. A recombinant fusion protein containing a spider toxin specific for the insect voltage-gated sodium ion channel shows oral toxicity towards insects of different orders. *Insect Biochem Mol Biol.* 2014;47(100):1–11. doi: 10.1016/j.ibmb.2014.01.007
15. Monfared N, Ahadiyat A, Fathipour Y, Mianroodi RA. Evaluation of recombinant toxin JFTX-23, an oral-effective anti-insect peptide from the spider Selenocosmia jiafu venom gland proteome. *Toxicon.* 2022;217:78–86. doi: 10.1016/j.toxicon.2022.08.003
16. Matsubara FH, Meissner GO, Herzig V, et al. Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermedia* venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. *Insect Mol Biol.* 2017;26(1):25–34. doi: 10.1111/im.12268
17. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol.* 2014;5:63. doi: 10.3389/fmicb.2014.00063
18. Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40(3–4):257–274. doi: 10.1007/s10295-013-1235-0
19. Klint JK, Senff S, Saez NJ, et al. Production of recombinant disulfide-rich venom peptides for structural and functional analysis via expression in the periplasm of *E. coli*. *PLoS One.* 2013;8(5):e63865. doi: 10.1371/journal.pone.0063865
20. Anangi R, Rash LD, Mobli M, King GF. Functional Expression in *Escherichia coli* of the Disulfide-Rich Sea Anemone Peptide APETx2, a Potent Blocker of Acid-Sensing Ion Channel 3. *Marine Drugs.* 2012;10(7):1605–1618. doi: 10.3390/MD10071605
21. Logashina YA, Solstad RG, Mineev KS, et al. New Disulfide-Stabilized Fold Provides Sea Anemone Peptide to Exhibit Both Antimicrobial and TRPA1 Potentiating Properties. Published online 2017:23.
22. Lyukmanova EN, Mironov PA, Kulbatskii DS, et al. Recombinant Production, NMR Solution Structure, and Membrane Interaction of the $\text{Pha1}\beta$ Toxin, a TRPA1 Modulator from the Brazilian Armed Spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxins.* 2023;15(6):378. doi: 10.3390/toxins15060378
23. Berkut AA, Peigneur S, Myshkin MY, et al. Structure of Membrane-active Toxin from Crab Spider *Heriaeus melletei* Suggests Parallel Evolution of Sodium Channel Gating Modifiers in Araneomorphae and Mygalomorphae. *J Biol Chem.* 2015;290(1):492–504. doi: 10.1074/jbc.M114.595678
24. Shlyapnikov YM, Andreev YA, Kozlov SA, Vassilevski AA, Grishin EV. Bacterial production of latarcin 2a, a potent antimicrobial peptide from spider venom. *Protein Expression and Purification.* 2008;60(1):89–95. doi: 10.1016/j.pep.2008.03.011
25. Paiva ALB, Matavel A, Peigneur S, et al. Differential effects of the recombinant toxin PnTx4(5–5) from the spider *Phoneutria nigriventer* on mammalian and insect sodium channels. *Biochimie.* 2016;121:326–335. doi: 10.1016/j.biochi.2015.12.019
26. Zhang H, Huang PF, Meng E, et al. An efficient strategy for heterologous expression and purification of active peptide hainantoxin-IV. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117099. doi: 10.1371/journal.pone.0117099
27. Shulepko MA, Lyukmanova EN, Shenkarev ZO, et al. Towards universal approach for bacterial production of three-finger Ly6/uPAR proteins: Case study of cytotoxin I from cobra *N. oxiana*. *Protein Expr Purif.* 2017;130:13–20. doi: 10.1016/j.pep.2016.09.021
28. Andreev YA, Kozlov SA, Vassilevski AA, Grishin EV. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions. *Anal Biochem.* 2010;407(1):144–146. doi: 10.1016/j.ab.2010.07.023
29. Rupasinghe DB, Herzig V, Vetter I, et al. Mutational analysis of ProTx-I and the novel venom peptide Pe1b provide insight into residues responsible for selective inhibition of the analgesic drug target $\text{Na}_v1.7$. *Biochem Pharmacol.* 2020;181:114080. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114080
30. Vásquez-Escobar J, Benjumea-Gutiérrez DM, Lopera C, et al. Heterologous Expression of an Insecticidal Peptide Obtained from the Transcriptome of the Colombian Spider *Phoneutria depilate*. *Toxins (Basel).* 2023;15(7):436. doi: 10.3390/toxins15070436
31. Dubovskii PV, Dubinnyi MA, Konshina AG, et al. Structural and Dynamic “Portraits” of Recombinant and Native Cytotoxin I from *Naja oxiana*: How Close Are They? *Biochemistry.* 2017;56(34):4468–4477. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00453
32. Lyukmanova EN, Shenkarev ZO, Khabibullina NF, et al. N-terminal fusion tags for effective production of g-protein-coupled receptors in bacterial cell-free systems. *Acta Naturae.* 2012;4(4):58–64.
33. Saez NJ, Cristofori-Armstrong B, Anangi R, King GF. A Strategy for Production of Correctly Folded Disulfide-Rich Peptides in the Periplasm of *E. coli*. *Methods Mol Biol.* 2017;1586:155–180. doi: 10.1007/978-1-4939-6887-9_10
34. Li J, Zhang H, Liu J, Xu K. Novel genes encoding six kinds of three-finger toxins in *Ophiophagus hannah* (king cobra) and function characterization of two recombinant long-chain neurotoxins. *Biochem J.* 2006;398(2):233–242. doi: 10.1042/BJ20060004
35. Clement H, Flores V, De la Rosa G, Zamudio F, Alagon A, Corzo G. Heterologous expression, protein folding and antibody recognition of a neurotoxin from the Mexican coral snake *Micruurus laticorallis*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2016;22(1):25. doi: 10.1186/s40409-016-0080-9
36. Lyukmanova EN, Shulga AA, Arsenieva DA, et al. A Large-Scale Expression in *Escherichia coli* of Neurotoxin II from *Naja oxiana* Fused with Thioredoxin. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2004;30(1):25–34. doi: 10.1023/B:RUBI.0000015770.38602.e3

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ 2025

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturaе* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологиях. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturaе* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturaе* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и все необходимые файлы следует загрузить на сайт www.actanaturaе.ru:

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта www.actanaturaе.ru).

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформационным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).
- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректу-

рой. Автор, ответственный за переписку, выделяется звездочкой *.

- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (в заглавии статьи пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{\text{пп}}$ – температура плавления, $T_{\text{ф.п}}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ 2025

- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μ М; нм, но не nm).
- Знак «—» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « \times ». Знак « \times » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « \times » обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК-РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не «кавычки».
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам

в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассыпает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте цифрами в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Библиографические описания цитируемых источников в списке литературы следует оформлять в соответствии с требованиями Международного комитета редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE) и AMA Manual of Style: A Guide for Authors and Editors (11th Edition).

Подробные правила оформления ссылок представлены тут: <https://actanaturaе.ru/2075-8251/pages/view/references>

Пользователям специализированного ПО для формирования библиографии редакция рекомендует следующие ресурсы:

- EndNote – скачать файл стиля Acta Naturae.ens, просмотреть референтный стиль JAMA: Journal of the American Medical Association (AMA 11th edition);
- Zotero – просмотреть референтный стиль American Medical Association 11th edition (brackets);
- Mendeley – посмотреть референтный стиль American Medical Association.

Примеры оформления ссылок:

- Hisakata R, Nishida S, Johnston A. An adaptable metric shapes perceptual space. *Curr Biol*. 2016;26(14):1911-1915. doi: 10.1016/j.cub.2016.05.047
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. CSHL Press; 2001.
- Hogue CWV. Structure databases. In: Baxevanis AD, Ouellette BFF, eds. *Bioinformatics*. 2nd ed. Life Sciences Series. Wiley-Interscience; 2001:83-109.

Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturaе@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.