

ISSN 1997-1389 (Print)
ISSN 2313-5530 (Online)

**Журнал Сибирского
федерального университета
Биология**

**Journal of Siberian
Federal University
Biology**

2020 13 (3)

ISSN 1997-1389 (Print)
ISSN 2313-5530 (Online)

2020 13(3)

Журнал Сибирского федерального университета Биология

Journal of Siberian Federal University Biology

Издание индексируется Scopus (Elsevier), «Russian Science Citation Index» и «Zoological Record» на платформе «Web of Science» (Clarivate Analytics), Российским индексом научного цитирования (НЭБ), представлено в международных и российских информационных базах: Ulrich's periodicals directory, ProQuest, EBSCO (США), Google Scholar, Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI), DOAJ, КиберЛенинка. Включено в список Высшей аттестационной комиссии «Рецензируемые научные издания, входящие в международные реферативные базы данных и системы цитирования».

**Журнал Сибирского федерального университета. Биология.
Journal of Siberian Federal University. Biology.**

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Главный редактор: *Е.С.Кравчук*. Редактор *И.А.Вейсиг*. Корректор *С.В.Хазаржан*.
Компьютерная верстка *Е.В. Гревцовой*

№ 3. 30.09.2020. Индекс: 42325. Тираж: 1000 экз.

Свободная цена

Адрес редакции и издательства: 660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79, оф. 32-03.

Отпечатано в типографии Издательства БИК СФУ
660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 82а.

*Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-28725 от 29.06.2007 г.,
выданное Федеральной службой по надзору в сфере массовых коммуникаций,
связи и охраны культурного наследия.*

<http://journal.sfu-kras.ru>

Подписано в печать 15.09.2020. Формат 84x108/16. Усл. печ. л. 9,0.
Уч.-изд. л. 8,5. Бумага тип. Печать офсетная. Тираж 1000 экз. Заказ № 12118.

Возрастная маркировка в соответствии с Федеральным законом № 436-ФЗ: 16+

CHIEF EDITOR

Michail Gladyshev, Corresponding Member of RAS, Professor, Institute of Biophysics SB RAS, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia.

SCIENCE EDITOR

Elena Kravchuk, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

EDITORIAL BOARD

- Sergey Bartsev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Andrey Degermendzhy, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Nikolay Gaevsky, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Joseph Gitelzon, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Viktor Glupov, Corresponding Member of RAS, Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia
- Malcolm Hughes, University of Arizona, Tucson, USA
- Mikhail Karpinsky, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, Russia
- Valentina Kratasyuk, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- John Lee, University of Georgia, Athens, USA
- Elena Muratova, Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Akira Osawa, Kyoto University, Kyoto, Japan
- Vitaliy Semenchenko, Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus
- Nadezhda Sushchik, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Sabu Thomas, Mahatma Gandhi University, Kottayam, India
- Aristidis Tsatsakis, University of Crete, Heraklion, Greece
- Eugene Vaganov, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Tatiana Volova, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Egor Zadereev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

CONTENTS

Anastasia S. Proskurina, Vera S. Ruzanova, Tamara V. Tyrinova, Dmitry N. Strunkin, Svetlana S. Kirikovich, Genrikh S. Ritter, Yaroslav R. Efremov and Sergey S. Bogachev The Basis of Anticancer Immunity Mechanism Induced by <i>In Situ</i> Vaccination	235
Yuriy S. Vinnik, Svetlana S. Dunaevskaya and Dar'ya A. Antyufrieva Blebbing of the Lymphocyte Plasma Membrane as a Pathogenetic Marker of Critical Ischemia of the Lower Extremities.....	270
Ekaterina A. Budenkova and Irina A. Vakoliuk Oculomotor Activity During Reading in Elementary School-Aged Students with Different Cognitive Skills	280
Julia K. Chugunova, Tatyana Yu. Ronzhina and Alexey A. Syromyatnikov The Contribution of Perch (<i>Perca fluviatilis</i> L. 1758) to Maintaining the Diphyllbothriasis Focus in the Krasnoyarsk Reservoir and the Yenisei River.....	297
Alexander N. Kudryavtsev, Ludmila P. Burakova, Ksenia A. Barinova and Ludmila A. Frank A Test System for Tick-Borne Encephalitis Virus Detection Based on Bioluminescent Immunoassay	310
Rajeev Ranjan, Maria A. Kirillova and Valentina A. Kratasyuk Ethylene Diamine Functionalized Citrate-Capped Gold Nanoparticles for Metal-Enhanced Bioluminescence.....	322
Natalia O. Zhila, Galina S. Kalacheva, Viktoriya V. Fokht, Svetlana S. Bubnova and Tatiana G. Volova Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by <i>Cupriavidus necator</i> B-10646 from Mixtures of Oleic Acid and 3-Hydroxyvalerate Precursors	331

СОДЕРЖАНИЕ

А.С. Проскурина, В.С. Рузанова, Т.В. Тыринова, Д.Н. Стрункин, С.С. Кирикович, Г.С. Риттер, Я.Р. Ефремов, С.С. Богачев Основы механизма развития противоопухолевого иммунитета при <i>in situ</i> вакцинации	235
Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Д.А. Антюфриева Блеббинг плазматической мембраны лимфоцитов как патогенетический маркер критической ишемии нижних конечностей	270
Е.А. Буденкова, И.А. Ваколюк Параметры движений глаз у младших школьников при оценке когнитивного компонента чтения.....	280
Ю.К. Чугунова, Т.Ю. Ронжина, А.А. Сыромятников Роль окуня (<i>Perca fluviatilis</i> L. 1758) в поддержании очага дифиллоботриоза в Красноярском водохранилище и р. Енисей.....	297
А.Н. Кудрявцев, Л.П. Буракова, К.А. Барина, Л.А. Франк Тест-система для выявления вируса клещевого энцефалита биолюминесцентным иммуноанализом	310
Р. Ранджан, М.А. Кириллова, В.А. Кратасюк Покрытые цитратной оболочкой и функционализированные этилендиамином наночастицы золота для усиления биолюминесценции металлом.....	322
Н.О. Жила, Г.С. Калачева, В.В. Фохт, С.С. Бубнова, Т.Г. Волова Биосинтез поли(3-гидроксибутирата-со-3-гидроксиивалерата) бактериями <i>Cupriavidus necator</i> В-10646, культивируемыми на смеси из олеиновой кислоты и предшественников 3-гидроксиивалерата	331

DOI 10.17516/1997-1389-0326

УДК 571.27, 616-006

The Basis of Anticancer Immunity Mechanism Induced by *In Situ* Vaccination

**Anastasia S. Proskurina^{a#}, Vera S. Ruzanova^{a,b#},
Tamara V. Tyrinova^c, Dmitry N. Strunkin^{c,d},
Svetlana S. Kirikovich^a, Genrikh S. Ritter^a,
Yaroslav R. Efremov^{a,b} and Sergey S. Bogachev^{a*}**

^a*Institute of Cytology and Genetics of the SB RAS
Novosibirsk, Russian Federation*

^b*Novosibirsk National Research State University
Novosibirsk, Russian Federation*

^c*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
Novosibirsk, Russian Federation*

^d*Research Institute of Molecular Biology and Biophysics
Novosibirsk, Russian Federation*

Received 03.12.2019, received in revised form 29.03.2020, accepted 25.06.2020

Abstract. The present review is an attempt to characterize the principles of both onset and development of the systemic antitumor immune response triggered by *in situ* vaccination, which is a new trend in anticancer immunotherapy. Modern methods of cancer immunotherapy usually require the presence of a specific target antigen. The *in situ* vaccination approach does not need a specific antigen. The determinants necessary for the formation of the immune response are all present at the vaccination site, as tumor cells are lysed by cells of innate immunity, infiltrating the tumor and activated by the treatments. The first part of the review is a compilation of the literature data on causes, circumstances, and factors determining the presence in the local tumor node of the totality of tumor antigens essential for the development of the adaptive antitumor immune response. The second part of the review analyzes possible events of antitumor immune response development due to *in situ* vaccination using ligand-receptor interaction and antigen-presenting cells activation, based on the data structuring performed previously.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: labmolbiol@mail.ru

These authors contributed equally to this work

ORCID: 0000-0002-7650-4331 (Proskurina A.); 0000-0002-6836-5618 (Ruzanova V.); 0000-0002-7987-2017 (Tyrinova T.); 0000-0002-3426-4501 (Kirikovich S.); 0000-0003-1573-3795 (Ritter G.); 0000-0002-0649-7543 (Efremov Ya.); 0000-0002-2019-9382 (Bogachev S.)

Keywords: antitumor immune response, antigen-presenting cells, tumor antigens, *in situ* vaccination, CpG, OX40 antibodies.

Citation: Proskurina A.S., Ruzanova V.S., Tyrinova T.V., Strunkin D.N., Kirikovich S.S., Ritter G.S., Efremov Ya.R., Bogachev S.S. The basis of anticancer immunity mechanism induced by *in situ* vaccination. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(3), 235-269. DOI: 10.17516/1997-1389-0326

Основы механизма развития противоопухолевого иммунитета при *in situ* вакцинации

**А.С. Проскурина^{а#}, В.С. Рузанова^{а,б#},
Т.В. Тыринова^в, Д.Н. Стрункин^{в,г}, С.С. Кирикович^а,
Г.С. Риттер^а, Я.Р. Ефремов^{а,б}, С.С. Богачев^а**

^аФедеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН
Российская Федерация, Новосибирск

^бНовосибирский национальный
исследовательский государственный университет
Российская Федерация, Новосибирск

^вНаучно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии
Российская Федерация, Новосибирск

^гНаучно-исследовательский институт
молекулярной биологии и биофизики
Российская Федерация, Новосибирск

Аннотация. В обзоре предпринята попытка охарактеризовать принципы возникновения и распространения системного противоопухолевого иммунного ответа при *in situ* вакцинации – новом направлении в экспериментальной иммунотерапии злокачественных новообразований. Современные методы иммунотерапии опухолей, как правило, требуют обязательного наличия специфического антигена-мишени. Подход с использованием *in situ* вакцинации не требует специфического антигена. Вся совокупность детерминант, необходимых для формирования иммунного ответа, появляется в сайте вакцинации в результате лизиса опухолевых клеток клетками врожденного иммунитета, инфильтрирующими опухоль и активированными в результате проведенных обработок. Первая часть обзора представляет собой систематизацию известных литературных данных в разрезе причин, обстоятельств и факторов, определяющих возможность появления в локальном опухолевом очаге всей совокупности опухолевых антигенов, необходимых для развития противоопухолевого адаптивного иммунитета.

[#] равный вклад авторов в работу

Вторая часть обзора базируется на проведенной систематизации и представляет собой анализ возможных событий развития системного противоопухолевого иммунного ответа при *in situ* вакцинации с использованием платформы рецептор-лиганд/антигенпрезентирующие клетки на примере синергичного действия CpG олигонуклеотидов и антител OX40.

Ключевые слова: противоопухолевый иммунный ответ, антигенпрезентирующие клетки, опухолевые антигены, *in situ* вакцинация, CpG, антитела OX40.

Цитирование: Проскурина, А.С. Основы механизма развития противоопухолевого иммунитета при *in situ* вакцинации / А.С. Проскурина, В.С. Рузанова, Т.В. Тыринова, Д.Н. Стрункин, С.С. Кирикович, Г.С. Риттер, Я.Р. Ефремов, С.С. Богачев // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(3). С. 235-269. DOI: 10.17516/1997-1389-0326

Принятые сокращения

АПК – антигенпрезентирующие клетки,

ДК – дендритные клетки,

ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity – антителозависимая клеточная цитотоксичность,

DBP – vitamin D3-binding protein – белок, связывающий витамин D₃,

GcMAF – Gc protein-derived macrophage activating factor – специфический фактор активации макрофагов,

MDSC – myeloid-derived suppressor cells – супрессорные клетки миелоидного происхождения,

NKT – natural killer T cells – натуральные киллерные Т-клетки, субпопуляция лимфоцитов, экспрессирующих как маркеры НК-клеток, так и Т-клеточные дифференцировочные антигены,

НК-клетки – натуральные киллеры,

TCR – T-cell receptor – Т-клеточный рецептор,

Teff – эффекторные Т-лимфоциты,

TLR – Toll-like receptor – Толл-подобный рецептор,

Treg – регуляторные Т-лимфоциты.

Введение

В экспериментальной противоопухолевой иммунотерапии развивается новое на-

правление, не базирующееся на системном введении препарата, направленном на активацию определенного звена иммунитета, а представляющее собой такой тип воздействия, при котором одновременно в небольшой области опухоли активируется вся совокупность иммунных клеток, и развивается противоопухолевый иммунитет, сопровождающийся разрушением первичной и дистальных опухолей и выздоровлением организма (Guiducci et al., 2005; Sagiv-Barfi et al., 2018). Такой тип локальной иммунотерапии получил название *in situ* вакцинации.

В настоящее время рассматриваются многочисленные экспериментальные технологические платформы, использующие различные методические подходы для *in situ* активации противоопухолевого иммунитета. Это использование онколитических вирусов, манипуляции с инфильтрирующими опухоль миелоидными клетками и лимфоцитами, блокада рецептор-лигандного взаимодействия (например, разрыв опухоль-ассоциированного PD1/PDL1 сигнального пути антителами против молекул контрольных точек PD1, TNF-сигнализация), абляция локальным облучением, локальная радиочастотная, ультразвуковая и криоабляция, инъекции трансформированных клеток, цитокиновая активация, тканевая

электропорация, а также различные их комбинации (Hammerich et al., 2015; Sersa et al., 2015; Hammerich et al., 2016; Aznar et al., 2017; Bilusic, Gulley, 2017; Marabelle et al., 2017; Murthy et al., 2017; Takahashi et al., 2017).

Локальная иммунотерапия имеет ряд принципиальных преимуществ перед обычной иммунотерапией: 1) доза вводимого в опухолевый очаг препарата существенно ниже в сравнении с его системным введением, что снижает токсичность терапии; 2) в этой связи можно одновременно использовать несколько технологических платформ без опасения развития неконтролируемого токсического эффекта (последствия цитокинового шторма) (Bilusic, Gulley, 2017; Marabelle et al., 2017); 3) создается высокая локальная концентрация препарата, что существенно повышает силу иммунного ответа. Тем не менее основной смысл любой из перечисленных технологических платформ – это активация антигенпрезентирующих клеток (АПК), первичное получение всей возможной совокупности опухоль-ассоциированных антигенов и разрушение супрессорного влияния опухоль-ассоциированной стромы (Marabelle et al., 2017).

Технически подход представляет собой введение в очаг опухолевого роста факторов, активирующих АПК, и факторов, так или иначе запускающих необратимую встречную волну активации АПК и одновременно активирующих клетки врожденного иммунного ответа. Активированные иммунные клетки и сеть образующихся клеточных и гуморальных связей при таком воздействии определяют неизбежность лизиса клеток опухоли в первичном очаге и появления в ограниченном пространстве всей возможной совокупности опухоль-ассоциированных антигенов. Эти антигены вследствие прямого клеточного контакта

дендритных клеток (ДК) и разрушающихся клеток опухоли непосредственно попадают во внутренние компартменты ДК. Следствием такого сценария служит появление предельного количества антигенных детерминант и максимально возможного репертуара праймированных, активированных к пролиферации и клональной экспансии эффекторных CD8⁺ Т-клеток. Размножившиеся в селезенке CD8⁺ Т-лимфоциты представляют собой адаптивное звено иммунного противоопухолевого ответа, охватывающего весь организм.

В научной литературе существуют примеры такого рода терапевтических подходов, продемонстрировавших эффективность при лечении перевитых или индуцированных экспериментальных злокачественных новообразований. Как следует из анализа литературных источников, для активации ДК используются CpG-олигонуклеотиды или TNF- α (Zaini et al., 2007; Jensen et al., 2010; Murphy et al., 2014; Sagiv-Barfi et al., 2018).

Для воздействия на другие звенья иммунного ответа применяют моноклональные антитела или другие специфические лиганды. Антитела против молекул контрольных точек PD1 (programmed cell death 1), расположенных на поверхности Т-цитотоксических клеток, превентивно предотвращают их контакт с соответствующими лигандами, расположенными на поверхности АПК, ДК, макрофагов и клеток многих опухолей. Разрыв в PD1/PDL1 сигнального пути сохраняет цитотоксическую активность Т-лимфоцитов. Именно этот принцип используется в новых иммунологических подходах к лечению злокачественных опухолей (Dong et al., 2002; Liu et al., 2007; Jensen et al., 2010; Tang et al., 2015; Farkona et al., 2016; Ключагина и др., 2017; Са-япина, 2017).

Гликолипиды α -галактозилцерамид или α -глюкуронозилцерамид также применяют в противоопухолевой экспериментальной терапии. Эти молекулы являются аналогами эндогенного гликолипида изоглобтригексозилцерамида, который представляется в качестве эндоантигена в комплексе с CD1d (фактор, относящийся к группе белков МНС класса I) АПК. Такой комплекс взаимодействует с Т-клеточным рецептором на натуральных киллерных Т-клетках (NKT), что сопровождается их активацией и сверхпродукцией IFN- γ (Metelitsa, 2011).

Большое внимание уделяется антителам или генно-инженерным лигандам к рецепторам, относящимся к суперсемейству рецепторов к фактору некроза опухоли (Melero et al., 1997, 1998; Zhang et al., 2007) и, в частности, OX40 (Redmond, Weinberg, 2007; Zaini et al., 2007; Croft, 2010; Jensen et al., 2010; Weinberg et al., 2011; Murphy et al., 2014; Sagiv-Barfi et al., 2018). В различных видах терапии злокачественных опухолей, основанных на взаимодействии с OX40-рецептором, относящимся к указанному выше семейству рецепторов фактору некроза опухоли, применяются не только антитела или генно-инженерные белковые конструкции, но и другие OX40-агонисты, такие как РНК-аптамеры (Dollins et al., 2008; Pratico et al., 2013; Nozari, Berezovski, 2017) или химические соединения (Song et al., 2014). Эти молекулы также активируют CD4+ Т-лимфоциты, индуцируя их пролиферацию и секрецию ими IFN- γ , что приводит к развитию адаптивного иммунного ответа. Эксперименты свидетельствуют, что использование таких молекул для индукции системного противоопухолевого иммунного ответа требует в обязательном порядке Fc-фрагмента антител. Эта часть молекулы антитела может быть естественной частью молекулы иммуноглобулина или входить в

состав гибридного фактора, используемого в терапии.

В настоящем обзоре предпринята попытка проанализировать начальные события активации противоопухолевого механизма при *in situ* вакцинации при использовании платформы «рецептор-лиганд с одновременной активацией АПК» на примере синергичного действия CpG олигонуклеотидов и антител OX40 (Sagiv-Barfi et al., 2018). Для анализа мы взяли именно это исследование, поскольку оно является одним из наиболее ярких демонстраций возможностей использования *in situ* вакцинации для эрадикации экспериментальных иммуногенных опухолей.

Часть I.

Принципиальные события, инициирующие начало волны противоопухолевого иммунного ответа при *in situ* вакцинации

Анализ экспериментально-терапевтического подхода (*in situ* вакцинация), позволяющего элиминировать иммуногенную опухоль (Guiducci et al., 2005; Sagiv-Barfi et al., 2018), свидетельствует о том, что существуют принципиальные положения, определяющие эффективность терапии.

На наш взгляд, принципиальная схема формирования и развития противоопухолевого иммунитета состоит из нескольких определяющих моментов. Основным и необходимым условием реализации такого подхода является выбор высокоиммуногенного типа экспериментальной опухоли. В техническом плане первое и наиболее важное обстоятельство – это совместное введение препаратов в небольшую область опухолевого очага (*in situ*). Начало инициирующих событий должно происходить в локальном, ограниченном месте опухолевого роста. Пространственное разделение инициирую-

щих событий не позволит достичь «критической массы» совокупного индуцирующего потенциала, необходимого для стабилизации и развития возникшего иммунного ответа. Для процесса инициации необходимо, чтобы иницирующие типы клеток находились или в непосредственном контакте, или в непосредственной близости друг к другу. Очаг опухоли должна инфильтрировать достаточная по числу совокупная популяция клеток врожденного иммунитета, отвечающая за неспецифический лизис трансформированных клеток и появление первой волны антигенов. Антигенпрезентирующие ДК и макрофаги должны быть активированы и иметь потенциал «захватывать» появившиеся в непосредственной близости опухолевые антигены. И, наконец, первично активированное иммунное разрушение опухолевых клеток должно непрерывно поддерживаться гуморальным фоном и межклеточными взаимодействиями уже активированных иммунных клеток, инфильтрирующих опухолевый очаг. Таким образом, принципиальная схема развития противоопухолевого иммунитета представляет собой несколько независимых и вытекающих один из другого процессов. Происходит активация (*in situ*) системы клеток врожденного иммунитета; киллинг клеток первичной опухоли и ее полный лизис; созревание антигенпрезентирующих ДК и активация макрофагов, презентация антигена или *in situ* или после миграции в периферические лимфоузлы (Талаев, Плеханова, 2014); активация и прайминг системы клеток адаптивного иммунитета антигенами, появившимися в результате первичного лизиса клеток опухоли; амплификация и выход на периферию цитотоксических Т-лимфоцитов; лизис дистальных очагов опухоли системой клеток адаптивного иммунитета; формирование системы клеток последующего дли-

тельного иммунного надзора (клеток памяти). Такая форма противоопухолевого ответа предполагает, что две дополняющие друг друга системы задействованы в эрадикации экспериментальных иммуногенных опухолей, описанной в цитируемых выше работах: это система клеток врожденного иммунитета и система клеток приобретенного иммунитета.

Все фазы развития противоопухолевого иммунитета имеют многочисленные векторы активации, включающие взаимодействие различных типов клеток, взаимодействие специфических рецепторов и их лигандов, секрецию растворимых молекул, создающих гуморальный фон, поддерживающий развивающийся иммунный ответ. Векторы активации могут существовать независимо и могут пересекаться в различных сочетаниях. Такое положение вещей делает полный интегральный анализ происходящих событий практически невозможным. Тем не менее именно активность системы клеток врожденного иммунитета и первичный лизис неопластических клеток (или любое иное воздействие, индуцирующее локальное появление максимально возможной совокупности опухолевых антигенов) служат первопричиной индукции противоопухолевого иммунитета.

В этой связи в данной части обзора будет дана краткая характеристика возможных механизмов неспецифического лизиса клеток опухоли. Кратко будут охарактеризованы и типы клеток врожденного иммунитета, которые отвечают за неспецифический лизис трансформированных клеток и появление первой волны антигенов. Появление первой волны антигенов составляет основу развития адаптивного противоопухолевого иммунного ответа, которая определяется АПК и CD8+ Т-клетками.

Возможные принципиальные механизмы киллинга клеток опухоли и типы клеток врожденного иммунитета, осуществляющих литическую функцию по отношению к трансформированной клетке

Появление антигенного репертуара, который далее приведет к развитию адаптивного иммунного ответа, возможно только в случае лизиса опухолевых клеток в первичном очаге опухоли. При обработке *in situ* разрушение клеток опухоли может осуществляться несколькими путями. Неспецифическое физическое повреждение клеток происходит при введении препаратов в опухоль. Специфическое разрушение опухолевых клеток будет определяться клетками врожденного иммунитета, обладающими арсеналом литических механизмов, которые будут активированы проведенными обработками. К таким механизмам можно отнести прямую цитолитическую активность натуральных киллеров (NK-клетки), NKT, макрофагов, нейтрофилов, ДК, CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и апоптоз, индуцируемый через систему рецепторов смерти. Производным механизмом лизиса клеток опухоли является осуществляемый NK-клетками и некоторыми другими клетками врожденного иммунитета антителозависимый лизис.

Принципиально существуют три варианта разрушения клеток, происходящего за счет активности иммунной системы: 1) прямой осмотический лизис, который характерен для системы комплемента; 2) некротический лизис, который развивается при секреции галогенов и их производных, токсичных соединений азота и кислорода макрофагами и нейтрофилами; 3) запуск генетически запрограммированного апоптоза или некроза (Манских, 2007). Имеются два основных пути реализации клеточной цитотоксичности, свя-

занной с индукцией апоптоза: перфорин-зависимый и Fas-зависимый механизм лизиса. В общих чертах эти процессы выглядят следующим образом.

Перфорин-зависимый механизм лизиса

Этот механизм лизиса реализуется после распознавания антигена клетки-мишени клеткой-киллером, при этом происходят следующие события. Формируется прочный контакт клетки-киллера с клеткой-мишенью или при участии специфических иммунных комплексов (например, NKG2D/MICA, MICB), или при взаимодействии других лиганд-рецепторных пар (например, LFA/ICAM-1) (Diamond et al., 1991). Происходит реорганизация цитоплазматических гранул и компонентов цитоскелета клеток-киллеров, вследствие чего содержимое гранул выходит в зону межклеточного контакта. Освободившийся из гранул перфорин (в присутствии ионов кальция) активируется и полимеризуется. Через сформированную пору в клетку мишень проникают гранзимы, представляющие собой сериновые протеазы. Гранзимы активируют систему каспаз, которые являются исполнительным механизмом запуска процесса апоптоза (Thiery et al., 2011).

Fas-зависимый механизм лизиса.

Система рецепторов смерти

Практически все клетки организма, за исключением клеток иммуопривилегированных тканей, CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток, имеют в составе цитоплазматической мембраны Fas рецепторы или объединенные в одно семейство, схожие структурно и функционально, TNF- α рецепторы (Janssen et al., 2003; Peter, Krammer, 2003; Wajant et al., 2003; Chakrabandhu et al., 2008; Aggarwal, 2003). Эти рецепторы называются рецепторами клеточной смерти. Для

всех рецепторов смерти существуют свои лиганды, связь с которыми запускает внутриклеточные механизмы или апоптоза, или клеточного спасения. Охарактеризованы следующие рецепторы смерти и их лиганды, посредством которых индуцируется апоптоз клеток. Это FasR/FasL, TNFR1/TNF- α , TRAIR1, TRAIR2/TRAIL и DR3/TL1A.

Для системы рецепторов смерти описан принципиально один механизм индукции апоптоза с некоторыми незначительными различиями. Начало развития апоптотического каскада происходит при физическом взаимодействии рецептора смерти и его лиганда. В результате конформационных изменений молекулы рецептора и следующей за этим активации системы каспаз, передающей апоптотический сигнал, активируется специфический ДНКазный комплекс CAD/ICAD. Запускается апоптотическое разрушение клетки (Philchenkov, 2003; Peter, Krammer, 2003; Wang et al., 2010; Уткин, Новиков, 2012). Для запуска апоптоза FasR/FasL, TNFR1/TNF- α комплексы должны интернализироваться (Kohlhaas et al., 2007; Falschlehner et al., 2009). Ассоциация TRAILR1, TRAILR2/TRAI и DR3/TL1A индуцирует апоптотический каскад без интернализации комплекса во внутренние компартменты клетки. TRAIL3 и TRAIL4 участвуют в запуске антиапоптотической программы. В цитоплазматическом участке молекул этих белков находится «домен спасения». Он ингибирует проведение апоптотического сигнала при связывании с фосфатазой FAP1 (Мисюрин, 2015).

Различные типы клеток врожденного иммунитета способны осуществлять первичный лизис опухолевых клеток. В следующих разделах обзора мы попытаемся ответить на вопрос, какие иницирующие молекулы и клеточные взаимодействия из известных яв-

ляются первопричиной инициации развития процесса такого лизиса.

НК-клетки.

Антителозависимый лизис

НК-клетки представляют собой систему клеток врожденного иммунитета, которые обладают способностью к контактному цитолиту клеток-мишеней. Кроме того, эти клетки в ответ на активирующий или ингибирующий сигнал секретируют множество цитокинов и хемокинов, которые влияют на другие системы клеток врожденного иммунитета – макрофаги, ДК, нейтрофилы, участвуя тем самым в акселерации петли активации врожденного иммунитета и активации адаптивного иммунного ответа (Dennehy et al., 2011).

Литическая функция НК-клеток реализуется тремя литическими механизмами: с участием экзоцитируемых азурофильных гранул (Cooper et al., 2001; Caligiuri, 2008; Thiery et al., 2011), при непосредственном контакте (FasL, TRAIL и др.) с рецепторами смерти на поверхности клеток-мишеней (Kovalenko et al., 2007; Абакушина и др., 2012) и с использованием механизма антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (Gómez Román et al., 2014). В результате активации нескольких литических механизмов формируется синергичный независимый киллинг опухолевых клеток-мишеней через разные активирующие молекулярные пути (Wang et al., 2015).

НК-клетки имеют несколько механизмов распознавания клеток-мишеней, в том числе опухолевых клеток. Существует общепринятая концепция, что в основе клеточного распознавания мишеней и цитолитической активности НК-клеток лежит принцип «утраты своего» (missing self) (Ljunggren, Kärre, 1990; Ito et al., 2006; Biassoni, 2009; Bjorkstrom et al., 2010). Картина представленных на цитоплаз-

матической мембране МНСI молекул и их количество распознаются NK-клетками (семейство KIR рецепторов, CD94/NKG2A, другие лектиноподобные белки С типа). Сдерживание литической активности NK-клеток связано с взаимодействием KIR или CD94/NKG2A ингибирующих рецепторов с белками МНСI. Если при контактном взаимодействии клетки-киллера и клетки-мишени, осуществляемом за счет других рецепторов, количество белков МНСI соответствует опознаваемой NK-клетками «норме», то лизиса клетки не происходит. Если количество или характерный паттерн МНСI белков не опознается NK-клетками, то реализуется цитолитическая активность натурального киллера (Le Dréan et al., 1998; Long, 2008; Jamil, Khakoo, 2011). Опухолевые клетки несут на своей цитоплазматической мембране незначительное количество белков МНСI, что делает их главной мишенью цитолитической функции NK-клеток (Le Dréan et al., 1998; Bottino et al., 2005).

В трансформированных клетках постоянно активированы сигнальные каскады, сообщающие клетке о многочисленных разнообразных нарушениях клеточного метаболизма. В норме при таких обстоятельствах через систему p53 запускается апоптоз и клетка лизируется. В случае раковых клеток p53 система инактивирована и апоптоз не происходит. Тем не менее сигналы о нарушениях продолжают возникать и поддерживать системы клеточного наблюдения. Такая перманентная стресс-активация приводит к синтезу и экспрессии на поверхности раковых клеток стресс-индуцированных молекул MICA и MICB, относящихся к семейству неканонических молекул гистосовместимости МНС класса Ic (Groh et al., 1999; Girardi et al., 2001). Экспонирование этих белков на поверхности цитоплазматической мембраны предшествует появлению в клетке анти-

гена, не зависит от него и является наиболее ранней манифестацией трансформированной клетки. Представленные на поверхности стресс-индуцированные молекулы опознаются NKG2D рецептором NK-клетки, который индуцирует цитолиз клетки-мишени (Bauer et al., 1999; Jamieson et al., 2002; Biassoni et al., 2003). То есть опухолевые клетки, на которых экспрессированы стресс-индуцированные молекулы, могут подвергаться лизису независимо от количества молекул гистосовместимости МНС класса Ia и Ib (Бережной и др., 2008). Однако если клетка-мишень тем не менее экспрессирует значительное количество молекул МНСI, то они распознаются ингибиторными рецепторами, сигналы которых блокируют активацию и развитие иммунных реакций. Таким образом, для активации цитолитической активности NK-клеток важен баланс между активационными и ингибирующими сигналами (принцип «наличия или отсутствия») (Piontek et al., 1985).

Основой феномена «неоднозначности в принятии решения – лизировать клетку-мишень или нет» NK-клетками является тот факт, что сигнальные молекулы, определяющие передачу активационного и ингибиторного сигналов на этапе «принятия решения», одни и те же, и полярность сигнала определяется их статусом фосфорилирования. Проведение активирующего сигнала запускается фосфорилированием сигнальных молекул при связывании активирующих рецепторов. При связывании ингибиторных рецепторов происходит дефосфорилирование тех же самых сигнальных молекул, что приводит к отмене активирующего сигнала (Le Dréan et al., 1998; Бережной и др., 2008; Абакушина и др., 2012).

NK-клетки имеют еще один универсальный механизм распознавания клеток-мишеней – ADCC. ADCC представляет собой ме-

ханизм, посредством которого эффекторные клетки, несущие на своей поверхности Fc рецепторы (CD16), могут опознавать и лизировать покрытые антителами таргетные клетки, экспонирующие на своей поверхности опухолевые или патоген-ассоциированные антигены (Gómez Román et al., 2014). Необходимо отметить, что киллинг опухолевых клеток по механизму ADCC также реализуется при активации нейтрофилов, макрофагов, эозинофилов (Peipp et al., 2008; Schneider-Merck et al., 2010; Bryceson et al., 2012).

Проведенный анализ предполагает, что при *in situ* вакцинации начало литического процесса и его развитие в первую очередь принадлежит именно NK-клеткам. Апоптотически разрушенные опухолевые клетки образуют совокупность опухолевых антигенов, которые поглощаются расположенными в непосредственной близости в опухолевом очаге активированными АПК, что сопровождается развитием адаптивного иммунного ответа.

Макрофаги

Макрофаги также являются популяцией клеток, немедленно реагирующей на раздражитель в виде трансформированных клеток. Тем не менее эти фагоцитирующие клетки первоначально должны быть активированы. Активация макрофагов осуществляется активированными Т-хелперами 1-го типа при физическом контакте клеток или паракринно цитокинами. Активация макрофагов на уровне транскрипции генов наблюдается через час после добавления к культуре клеток активирующего коктейля цитокинов, а начало секреции активных молекул происходит через 24 ч инкубации. Активация макрофагов через презентацию антигенов занимает от одного до нескольких (5-7) дней после контакта с антигеном. Эти факты предполагают, что макрофаги при указанном варианте со-

бытий начинают цитолитическое действие во втором эшелоне активации противоопухолевого врожденного иммунного ответа *in situ* (Зенков и др., 2007; Монастырская и др., 2008; Yue et al., 2012; Никонова и др., 2017; Чердынцева и др., 2017). В дополнение к сказанному известно, что макрофаги, инфильтрирующие опухоль, поляризуются в проопухолевые макрофаги M2 фенотипа и функционируют как супрессоры Т-лимфоцитов (для детализации см. раздел «Нейтрофилы»). Это означает, что M2-макрофаги опухолевой стромы с малой долей вероятности принимают участие в формировании первой волны опухолевых антигенов.

Описан путь активации макрофагов, связанный с гликозидазной активностью «воспаленных» Т- и В-лимфоцитов, который определяется превращением белка, связывающего витамин Д3 (DBP), в специфический активатор макрофагов (GcMAF) (Greilberger, Herwig, 2020; Останин и др., 2019). Гликозилированный DBP содержит один трисахарид в позиции 420 остатка треонина, состоящий из N-ацетилгалактозамина с двумя разветвленными остатками сахаров галактозы и сиаловой кислоты. Известно, что в зоне воспаления (опухолевый очаг характеризуется постоянно текущим воспалительным процессом) на цитоплазматической мембране активированных воспалительным процессом В- и Т-клеток экспонируются ферменты β-галактозидаза и сиалидаза соответственно. В результате сайт-специфического двойного дегликозилирования DBP конвертируется в GcMAF, содержащий остаточный сахар N-ацетилгалактозамин (GalNAc) (Yamamoto, Kumashiro, 1993; Yamamoto et al., 2008).

Можно предположить, что секретируемые медиаторы воспаления индуцируют выход на цитоплазматическую мембрану лимфоцитов специфических гликозидаз и

что этот процесс является более ранним событием в активации лимфоцитов по сравнению с их антиген-зависимой активацией. В работах (Homma, Yamamoto, 1990; Yamamoto, Kumashiro, 1993; Yamamoto et al., 2008) показано, что культивирование Т- и В-лимфоцитов в течение 30 мин в присутствии синтетического аналога мембранно-связанных фосфолипидов додецилглицерола приводит к способности этих клеток конвертировать DBP в GcMAF. При этом сам процесс активации макрофагов «воспаленными» Т- и В-лимфоцитами занимает в эксперименте 1-2 ч. Это означает, что постоянно находящийся в плазме крови DBP может быть «немедленно» конвертирован в активирующий макрофаги фактор (GcMAF) специфическим дегликозилированием. Этот процесс может составлять основу первичного лизиса раковых клеток макрофагами, активированными таким путем.

Известно, что различные типы клеток, включая опухолевые, экспрессируют на своей поверхности CD1d-молекулы главного комплекса гистосовместимости. CD1d-молекулы имеют гидрофобную антиген-связывающую бороздку, способную селективно «заякоривать» процессированные гликолипидные антигены (East et al., 2014; Zajonc, Girardi, 2015; Акинфиева и др., 2010; Webb et al., 2016). Для клеток опухоли показана повышенная экспрессия CD1d на цитоплазматической мембране, которая связана с изменениями метаболизма клетки (Subrahmanyam et al., 2014; Webb et al., 2016). В некотором смысле можно считать, что CD1d, с повышенной эффективностью экспрессирующийся на поверхности трансформированной клетки, является еще одним стресс-сигналом, маркирующим опухолевую клетку. Именно липидные антигены в составе CD1d, контактируя с Т- и В-лимфоцитами, могут служить «спусковым механизмом» для появления на

поверхности инфильтрирующих опухоль Т- и В-лимфоцитов специфических гликозидаз и следующей за этим конверсии DBP в GcMAF и активации макрофагов. В эксперименте, как было сказано выше, этот процесс занимает 1-2 ч и при экстраполяции на условия *in vivo* может считаться немедленным ответом врожденной иммунной системы на стимул. Именно таким образом активированные макрофаги могут входить в группу клеток, участвующих в появлении первой волны антигенов опухолевых клеток в экспериментах по *in situ* вакцинации. Следует отметить, что активированные таким образом макрофаги осуществляют свои профессиональные функции, в частности фагоцитоз, используя Fc рецептор-опосредованный механизм (Ngwenya, Yamamoto, 1985, 1986; Yamamoto, Ngwenya, 1987).

Макрофаги способны лизировать клетку многими описанными для других цитотоксических клеток механизмами (Fas/FasL, TRAIL/TRAILR, TNF- α /TNF- α R, ADCC). Известен малоизученный механизм литической активности макрофагов, направленный на клетки опухоли и связанный с синергичным действием хитотриозидазы и протеаз (Pan, 2012). Тем не менее считается, что одним из основных механизмов цитотоксичности макрофагов является индукция апоптоза или некроза клетки-мишени секретлируемыми макрофагами продуктами перекисного окисления, оксидом азота (NO) и свободными формами кислорода.

Активированные макрофаги относятся к противоопухолевым клеткам M1 фенотипа, способным разрушать опухолевые клетки. Предполагается, что активированные периферические макрофаги M1 фенотипа, впервые попавшие в опухолевый очаг, но не опухоль-ассоциированные M2 фагоциты, могут принимать участие в первичном ли-

зисе опухолевых клеток до момента их проопухоловой поляризации. В другом случае проведенные терапевтические обработки могут стимулировать процесс реполяризации опухоль-ассоциированных макрофагов в опухоль-реактивный фенотип M1. При таких условиях M1 макрофаги могут участвовать в образовании первой волны опухолевых антигенов.

Нейтрофилы

Нейтрофилы – это еще один тип клеток иммунной системы, которые инфильтрируют опухоль и обладают цитолитической активностью (Pericle et al., 1996; Igney et al., 2005; Brandau, 2013). Они могут осуществлять лизис, используя механизм дегрануляции азурофильных и специфических гранул (Lichtenstein et al., 1988; Segal, 2005). Также нейтрофилы секретируют цитокины, в том числе TNF- α , индуцирующий апоптоз раковых клеток через систему рецепторов смерти (Di Carlo et al., 2001). Ключевая роль в литической активности нейтрофилов отводится секретлируемым ими активным формам кислорода и азота, а также галогенов, включая гипохлорную кислоту.

Фагоцитоз уже разрушенных раковых клеток или раковых клеток, опсонизированных антителами при взаимодействии Fc-рецептора нейтрофилов, приводит к активации фагоцитов. Лизис раковых клеток сопровождается нарастающим увеличением количества антигенного материала в опухолевом очаге (Dallegrì et al., 1991; Di Carlo et al., 2001; Jabłońska et al., 2005; Klebanoff, 1999; Segal, 2005; Мальцева, Сафронова, 2009; Gómez Román et al., 2014).

Следует отметить, что такая цитотоксическая активность нейтрофилов характерна только для опухоли на начальных этапах развития. Это связано с тем, что развива-

ющаяся опухоль инициирует быструю H2 проопухоловую реполяризацию H1 опухоль-реактивных нейтрофилов. И, таким образом, на более поздних стадиях развития опухоли нейтрофилы, инфильтрирующие неопластический очаг, проявляют проопухоловую активность. Такие нейтрофилы представляют собой часть популяции супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) опухоль-ассоциированной стромы (De Largo et al., 2004; Knaapen et al., 2006; Zhdanova et al., 2007; Кулаков и др., 1999; Лисяный, Лисяный, 2018). В настоящее время установлено, что MDSC (для мышинной модели) представлены двумя наиболее многочисленными популяциями. Это гранулоцитарная или полиморфноядерная фракция MDSC, несущая маркеры CD11b+Lys6G+Lys6Clow и морфологически схожая с нейтрофилами, и моноцитарная, несущая маркеры CD11b+Lys6G-Lys6Chigh и морфологически схожая с моноцитами. Характерной особенностью обеих популяций клеток является супрессия иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. Основная мишень супрессии – Т-лимфоциты. Супрессия осуществляется различными механизмами и зависит от различных факторов, включая CD62-ADAM17 и Gal-9-TIM-3-взаимодействие, аргиназу 1, iNOS, TGF β , IL-10, COX-2, VEGF, TGF beta 1, индоламин-2-3-диоксигеназу (IDO) (Corzo et al., 2010; Gabrilovich, 2017; Kumar et al., 2016; Li et al., 2009; Medina-Echeverz et al., 2014; Petty, Yang, 2017; Atretkhany, Drutskaya, 2016; Чердынцева и др., 2017).

Проведенный анализ предполагает, что активированные нейтрофилы так же, как и макрофаги в случае их первичного попадания в опухолевый очаг или H1 реполяризации после проведенных обработок, могут принимать участие в первичном лизисе опухолевых клеток.

НКТ

Этот тип клеток относится к классу лимфоцитов, экспрессирующих маркеры НК-клеток CD16, CD56 и Т-клеточные дифференцировочные антигены CD3, CD4, CD8. НКТ экспрессируют TCR, который участвует в распознавании липидных антигенов, связанных с молекулой гистосовместимости CD1d, экспрессирующейся на АПК макрофагах, ДК, В-лимфоцитах. Показано, что CD1d может сверхэкспрессироваться на поверхности опухолевых клеток, что отражает изменение клеточного метаболизма (Webb et al., 2016). Это означает, как уже было отмечено, что CD1d может представлять собой еще один стресс-сигнал, свидетельствующий о трансформированности клетки.

Стимуляция НКТ происходит при связывании TCR НКТ с CD1d. Стимулированные НКТ в течение 1-2 ч начинают активную секрецию цитокинов IFN- γ и TNF- α . Такой быстрый ответ на стимул, по-видимому, связан с присутствием предшественников цитокинов в инфламмосомах до активации клеток (Behar, Cardell, 2000; Sköld, Behar, 2003; Godfrey, Kronenberg, 2004; van Dommelen, Degli-Esposti, 2004; Chung et al., 2005; Bendelac et al., 2007; Webb et al., 2016). Считается, что НКТ вносят минимальный вклад в прямой лизис клеток опухоли. Основное действие этого типа клеток связано с активной продукцией цитокинов, действующих как стимулирующий сигнал для активации NK и CD8+ Т-лимфоцитов (Smyth, Godfrey, 2000; Street et al., 2001; Акинфиева и др., 2010).

Имеются данные о прямой цитолитической активности НКТ в отношении M2 макрофагов и MDSC, инфильтрирующих опухоль. Этот факт означает, что НКТ могут опосредованно, через уменьшение числа опухоль-ассоциированных макрофагов и MDSC, влиять на опухоль. Также этот факт может

означать, что при определенных условиях в отношении неопластических клеток может осуществляться прямая цитолитическая активность НКТ (Zaini et al., 2007; Акинфиева и др., 2010; Croft, 2010; Metelitsa, 2011).

Цитотоксическая активность ДК

Наряду с классическими эффекторными клетками (НК-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты), киллерной активностью против опухолевых клеток-мишеней обладают ДК. На текущий момент цитотоксическая функция продемонстрирована для различных типов ДК (миелоидных ДК, в том числе и клеток Лангерганса, плазмцитоподобных ДК, ДК моноцитарного происхождения) (Fanger et al., 1999; Lu et al., 2002; Stary et al., 2007; Le Poole et al., 2008), хотя механизмы ее реализации и биологическая значимость остаются во многом неизученными. Как и классические эффекторные клетки, ДК экспрессируют медиаторы грануло-опосредованной цитотоксичности перфорин и гранзим Б, а также молекулы семейства TNF (TRAIL, FasL, TNF- α), опосредующие рецептор-зависимую цитотоксичность.

Показано, что ДК обладают прямым цитолитическим действием против различных опухолевых линий (Janjic et al., 2002; Stary et al., 2009; Tyrinova et al., 2013; Hira et al., 2014), осуществляемым через механизмы запуска апоптоза (Vanderheyde et al., 2001; Lu et al., 2002; Yu et al., 2002; Майборода, 2013). Установлено, что медиаторами цитотоксической активности являются незрелые ДК (Matsui et al., 2009; Fanger et al., 1999; Lu et al., 2002), при этом в процессе созревания их цитотоксическая активность снижается или полностью исчезает (Buelens et al., 1997; Lu et al., 2002; LaCasse et al., 2011). Можно предположить, что именно незрелые ДК (входящие в популяцию инфильтрирующих опухоль MDSC)

выполняют функцию киллерных клеток, которые лизируют опухолевую клетку.

Таким образом, ДК также можно отнести к популяции клеток, инфильтрирующих опухоль, от активности которых зависит появление первых опухоль-ассоциированных антигенов, требующихся в качестве материала для развития системного иммунного ответа при *in situ* вакцинации. Логично предположить, что лизис, осуществляемый этими клетками, сопровождается немедленным поглощением ими материала разрушенных клеток опухоли непосредственно в месте произошедших деструктивных событий. Нагруженные антигеном зрелые ДК промотируют активацию и экспансию антиген-специфичных Т-клеток.

Цитокины и их роль в иницирующих событиях и поддержании индуцированного иммунного ответа

В конце проведенного анализа необходимо кратко определить положение цитокиновой поддержки при «завязке» противоопухолевого иммунного ответа в опухолевом очаге при условии активации киллерных функций иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. Клетки секретируют цитокины в небольшом объеме опухолевого очага, что позволяет непрерывно поддерживать их высокую локальную концентрацию. Это создает условия для длительного поддержания иммунных клеток в активном состоянии. Одновременно при активации на цитоплазматической мембране инфильтрирующих опухоль иммунных клеток экспрессируются многочисленные специфические рецепторы или их лиганды, а также рецепторы к различным цитокинам. То есть клетка готова в любом формате отвечать на специфическое взаимодействие с агонистами.

Активированные иммунные клетки, инфильтрирующие опухоль, секретируют в

очаге опухолевого роста практически всю известную палитру цитокинов, хемокинов и факторов роста, которые создают гуморальный фон перманентного самоподдержания их активного состояния. Четыре из них формируют базовые векторы поддержания иммунных реакций клеток иммунной системы, инфильтрирующих опухоль. Это IFN- γ , TNF- α , IL-12 и IL-2.

IFN- γ прямо стимулирует клетки иммунной системы, такие как макрофаги и НК-клетки, повышает синтез молекул белков МНС классов I и II и активирует иммунопротеасомы. Высокий уровень молекул МНСII обеспечивает презентацию процессированных (включая раковые) антигенов Т-хелперам 1-го типа. Т-хелперы 1-го типа, в свою очередь, выделяют цитокины, которые координируют активность других клеток иммунной системы (Кадагидзе, 2003; Schroder et al., 2004; Серебренникова, Семинский, 2008; Billiau, Matthys, 2009; Луцкий и др., 2015).

TNF- α и его рецепторы формируют сигнальную систему широкого спектра действия, включая регуляцию врожденного и адаптивного иммунного ответа. TNF- α индуцирует активацию нейтрофилов, макрофагов, ДК, а также их хемотаксис. В макрофагах и нейтрофилах под влиянием TNF- α повышается образование активных форм кислорода, которые вызывают деструкцию мембран и гибель клетки-мишени по механизму некроза (Серебренникова, Семинский, 2008; Wu, Hymowitz, 2010; Дунаев и др., 2012; Olmos, Lladó, 2014).

IL-12 является важным иммунорегулирующим цитокином, который продуцируют АПК. Секреция IL-12 регулирует врожденный иммунный ответ и определяет развитие адаптивного иммунного ответа (Akira, 2000; Trinchieri, 2003; Del Vecchio et al., 2007; Серебренникова, Семинский, 2008; Hamza et al., 2010; Li, 2015).

IL-2 имеет важное значение для появления и развития иммунного ответа. Этот цитокин индуцирует пролиферацию В-лимфоцитов, активирует цитотоксические Т-лимфоциты и макрофаги, стимулирует НК-клетки (Кадагидзе, 2003; Серебренникова, Семинский, 2008; Malek, 2008; Woyma, Sprent, 2012).

Первичная реакция клеток иммунной системы на распознавание неопластических клеток заключается в секреции воспалительных цитокинов, ключевыми из которых являются IFN- γ и TNF- α . Макрофаги в ответ на распознавание опухолей секретируют TNF- α , а при активном фагоцитозе спектр цитокинов, продуцируемых макрофагами, увеличивается и включает продукцию IL-12, IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , CSF. NK-клетки, Т-лимфоциты и NKT в результате активации секретируют IFN- γ . IFN- γ стимулирует созревание ДК, активирует макрофаги и CD8⁺ Т-лимфоциты. Зрелые ДК начинают секрецию IL-12, который, в свою очередь, стимулирует продукцию IFN- γ и IL-2. Это в совокупности дополнительно стимулирует киллерные системы иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль.

Таким образом, для цитокинов начальной фазы развития иммунного ответа характерно взаимно активирующее и взаимно усиливающее действие. Последующие цитокиновые каскады в той или иной степени унифицированы и связаны с цитокинами, определяющими формирование базовых векторов поддержания иммунных реакций инфильтрирующих опухоль клеток. IFN- γ активирует клетки, которые начинают секретировать TNF- α , и наоборот, TNF- α создает условия для миграции в данную область клеток, способных секретировать IFN- γ . IL-12 и IL-2 усиливают синтез TNF- α и IFN- γ и стимулируют продукцию этих цитокинов в неактивированных клетках (Бережной и др., 2008).

В такой стохастической неопределенности создается взаимосвязанная, самоподдерживающаяся гуморальная сеть, в которой происходят процессы, связанные с межклеточным взаимодействием и направленные на киллинг трансформированных клеток.

Дополнительно, на наш взгляд, необходимо упомянуть о роли системы Toll-like рецепторов (TLR) в событиях активации противоопухолевого иммунного ответа при *in situ* терапии. Известно, что эта группа рецепторов может экспрессироваться как иммунными, так и опухолевыми клетками. При активации TLR клетки начинают секретировать различные цитокины и кофакторные молекулы. Стимуляция TLR, экспрессируемых иммунными клетками, является одним из терапевтических подходов, используемых для усиления противоопухолевой активности клеток врожденного иммунитета (например, CpG). При стимуляции TLR, экспрессируемых клетками опухоли, наблюдается активация пролиферации, развитие устойчивости к химиотерапии и увеличение общей выживаемости опухолевых клеток. Это означает, что для формирования устойчивого противоопухолевого ответа при *in situ* терапии необходимо создание условий для смещения баланса в направлении активации иммунных клеток опухолевой стромы в противовес супрессорной активности клеток опухоли (Dajon et al., 2017).

Часть II.

Последовательность принципиальных событий активации противоопухолевого иммунитета и участники этих событий на примере *in situ* вакцинации с использованием CpG олигонуклеотидов и антител к рецептору OX40

Как уже было отмечено, одной из наиболее ярких демонстраций возможностей

использования *in situ* вакцинации для эрадикации экспериментальных иммуногенных опухолей являются результаты исследования (Sagiv-Barfi et al., 2018), в котором охарактеризован терапевтический противоопухолевый эффект синергичного действия CpG и антител к OX40 (платформа активации противоопухолевого иммунитета «рецептор-лиганд/АПК»).

Поскольку работа экспериментальная, в ней не рассматриваются все возможные варианты активации противоопухолевого иммунного ответа при *in situ* вакцинации CpG и антителами к OX40. В этой связи в дополнение к результатам, описанным в цитируемой работе, нами был проведен анализ литературных источников, позволивший расширить возможный круг клеток-мишеней, участников процесса индукции противоопухолевого иммунитета, которые могут быть активированы совместным введением в опухолевый очаг всего двух активаторов: CpG и антител к рецептору OX40. Ниже рассмотрены детали принципиальных событий такой активации.

Первичная активация иммунных клеток, находящихся в тесном контакте между собой и с опухолевыми клетками, происходит в малом ограниченном объеме опухолевого очага, т.е. *in situ*, одновременно по нескольким векторам активации. В таких условиях вся совокупность опухоль-инфильтрирующих клеток находится в динамическом физическом контакте друг с другом в различных сочетаниях, образуя меняющийся контактный «калейдоскоп». При такой внутренней организации любой сигнал может передаваться без задержки, поскольку при этом отсутствует элемент «стохастического дистантного поиска или хемокин-опосредованной миграции». Указанная фаза в развитии системного иммунного ответа главенствующая, поскольку именно здесь впервые появ-

ляются (активируются) клетки, лизирующие опухоль, и впервые появляются опухолевые антигены, «захватываемые» активированными ДК и макрофагами, что служит основой развития адаптивного иммунного ответа. В этой связи одной из целей настоящей части обзора выступает попытка охарактеризовать причинно-следственные связи, определяющие завязку и развитие противоопухолевого иммунитета при *in situ* вакцинации с использованием CpG и антител к OX40. В разделе охарактеризованы реперные качественные позиции, позволяющие в той или иной мере экстраполировать полученный результат на имеющуюся онтологическую действительность и оценить возможный реальный ход событий.

Реперные характеристики развития противоопухолевого иммунитета

Противоопухолевый иммунитет связан с активностью Т-клеток. Для развития иммунитета нужны как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоциты. Деплеция любого из указанных типов клеток по отдельности или вместе полностью отменяет развитие системного иммунного ответа при введении CpG и антител к OX40. Оба типа Т-клеток, выделенных из мышей, предварительно обработанных CpG и антителами к OX40, продемонстрировали противоопухолевый ответ. Показано, что в сайте вакцинации при введении CpG и антител к рецептору OX40 число обоих типов Т-клеток немедленно возрастает. Через 24 ч количество этих клеток возрастает в селезенке, через 5 суток – в дистально растущей опухоли. Индивидуально выделенные инфильтрирующие опухоль Т-клетки при обработке CpG в системе *ex vivo* не активируются. Также при деплеции из опухоли макрофагов и ДК, т.е. мажорных популяций миелоидных клеток, инфильтрирующих опухоль, остав-

шиеся Т-клетки не способны индуцировать иммунный ответ после введения CpG. Этот факт является первым принципиальным моментом в оценке развития противоопухолевого иммунитета и означает, что именно миелоидные клетки, инфильтрирующие опухоль, получив активирующий CpG сигнал (через TLR-9), определяют развитие иммунного ответа, в том числе через активацию обеих популяций Т-клеток. Оказалось, что эффект иммунизации связан с секрецией миелоидными клетками цитокинов IL-12, IFN- γ , TNF- α , но не IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF.

MDSC представляют собой группу костномозговых предшественников на различных стадиях дифференцировки, а также зрелые макрофаги, ДК, нейтрофилы, тучные клетки. Опухоль за счет секреции IL-10, GM-CSF, VEGF, TGF β , а также за счет клеточных контактов формирует протуморогенный фенотип у всех миелоидных клеток, инфильтрирующих опухоль. Иммунологическая толерантность достигается вследствие анергии Т-лимфоцитов и дисрегуляции их пролиферации, редукции антигенпрезентирующего потенциала ДК и стимуляции экспрессии PD1L на ДК, что приводит к лизису Т-лимфоцитов и ингибированию последующего Т-клеточного иммунитета (Kottschade et al., 2016; Sgambato et al., 2016). Ассоциированные с опухолью макрофаги приобретают M2 фенотип, продуцируют большое количество IL-10, при этом репрессируется продукция IL-12 (активатора ДК). Также происходят изменения в метаболизме NO синтазы и аргиназы, что приводит к увеличению токсичности макрофагов по отношению к Т-лимфоцитам и усилению пролиферации опухолевых клеток (Lewis, Pollard, 2006; Martinez et al., 2009; Medina-Echeverz et al., 2014). Сказанное выше означает, что инфильтрирующие опухоль ДК и макрофаги, основные антигенпрезентирующие клетки,

не способны выполнять свои профессиональные функции. Тем не менее известно, что в другой противоопухолевой терапии с использованием антител против IL-10R и CpG, при проведении которой также показана полная эрадикация опухоли и отдаленных метастаз, происходит смена поляризации макрофагов с M2 на M1 фенотип (Vicari et al., 2002; Guiducci et al., 2005; Krutzik, Nolan, 2006). Это важнейшее наблюдение свидетельствует о том, что обработки с использованием антител к рецепторам факторов, определяющих развитие иммунного ответа, на фоне введения CpG в состоянии снять иммунологическую толерантность как минимум с популяции макрофагов, инфильтрирующих опухоль.

Помимо активации миелоидных клеток, инфильтрирующих опухоль, при введении CpG индуцируется экспрессия рецептора OX40 на различных клетках и в первую очередь на Т-лимфоцитах, что, по-видимому, является вторым принципиальным моментом в развитии противоопухолевого иммунитета. А введение антител к OX40 служит вторым шагом в укреплении первых иммунных реакций, развитии иммунитета и осуществлении лизиса опухоли в очаге *in situ* вакцинации и дистальных опухолевых очагах. В цитируемой работе (Sagiv-Barfi et al., 2018) установлено, что введение CpG индуцирует экспрессию OX40 на Т-регуляторных (Treg) и Т-эффекторных (Teff) лимфоцитах. Появление OX40 на Treg ингибирует их активность, а появление на Teff, наоборот, усиливает активность этих клеток. Это еще одно указание на то, что при названных обработках происходит смена поляризации клеток, инфильтрирующих опухоль, с протуморогенных на опухоль-реактивные.

Третий принципиальный момент в развитии иммунитета в структуре терапии работы (Sagiv-Barfi et al., 2018) – необходимость

участия в «завязке» и продолжении иммунных реакций Fc-фрагмента антител.

В работе не приводятся данные об экспрессии OX40 рецептора на других типах клеток и в особенности на клетках, от активности которых зависит появление первой волны раковых антигенов, что служит первоосновой адаптивного иммунитета. В этой связи мы провели анализ возможности активации и проявления литических свойств по отношению к клеткам опухоли у иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, не описанных в цитируемой работе, на поверхности которых, согласно литературным данным, присутствуют рецепторы OX40. Мы предполагаем, что при проведенной терапии могли возникнуть не описанные в работе взаимодействия, связанные с введением антител к OX40 в очаг опухоли, которые послужили дополнительным или равнозначным стимулом(ами) для развития противоопухолевого иммунитета в результате специфического лигирования.

СрG. Вектор активации.

Краткий анализ последствий

При инъекции фактора СрG происходит активация АПК и в первую очередь ДК. СрG (Krieg, 2003), а также TNF- α (Brunner et al., 2000), препарат «Панаген» (геномная фрагментированная ДНК человека) (Alyamkina et al., 2010, 2012), липополисахарид (Leifer, Medvedev, 2016) активируют ДК, используя различные механизмы активации. СрG при взаимодействии с TLR9 ДК индуцирует активацию их антигенпрезентирующих свойств. После взаимодействия ДК с указанным фактором происходит быстрое увеличение синтеза многочисленных молекул, участвующих в развитии и поддержании иммунного ответа, таких как МНСII, МНСI, CD80, CD86, CD137L, OX40L, CD1d, TNF- α , IFN- α/β , IL-12, IL-18. Появление этих факторов на мембране

ДК и/или секреция синтезирующихся цитокинов приводят к расширению спектра участников, распространяющих первичный сигнал, активирующий иммунный ответ (Redmond, Weinberg, 2007; Croft, 2010; Metelitsa, 2011). Возникает сообщество активированных иммунных клеток, экспрессирующих палитру специфических молекул, способствующих индукции другого вектора иммунного ответа, связанного с инъекциями антител к рецептору OX40.

Можно привести несколько примеров передачи первичного активирующего сигнала, полученного ДК, другим типам иммунных клеток. Так, активация ДК СрG стимулирует синтез МНСII, что сопровождается повышением эффективности захвата антигена, его процессинга и презентации Т-лимфоцитам. Достаточность TCR-МНСII сигнала активированных ДК стимулирует экспрессию OX40 рецептора на Teff. В то же время экспрессия OX40 на Treg ингибируется, причем пропорция Teff/Treg в сайте обработки меняется в сторону увеличения Teff (Sagiv-Barfi et al., 2018). Такое соотношение клеток и разница в уровне экспрессии OX40 являются факторами, от которых зависит индукция системного иммунного ответа (Sagiv-Barfi et al., 2018). По-видимому, именно ДК различной степени зрелости, инфильтрирующие опухоль и составляющие часть популяции MDSC, определяют стимуляцию экспрессии OX40 на различных типах клеток в экспериментах, связанных с активацией опухоль-ассоциированных миелоидных клеток. Предполагается, что такая стимуляция определяется секретацией активированными клетками IL-12, TNF- α и IFN- γ (Zaini et al., 2007; Jensen et al., 2010; Sagiv-Barfi et al., 2018).

Через синергичное взаимодействие CD80 и CD86 ДК с кофакторной молекулой CD28 на наивных Т-клетках происходит актива-

ция последних. Это приводит к увеличению Т-клеточной клональной экспансии, синтезу антиапоптотических молекул (Bcl-xL), продукции ими IL-2.

Взаимодействие других лигандов, экспрессирующихся на ДК, активированных обработкой CpG, с соответствующими кофакторными молекулами, экспрессирующимися на Т-клетках, такими как негативный регулятор активации Т-клеток CTLA-4, несколько членов TNF- α семейства: 4-1BB, CD27, CD40, а также OX40, приводит к оптимизации дифференцировки CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и высокой степени их выживаемости (Redmond, Weinberg, 2007). Так, например, CD137L, член TNF- α семейства белков, экспрессируется активированными АПК. Взаимодействие 1-4BB Т-клеток и его естественного лиганда CD137L на ДК является костимуляторным сигналом для полной активации CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Показано, что активированные таким образом Т-клетки обладают выраженной противоопухолевой цитотоксичностью (Zhang et al., 2007).

Фактор CD1d экспрессируется на ДК вследствие их CpG/TLR-зависимой активации. CD1d относится к МНС классу I и способен представлять эндогенные и экзогенные гликолипиды. Именно этот лиганд ответствен за один из путей активации NKT. Показано, что комплекс синтетического аналога эндогенных гликолипидов α -галактозилцерамида и CD1d в синергизме с кофакторным взаимодействием OX40L ДК и OX40 рецептора NKT активирует NKT к синтезу и секреции IFN- γ (Zaini et al., 2007; Metelitsa, 2011).

Взаимодействие OX40L и OX40 рецептора, экспрессирующихся на различных иммунных клетках, регулирует интегральный иммунный ответ совокупной клеточной системы. Причем каждая из таких лиганд/рецептор пар является частью этой регуляции.

Так, например, индукция экспрессии OX40L на ДК и его взаимодействие с OX40 на NKT и CD4⁺ Т-лимфоцитах – критичные и необходимые факторы для развития противоопухолевого ответа, связанного с активностью этих популяций клеток. Отсутствие OX40L на ДК полностью отменяет противоопухолевое действие CD8⁺ Т-лимфоцитов, т.е. нарушается антиген-специфический клеточный иммунный ответ. Основным элементом такого нарушения, как следует из результатов экспериментов, выступает нарушение взаимодействия OX40L ДК и OX40 рецептора на CD4⁺ Т-клетках и взаимодействия OX40L и OX40 рецептора на NKT (Redmond, Weinberg, 2007; Croft, 2010; Jensen et al., 2010; Murphy et al., 2014).

Таким образом, в результате инъекций CpG в начале цепи событий происходит следующее. Антигенпрезентирующие ДК активируются и: 1) становятся готовыми принять раковый антиген; 2) активируют NKT, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты; 3) осуществляют прямой лизис раковых клеток; 4) стимулируют или секретируют сами IFN- γ , IL-12, TNF- α , IFN- α/β , IL-18 и создают таким образом условия для активации клеток адаптивного иммунитета. Именно ДК – фактор, объединяющий все звенья иммунного ответа.

Антитела к OX40. Вектор активации.

Краткий анализ последствий

В анализируемой терапии (Sagiv-Barfi et al., 2018) участвуют антитела к OX40, инъеклируемые в избыточном количестве в очаг опухолевого роста. Суть такой массивной атаки избытком антител может состоять в создании «эффекта неизбежности и безоговорочности» взаимодействия с рецепторами на всех типах клеток, игнорируя любые функциональные ограничения такого взаимодействия при естественном ходе волны иммунного ответа.

Антитела представляют собой молекулу с двумя функциональными доменами: антиген-связывающий домен и Fc-фрагмент. Оба элемента молекулы антител несут функциональную нагрузку в системе противоопухолевого ответа. Этот факт требует анализа функции обоих участников терапевтического маневра. В анализе будет сделан акцент на клетки, несущие на своей мембране специфические для OX40 антител рецепторы OX40 и Fc-рецепторы.

Рецептор OX40 экспрессируется на цитоплазматической мембране CD4+, CD8+, Treg и лимфоцитах памяти. Формирование комплекса TCR/CD3, костимуляция через CD28, действие IL-2, IL-1, и TNF- α являются факторами активации, стимулирующими экспрессию OX40 на Treg и Teff. То есть в случае рассматриваемой терапии только после первичной активации ДК инъекциями CpG, развитием гуморальной реакции и контакта экспрессирующихся на поверхности ДК кофакторных молекул с их агонистами на Т-клетках возможна последующая полная активация функций Teff. Наивные Т-клетки не экспрессируют рецептор OX40. Только при взаимодействии с лигандом эти клетки активируют свои иммунные свойства. Время активации для Teff, согласно различным источникам, варьирует от 12 ч до 5 сут. Время такой активации для Т-клеток памяти составляет 1-4 ч.

Главным эффектом взаимодействия с лигандом (антителами к OX40 или OX40L, экспрессирующимися на различных иммунных клетках) считается индукция пролиферации Teff, несущих OX40, и длительное сохранение их жизнеспособности и функциональной активности, необходимые для дальнейшей клональной экспансии. При этом, как было сказано выше, экспрессия OX40 на Treg ингибирует их пролиферативную и функциональную активность. Нужно отметить, что

формирование и функциональная активность CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов связаны в первую очередь с взаимодействием OX40 на CD8+ Т-клетках и OX40L на ДК. Одно из проявлений такого взаимодействия – индукция экспрессии CXCR5 рецептора на CD4+ Т-клетках, определяющая миграцию Т-лимфоцитов в сайт обработки (Redmond, Weinberg, 2007; Croft, 2010; Sagiv-Barfi et al., 2018).

OX40-рецептор экспрессируют активированные инвариантные NKT. Взаимодействие NKT с ДК сопровождается усиленной OX40/OX40L зависимой продукцией IFN- γ этими клетками. Продукция IFN- γ приводит к активации NK-клеток, CD8+ Т-лимфоцитов и макрофагов. При этом ДК также могут секретировать IFN- γ при реверсивной активации. Немедленно после первичного активирующего сигнала NKT экспрессируют CD137 кофакторную молекулу, необходимую для полной активации клеток и секреции цитокинов. Контроль продукции IFN- γ NKT определяется достаточностью и силой TCR/CD1d сигнала, который, в свою очередь, зависит от эффективности представления гликолипидного эндогенного антигена в комплексе CD1d активированными макрофагами, ДК и В-лимфоцитами.

Макрофаги и MDSC, инфильтрирующие опухоль, участвуют в организации опухоль-ассоциированной стромы на протяжении всех этапов развития опухоли. Опухоль-ассоциированные макрофаги стимулируют рост опухоли за счет секреции различных растворимых факторов: TNF, TGF β , IL-1, MMP-9, VEGF, PDGF. Супрессия иммунных клеток происходит за счет секреции макрофагами IL-10 и синтеза MDSC синтазы оксида азота и аргиназы 1. Продукция и секреция оксида азота ведет к лизису Т-клеток, а аргиназа 1 конвертирует аргинин в путресцин

и L-орнитин, которые являются субстратом для роста раковых клеток и ингибирования пролиферации T-лимфоцитов. Взаимодействие активированных NKT и MDSC через CD40 лигирование приводит к редукции синтеза обоих ферментов и одновременному увеличению секреции IL-12, что снижает супрессивное влияние опухоль-ассоциированной стромы на иммунные клетки. Взаимодействие NKT с комплексом CD1d/гликолипид M2 макрофагов и MDSC, инфильтрирующих опухоль, сопровождается лизисом последних, опосредованным прямой цитотоксичностью NKT (Lewis, Pollard, 2006; Medina-Echeverez et al., 2014). И, значит, NKT опосредованно, через уменьшение числа опухоль-ассоциированных макрофагов и MDSC, могут воздействовать на опухоль, что может представлять еще один механизм противоопухолевой активности NKT (Zaini et al., 2007; Акинфиева и др., 2010; Croft, 2010; Metelitsa, 2011). В дополнение к сказанному известно, что многие опухоли несут на своей поверхности CD1d и могут быть прямой мишенью для цитотоксического действия NKT (Metelitsa, 2011).

OX40-рецептор экспрессируют находящиеся в опухолевом очаге, активированные множеством кофакторов NK-клетки. Также на этих клетках экспрессируется OX40L. Как и в случае с NKT, взаимодействие активированных NK-клеток с ДК через OX40/OX40L лигирование приводит к усиленной продукции IFN- γ натуральными киллерами. При этом описано реверсивное взаимодействие OX40L NK-клетка/OX40 ДК. Антитела к OX40 являются дополнительным фактором активации NK-клеток. Наиболее важные функции активированных NK-клеток – их неспецифическая цитолитическая активность, осуществляемая в отсутствие молекул MHC I на клетках-мишенях независимо от антител и комплемента, и секреция хемокинов и цито-

кинов, играющих важную роль в регуляции иммунного ответа.

NK-клетки, как и макрофаги, нейтрофилы и тучные клетки, несут Fc-рецепторы, через которые также происходит активация клетки при связывании с Fc-фрагментами антител. Возможно, что для полной активации цитолитической активности натуральных киллеров необходимо взаимодействие антител к OX40 и с OX40, и с Fc-рецептором одновременно на одной NK-клетке. Участие NK-клеток в лизисе раковых клеток может определяться ADCC-механизмом. Клетки опухоли в результате функционального взаимодействия растущей опухоли и организма покрыты антителами к поверхностным антигенам. Это позволяет NK-клеткам не специфически, через образование комплекса Fc-рецептора NK-клеток с Fc-фрагментом антител, атаковать трансформированные клетки (Croft, 2010; Абакушина и др., 2012; Murphy et al., 2014).

Treg также экспрессируют OX40-рецептор. При этом взаимодействие с лигандом (антителами к OX40) ингибирует супрессивную функцию Treg (Jensen et al., 2010; Weinberg et al., 2011; Murphy et al., 2014; Sagiv-Barfi et al., 2018).

Лигирование OX40 и/или Fc-рецепторов, экспрессирующихся нейтрофилами, с антителами к OX40 способствует повышению выживаемости нейтрофилов, связанной с редукцией экспрессии молекулярных проапоптотических факторов. Этот тип клеток, как и NK-клетки, обладает свойством лизировать клетки, покрытые антителами, через механизм ADCC. Этот факт предполагает возможность участия активированных нейтрофилов в разрушении клеток опухоли (Акинфиева и др., 2010; Brandau, 2013; Murphy et al., 2014).

Таким образом, OX40-антитела продолжают и поддерживают волну активации, на-

чатку активированными ДК, и участвуют в запуске процесса киллинга раковых клеток через эффекторы: NK-клетки, NKT, возможно через реполяризованные макрофаги и нейтрофилы и механизмы: ADCC, перфорин/гранзим-ассоциированный лизис, лизис вследствие активации апоптоза FasL/Fas или иным, активирующим апоптотические пути взаимодействием.

После инъекций CpG и антител к OX40 совместно с активацией АПК и индукцией начальных этапов иммунного ответа, одним из которых служит появление, поглощение, процессинг и презентация антигена, активируются и праймируются CD8⁺ Т-эффекторы. Специфический антигенный ответ CD8⁺ Т-лимфоциты могут сформировать только после взаимодействия TCR и антигена, представленного МНСII, в синергичном взаимодействии с кофакторными молекулами.

Взаимодействие наивных Т-лимфоцитов с соответствующей по специфичности антигенной детерминантой и костимулятором В7, представленными на поверхности АПК, инициирует полноценный синтез и секрецию IL-2, который аутокринным способом стимулирует наивные Т-клетки к пролиферации и дифференцировке. Завершившие дифференцировку Т-лимфоциты характеризуются усилением экспрессии на своей поверхности молекул LFA-1 и CD2, которые обеспечивают их более эффективное взаимодействие с адгезивными молекулами ICAM и LFA-3, обильно представленными на поверхности макрофагов, что необходимо для праймирования эффекторных клеток. В рамках проводимого анализа важен тот факт, что интегрины ICAM также обильно представлены на опухолевых клетках. Специфическое антиген-зависимое взаимодействие цитотоксических Т-лимфоцитов с опухолевыми клетками усиливается через дополнительное взаимо-

действие LFA-1, CD2 и ICAM и служит условием проявления цитолитической активности эффекторами.

Заключение

Процессинг и презентация *in situ* активированными ДК исчерпывающего репертуара индивидуальных раковых антигенов множеству индивидуальных Т-лимфоцитов означают, что именно в опухолевом очаге формируется предельно возможное разнообразие Т-клеток с уникальной антигенной специфичностью. Миграция активированных Teff в периферическое русло и закрепление в паренхиме селезенки, формирование в селезенке герминативных центров, пролиферация Т-киллерных перфорин⁺, гранзим⁺ клонов и их распространение по организму составляют основу системного адаптивного иммунного ответа. Вследствие такого продолжения *in situ* вакцинации происходит генерализация иммунного ответа и лизис дистальных очагов опухоли.

Ниже приведена табл. 1, демонстрирующая типы клеток, на которых могут экспрессироваться OX40, его лиганд и Fc-рецептор в результате применения описываемого терапевтического подхода с использованием OX40 антител и CpG олигонуклеотидов.

Опухолевый очаг инфильтрируют антигенпрезентирующие ДК, опухоль-ассоциированные макрофаги, MDSC, NK-клетки, NKT, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты, Treg, проопухолевые гранулярные нейтрофилы, находящиеся в супрессированном состоянии вследствие гуморальной регуляции опухолевыми клетками. Проведенный анализ свидетельствует, что главным действующим стимулом при завязке иммунного ответа в очаге опухоли является экспериментально доказанное снятие инъекциями CpG иммунологической толерантности у клеток, инфильтрирующих опухоль, а

Таблица 1. Типы клеток, на которых могут экспрессироваться OX40, его лиганд и Fc-рецептор в результате применения терапевтического подхода (Sagiv-Barfi et al., 2018)

Table 1. Types of cells that can express OX40, its ligand, and Fc-receptor in response to therapeutic application (Sagiv-Barfi et al., 2018)

Фактор/тип клеток	OX40	OX40L	Fc-рецептор
ДК		+	
Treg	+		
CD8+ Т-лимфоциты	+		
CD4+ Т-лимфоциты	+		
НК-клетки	+	+	+
NKT	+	+	
Макрофаги			+
Нейтрофилы	+		+

именно супрессированных ДК, Т-лимфоцитов, макрофагов и MDSC. Совокупный анализ литературных данных в контексте работы (Sagiv-Barfi et al., 2018) свидетельствует о том, что совместные инъекции двух активаторов приводят к тому, что CpG активирует ДК, а антитела к OX40 являются дополнительным фактором активации НК-клеток. Натуральные киллеры немедленно приступают к лизису раковых клеток или через негативные регуляторы MHC I, или через систему стресс-индуцированных и адгезивных молекул, или через Fc-рецептор опосредованный механизм. Одновременно ДК гуморально активируют Т-хелперы 1-го типа, которые в свою очередь активируют макрофаги. Сменившие поляризацию активированные M1 макрофаги включают весь свой литический арсенал: NO, ROS, ADCC, FasL, что суммируется в усилении первоначального разрушения клеток опухоли, индуцированного НК-клетками. В процессе лизиса трансформированных клеток могут принимать участие и другие популяции инфильтрирующих опухоль клеток. Это и ДК, и опухоль-реактивные нейтрофилы, и NKT.

Гуморальный интегральный ответ можно описать следующими общими чертами.

Активированные ДК начинают продукцию и секрецию IL-12, который стимулирует продукцию IFN- γ и IL-2. Происходит активация Т-лимфоцитов, которые активируют макрофаги. Активированные макрофаги секретуют TNF- α , а при активном фагоцитозе индуцируется секреция IL-12, IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , CSF. НК-клетки, Т-лимфоциты и NKT в результате активации секретуют IFN- γ . IFN- γ стимулирует созревание ДК, активирует макрофаги и CD8+ Т-лимфоциты. Формируется петля активации, характеризующаяся необратимостью развития иммунного ответа. Происходит активация адаптивного звена иммунитета, что необходимо для развития системного противоопухолевого иммунного ответа (5-9 сут).

Таким образом, если в локальном месте, таком как, например, первичный опухолевый очаг, одновременно присутствуют активированные ДК, макрофаги, НК-клетки, NKT, Т-хелперы 1-го типа, нейтрофилы, то может развиваться интегрированный, самоподдерживающийся цитокиновым сопровождением, иммунный ответ, обусловленный клетками врожденного иммунитета. Результатом такого ответа будет первая волна опухоль-ас-

социированных антигенов. Это приведет к вета и формированию акселеративной петли активации адаптивного звена иммунного от- активации клеток врожденного иммунитета.

Благодарности / Acknowledgements

Данная работа была выполнена при поддержке бюджетного проекта в рамках государственного задания № 0324-2019-0042-С-01 (рег. № АААА-А17-117071240065-4) и проекта РФФИ № 18-29-09045.

The research was supported by the budget project as part of the state assignment No. 0324-2019-0042-С-01 (Reg. No. АААА-А17-117071240065-4) and RFBR project No. 18-29-09045.

Список литературы / References

Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. (2012) Основные свойства и функции НК-клеток человека. *Иммунология*, 33(4): 220–225 [Abakushina E.V., Kuzmina E.G., Kovalenko E.I. (2012) The main characteristics of human natural killer cells. *Immunology* [Immunologiya], 33(4): 220–225 (in Russian)]

Акинфиева О.В., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С. (2010) NKT-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа. *Онкогематология*, 5(4): 39–47 [Akinfieva O.V., Bubnova L.N., Bessmeltsev S.S. (2010) NKT cells: characteristic features and functional significance in the immune response regulation. *Oncohematology* [Onkogematologiya], 5(4): 39–47 (in Russian)]

Бережной А.Е., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Козлов А.М., Ларин С.С. (2008) Молекулярные механизмы взаимодействия опухоли и иммунной системы. *Вопросы онкологии*, 54(6): 669–683 [Berezhnoy A.E., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Kozlov A.M., Larin S.S. (2008) Molecular mechanisms of interaction between tumor and immune system. *Oncology Issues* [Voprosy onkologii], 54(6): 669–683 (in Russian)]

Дунаев П.Д., Бойчук С.В., Мустафин И.Г. (2012) Свойства и роль фактора некроза опухолей альфа в патогенезе ВИЧ-инфекции. *Казанский медицинский журнал*, 93(2): 290–293 [Dunaev P.D., Boychuk S.V., Mustafin I.G. (2012) The properties and role of tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of HIV infection. *Kazan Medical Journal* [Kazanski medicinski zhurnal], 93(2): 290–293 (in Russian)]

Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Шкурупий В.А. (2007) Механизмы активации макрофагов. *Успехи современной биологии*, 127(3): 243–256 [Zenkov N.K., Men'shchikova E.B., Shkurupii V.A. (2007) Mechanisms of macrophage activation. *Successes of Modern Biology* [Uspekhi sovremennoy biologii], 127(3): 243–256 (in Russian)]

Кадагидзе З.Г. (2003) Цитокины. *Практическая онкология*, 4(3): 131–139 [Kadagidze Z.G. (2003) Cytokines. *Practical Oncology* [Prakticheskaya onkologiya], 4(3): 131–139 (in Russian)]

Ключагина Ю.И., Соколова З.А., Барышникова М.А. (2017) Роль рецептора PD1 и его лигандов PDL1 и PDL2 в иммунотерапии опухолей. *Онкопедиатрия*, 4(1): 49–55 [Klyuchagina Yu.I., Sokolova Z.A., Baryshnikova M.A. (2017) Role of PD-1 receptor and its ligands PD-L1 and PD-L2 in cancer immunotherapy. *Oncopediatrics* [Onkopediatriya], 4(1): 49–55 (in Russian)]

Кулаков В.В., Киселевский М.В., Полоцкий Б.Е., Пинегин Б.В. (1999) Изучение цитостатической и цитотоксической активности нейтрофилов периферической крови нормальных доно-

ров и больных раком легких. *Вестник РОНЦ Им. Н.Н. Блохина РАМН*, 10(2): 26–31 [Kulakov V.V., Kiselevsky M.V., Polotsky B.E., Pinegin B.V. (1999) Study of cytostatic and cytotoxic activity of peripheral neutrophils from normal donors and lung cancer patients. *Bulletin of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology* [Vestnik RONC Im. N.N. Blokhina RAMN], 26-31 (in Russian)]

Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейерер М., Лобзин Ю.В. (2015) Интерферон- γ : биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа. *Журнал инфектологии*, 7(4): 10–22 [Lutckii A.A., Zhirkov A.A., Lobzin D.Yu., Rao M., Alekseeva L.A., Maeurer M., Lobzin Yu.V. (2015) Interferon- γ : biological function and application for study of cellular immune response. *Journal Infectology* [Zhurnal infektologii], 7(4): 10–22 (in Russian)]

Лисяный Н.И., Лисяный А.А. (2018) Нейтрофилы и онкогенез. *Клиническая онкология*, 8(1): 40–45 [Lisyaniy M.I., Lisyaniy A.O. (2018) Neutrophils and oncogenesis. *Clinical Oncology* [Klinicheskaya onkologiya], 8(1): 40-45 (in Russian)]

Майборода А.А. (2013) Апоптоз – гены и белки. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*, 118(3): 130–135 [Majboroda A.A. (2013) Apoptosis – genes and proteins. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)* [Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)], 28(3): 130–135 (in Russian)]

Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. (2009) Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли. *Цитология*, 51(6): 467–474 [Maltseva V.N., Safronova V.G. (2009) Ambiguity role of neutrophils in oncogenesis. *Cytology* [Tsitologiya], 51(6): 467–474 (in Russian)]

Манских В.Н. (2007) Пути гибели клетки и их биологическое значение. *Цитология*, 49(11): 909–915 [Manskikh V.N. (2007) Pathways of cell death and their biological importance. *Cytology* [Tsitologiya], 49(11): 909–915 (in Russian)]

Мисюрин В.А. (2015) Структура и свойства основных рецепторов и лигандов внешнего пути апоптоза. *Российский биотерапевтический журнал*, 14(2): 23–30 [Misyurin V.A. (2015) Structure and functions of main apoptosis receptors and ligands. *Russian Journal of Biotherapy* [Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal], 14(2): 23–30 (in Russian)]

Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. (2008) М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии. *Патогенез*, 6(4): 31–39 [Monastyrskaya E.A., Lyamina S.V., Malyshev I.Yu. (2008) M1 and M2 phenotypes of activated macrophages and their role in immune response and pathology. *Pathogenesis* [Patogenez], 6(4): 31–39 (in Russian)]

Никонова А.А., Хайтов М.Р., Хайтов Р.М. (2017) Характеристика и роль различных популяций макрофагов в патогенезе острых и хронических заболеваний легких. *Медицинская иммунология*, 19(6): 657–672 [Nikonova A.A., Khaitov M.R., Khaitov R.M. (2017) Characteristics and role of macrophages in pathogenesis of acute and chronic lung diseases. *Medical Immunology* [Meditsinskaya immunologiya], 19(6): 657–672 (in Russian)]

Останин А.А., Кирикович С.С., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Черных Е.Р., Богачев С.С. (2019) Тернистый путь макрофаг-активирующего фактора (GcMAF): от открытия к клинической практике. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 23(5): 624–631 [Ostanin A.A., Kirikovich S.S., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Chernykh E.R., Bogachev S.S. (2019) A thorny pathway of macrophage activating factor (GcMAF): from bench to bedside. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* [Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii], 23(5): 624-631 (in Russian)]

Саяпина М.С. (2017) Иммунорегуляторные функции ингибиторов PD-1/PD-L1 и развитие к ним резистентности. *Злокачественные опухоли*, 7(2): 94–99 [Sayapina M.S. (2017) Immunoregulatory functions of PD-1 / PD-L1 inhibitors and development of resistance to them. *Malignant Tumors* [Zlokachestvennyye opukholi], 7(2): 94–99 (in Russian)]

Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж. (2008) Роль цитокинов в воспалительном процессе (сообщение 2). *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*, 83(8): 5–8 [Serebrennikova S., Seminsky I. (2008) The role of cytokines in the inflammatory process (part 2). *Siberian Medical Journal (Irkutsk)* [Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)], 83(8): 5–8 (in Russian)]

Талаев В.Ю., Плеханова М.В. (2014) Исследование миграции дендритных клеток и трафика антигенов в целях совершенствования средств иммунопрофилактики. *Медиаль*, 2: 154–171 [Talayev V.Yu., Plechanova M.V. (2014) Investigation of the dendritic cell migration and the antigen traffic for perfecting of immunoprophylaxis agents. *Medial* [Medial’], 2: 154–171 (in Russian)]

Уткин О.В., Новиков В.В. (2012) Рецепторы смерти в модуляции апоптоза. *Успехи современной биологии*, 132(4): 381–390 [Utkin O.V., Novikov V.V. (2012) Death receptors in modulation of apoptosis. *Successes of Modern Biology* [Uspekhi sovremennoy biologii], 132(4): 381–390 (in Russian)]

Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В., Кжышковска Ю.Г. (2017) Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии. *Бюллетень сибирской медицины*, 16(4): 61–74 [Cherdyntseva N.V., Mitrofanova I.V., Buldakov M.A., Stakheeva M.N., Patysheva M.R., Zavjalova M.V., Kzhyshkowska J.G. (2017) Macrophages and tumor progression: on the way to macrophage-specific therapy. *Bulletin of Siberian Medicine* [Byulleten’ sibirskoi meditsiny], 16(4): 61–74 (in Russian)]

Aggarwal B.B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 3(9): 745–756

Akira S. (2000) The role of IL-18 in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 12(1): 59–63

Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. (2010) Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro. *Cellular Immunology*, 266(1): 46–51

Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Bogachev S.S., Shurdov M.A. (2012) Effects of human exogenous DNA on production of perforin-containing CD8⁺ cytotoxic lymphocytes in laboratory setting and clinical practice. *Cellular Immunology*, 276(1-2): 59–66

Atrekhany K.-S.N., Drutskaya M.S. (2016) Myeloid-derived suppressor cells and proinflammatory cytokines as targets for cancer therapy. *Biochemistry-Moscow*, 81(11): 1274–1283

Aznar M.A., Tinari N., Rullán A.J., Sánchez-Paulete A.R., Rodriguez-Ruiz M.E., Melero I. (2017) Intratumoral delivery of immunotherapy – act locally, think globally. *Journal of Immunology*, 198(1): 31–39

Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428): 727–729

- Behar S.M., Cardell S. (2000) Diverse CD1d-restricted T cells: diverse phenotypes, and diverse functions. *Seminars in Immunology*, 12(6): 551–560
- Bendelac A., Savage P.B., Teyton L. (2007) The biology of NKT cells. *Annual Review of Immunology*, 25: 297–336
- Biassoni R. (2009) Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. *Current Protocols in Immunology*, 84(1): 14.10.1-14.10.40
- Biassoni R., Cantoni C., Marras D., Giron-Michel J., Falco M., Moretta L., Dimasi N. (2003) Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7(4): 376–387
- Billiau A., Matthys P. (2009) Interferon- γ : A historical perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(2): 97–113
- Bilusic M., Gulley J.L. (2017) Local immunotherapy: a way to convert tumors from “cold” to “hot”. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109(12): djx132
- Bjorkstrom N.K., Riese P., Heuts F., Andersson S., Fauriat C., Ivarsson M.A., Björklund A.T., Flodström-Tullberg M., Michaëlsson J., Rottenberg M.E., Guzmán C.A., Ljunggren H.G., Malmberg K.-J. (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*, 116(19): 3853–3864
- Bottino C., Castriconi R., Moretta L., Moretta A. (2005) Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends in Immunology*, 26(4): 221–226
- Boyman O., Sprent J. (2012) The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12(3): 180–190
- Brandau S. (2013) The dichotomy of neutrophil granulocytes in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 23(3): 139–140
- Brunner C., Seiderer J., Schlamp A., Bidlingmaier M., Eigler A., Haimerl W., Lehr H.A., Krieg A.M., Hartmann G., Endres S. (2000) Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *Journal of Immunology*, 165(11): 6278–6286
- Bryceson Y.T., Pende D., Maul-Pavicic A., Gilmour K.C., Ufheil H., Vraetz T., Chiang S.C., Marcenaro S., Meazza R., Bondzio I., Walshe D., Janka G., Lehmborg K., Beutel K., zur Stadt U., Binder N., Arico M., Moretta L., Henter J.I., Ehl S. (2012) A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood*, 119(12): 2754–2763
- Buelens C., Verhasselt V., De Groote D., Thielemans K., Goldman M., Willems F. (1997) Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *European Journal of Immunology*, 27(8): 1848–1852
- Caligiuri M.A. (2008) Human natural killer cells. *Blood*, 112(3), 461–469
- Chakrabandhu K., Huault S., Garmy N., Fantini J., Stebe E., Mailfert S., Marguet D., Hueber A.-O. (2008) The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand. *Cell Death & Differentiation*, 15(12): 1824–1837
- Chung B., Aoukaty A., Dutz J., Terhorst C., Tan R. (2005) Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *Journal of Immunology*, 174(6): 3153–3157
- Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22(11): 633–640

Corzo C.A., Condamine T., Lu L., Cotter M.J., Youn J.-I., Cheng P., Cho H.I., Celis E., Quiceno D.G., Padhya T., McCaffrey T.V., McCaffrey J.C., Gabrilovich D.I. (2010) HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Journal of Experimental Medicine*, 207(11): 2439–2453

Croft M. (2010) Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annual Review of Immunology*, 28: 57–78

Dajon M., Iribarren K., Cremer I. (2017) Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology*, 222(1): 89–100

Dallegri F., Ottonello L., Ballestrero A., Dapino P., Ferrando F., Patrone F., Sacchetti C. (1991) Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation*, 15(1): 15–30

De Larco J.E., Wuertz B.R.K., Furcht L.T. (2004) The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clinical Cancer Research*, 10(15): 4895–4900

Del Vecchio M., Bajetta E., Canova S., Lotze M.T., Wesa A., Parmiani G., Anichini A. (2007) Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clinical Cancer Research*, 13(16): 4677–4685

Dennehy K.M., Klimosch S.N., Steinle A. (2011) Cutting edge: Nkp80 uses an atypical hemi-ITAM to trigger NK cytotoxicity. *Journal of Immunology*, 186(2): 657–661

Di Carlo E., Forni G., Lollini P., Colombo M.P., Modesti A., Musiani P. (2001) The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood*, 97(2): 339–345

Diamond M.S., Staunton D.E., Marlin S.D., Springer T.A. (1991) Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*, 65(6): 961–971

Dollins C.M., Nair S., Boczkowski D., Lee J., Layzer J.M., Gilboa E., Sullenger B.A. (2008) Assembling OX40 aptamers on a molecular scaffold to create a receptor-activating aptamer. *Chemistry & Biology*, 15(7): 675–682

Dong H., Strome S.E., Salomao D.R., Tamura H., Hirano F., Flies D.B., Roche P.C., Lu J., Zhu G., Tamada K., Lennon V.A., Celis E., Chen L. (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 8(8): 793–800

East J.E., Kennedy A.J., Webb T.J. (2014) Raising the roof: the preferential pharmacological stimulation of Th1 and Th2 responses mediated by NKT cells. *Medicinal Research Reviews*, 34(1): 45–76

Falschlehner C., Ganten T.M., Koschny R., Schaefer U., Walczak H. (2009) TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. *Therapeutic targets of the TNF superfamily. Advances in experimental medicine and biology. Vol 647*. Grewal I.S. (ed.) Springer, New York, NY, p. 195-206

Fanger N.A., Maliszewski C.R., Schooley K., Griffith T.S. (1999) Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Journal of Experimental Medicine*, 190(8): 1155–1164

Farkona S., Diamandis E.P., Blasutig I.M. (2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine*, 14: 73

Gabrilovich D.I. (2017) Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunology Research*, 5(1): 3–8

Girardi M., Oppenheim D.E., Steele C.R., Lewis J.M., Glusac E., Filler R., Hobby P., Sutton B., Tigelaar R.E., Hayday A.C. (2001) Regulation of cutaneous malignancy by gamma delta T cells. *Science*, 294(5542): 605–609

Godfrey D.I., Kronenberg M. (2004) Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *Journal of Clinical Investigation*, 114(10): 1379–1388

Gómez Román V.R., Murray J.C., Weiner L.M. (2014) Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *Antibody Fc*. Ackerman M.E., Nimmerjahn F. (Eds.) Academic Press, p. 1–27

Greilberger J., Herwig R. (2020) Vitamin D – deglycosylated vitamin D binding protein dimer: positive synergistic effects on recognition, activation, phagocytosis and oxidative stress on macrophages. *Clinical Laboratory*, 66(1-2): 169–177

Groh V., Rhinehart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein K.H., Spies T. (1999) Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12): 6879–6884

Guiducci C., Vicari A.P., Sangaletti S., Trinchieri G., Colombo M.P. (2005) Redirecting *in vivo* elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Research*, 65(8): 3437–3446

Hammerich L., Binder A., Brody J.D. (2015) *In situ* vaccination: Cancer immunotherapy both personalized and off-the-shelf. *Molecular Oncology*, 9(10): 1966–1981

Hammerich L., Bhardwaj N., Kohrt H.E., Brody J.D. (2016) *In situ* vaccination for the treatment of cancer. *Immunotherapy*, 8(3): 315–330

Hamza T., Barnett J.B., Li B. (2010) Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(3): 789–806

Hira S.K., Mondal I., Bhattacharya D., Manna P.P. (2014) Downregulation of endogenous STAT3 augments tumoricidal activity of interleukin 15 activated dendritic cell against lymphoma and leukemia via TRAIL. *Experimental Cell Research*, 327(2): 192–208

Homma S., Yamamoto N. (1990) Activation process of macrophages after *in vitro* treatment of mouse lymphocytes with dodecylglycerol. *Clinical and Experimental Immunology*, 79(2): 307–313

Igney F.H., Behrens C.K., Krammer P.H. (2005) CD95L mediates tumor counterattack *in vitro* but induces neutrophil-independent tumor rejection *in vivo*. *International Journal of Cancer*, 113(1): 78–87

Ito M., Maruyama T., Saito N., Koganei S., Yamamoto K., Matsumoto N. (2006) Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine*, 203(2): 289–295

Jabłońska E., Puzewska W., Marcińczyk M., Grabowska Z., Jabłoński J. (2005) iNOS expression and NO production by neutrophils in cancer patients. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 53(2): 175–179

Jamieson A.M., Diefenbach A., McMahon C.W., Xiong N., Carlyle J.R., Raulet D.H. (2002) The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*, 17(1): 19–29

Jamil K.M., Khakoo S.I. (2011) KIR/HLA interactions and pathogen immunity. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011: 298348

Janjic B.M., Lu G., Pimenov A., Whiteside T.L., Storkus W.J., Vujanovic N.L. (2002) Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *Journal of Immunology*, 168(4): 1823–1830

Janssen O., Qian J., Linkermann A., Kabelitz D. (2003) CD95 ligand – death factor and costimulatory molecule? *Cell Death & Differentiation*, 10(11): 1215–1225

Jensen S.M., Maston L.D., Gough M.J., Ruby C.E., Redmond W.L., Crittenden M., Li Y., Puri S., Poehlein C.H., Morris N., Kovacovics-Bankowski M., Moudgil T., Twitty C., Walker E.B., Hu H.M., Urba W.J., Weinberg A.D., Curti B., Fox B.A. (2010) Signaling through OX40 enhances antitumor immunity. *Seminars in Oncology*, 37(5): 524–532

Klebanoff S.J. (1999) Myeloperoxidase. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111(5): 383–389

Knaapen A.M., Güngör N., Schins R.P.F., Borm P.J.A., Van Schooten F.J. (2006) Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 21(4): 225–236

Kohlhaas S.L., Craxton A., Sun X.-M., Pinkoski M.J., Cohen G.M. (2007) Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17): 12831–12841

Kottschade L., Brys A., Peikert T., Ryder M., Raffals L., Brewer J., Mosca P., Markovic S. (2016) A multidisciplinary approach to toxicity management of modern immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Melanoma Research*, 26(5): 469–480

Kovalenko E.I., Abakushina E., Telford W., Kapoor V., Korchagina E., Khaidukov S., Molotkovskaya I., Sapozhnikov A., Vlaskin P., Bovin N. (2007) Clustered carbohydrates as a target for natural killer cells: a model system. *Histochemistry and Cell Biology*, 127(3): 313–326

Krieg A.M. (2003) CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nature Medicine*, 9(7): 831–835

Krutzik P.O., Nolan G.P. (2006) Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling. *Nature Methods*, 3(5): 361–368

Kumar V., Cheng P., Condamine T., Mony S., Languino L.R., McCaffrey J.C., Hockstein N., Guarino M., Masters G., Penman E., Denstman F., Xu X., Altieri D.C., Du H., Yan C., Gabrilovich D.I. (2016) CD45 phosphatase inhibits STAT3 transcription factor activity in myeloid cells and promotes tumor-associated macrophage differentiation. *Immunity*, 44(2): 303–315

LaCasse C.J., Janikashvili N., Larmonier C.B., Alizadeh D., Hanke N., Kartchner J., Situ E., Centuori S., Har-Noy M., Bonnotte B., Katsanis E., Larmonier N. (2011) Th-1 lymphocytes induce dendritic cell tumor killing activity by an IFN-dependent mechanism. *Journal of Immunology*, 187(12): 6310–6317

Le Dréan E., Vély F., Olcese L., Cambiaggi A., Guia S., Krystal G., Gervois N., Moretta A., Jotereau F., Vivier E. (1998) Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *European Journal of Immunology*, 28(1): 264–276

Le Poole I.C., ElMasri W.M., Denman C.J., Kroll T.M., Bommasamy H., Lyons Eiben G., Kast W.M. (2008) Langerhans cells and dendritic cells are cytotoxic towards HPV16 E6 and E7 expressing target cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57(6): 789–797

Leifer C.A., Medvedev A.E. (2016) Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(5): 927–941

Lewis C.E., Pollard J.W. (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research*, 66(2): 605–612

Li B. (2015) Advances in studies related to interleukin-12 family and infectious diseases. *Infection International*, 4(2): 35–39

Li H., Han Y., Guo Q., Zhang M., Cao X. (2009) Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF- β 1. *Journal of Immunology*, 182(1): 240–249

Lichtenstein A.K., Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R.I. (1988) Synergistic cytotoxicity mediated by hydrogen peroxide combined with peptide defensins. *Cellular Immunology*, 114(1): 104–116

Liu J., Hamrouni A., Wolowicz D., Coiteux V., Kuliczowski K., Hetuin D., Saudemont A., Quesnel B. (2007) Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*, 110(1): 296–304

Ljunggren H.G., Kärre K. (1990) In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, 11(7): 237–244

Long E.O. (2008) Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunological Reviews*, 224(1): 70–84

Lu G., Janjic B.M., Janjic J., Whiteside T.L., Storkus W.J., Vujanovic N.L. (2002) Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin- α (1) beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Journal of Immunology*, 168(4): 1831–1839

Malek T.R. (2008) The biology of interleukin-2. *Annual Review of Immunology*, 26: 453–479

Marabelle A., Tselikas L., de Baere T., Houot R. (2017) Intratumoral immunotherapy: using the tumor as the remedy. *Annals of Oncology*, 28(suppl_12): xii33–xii43

Martinez F.O., Helming L., Gordon S. (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 27: 451–483

Matsui T., Connolly J.E., Michnevitz M., Chaussabel D., Yu C.-I., Glaser C., Tindle S., Pypaert M., Freitas H., Piqueras B., Banchereau J., Palucka A.K. (2009) CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *Journal of Immunology*, 182(11): 6815–6823

Medina-Echeverez J., Aranda F., Berraondo P. (2014) Myeloid-derived cells are key targets of tumor immunotherapy. *OncImmunology*, 3(4): e28398

Melero I., Shuford W.W., Newby S.A., Aruffo A., Ledbetter J.A., Hellström K.E., Mittler R.S., Chen L. (1997) Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nature Medicine*, 3(6): 682–685

Melero I., Bach N., Hellström K.E., Aruffo A., Mittler R.S., Chen L. (1998) Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *European Journal of Immunology*, 28(3): 1116–1121

Metelitsa L.S. (2011) Anti-tumor potential of type-I NKT cells against CD1d-positive and CD1d-negative tumors in humans. *Clinical Immunology*, 140(2): 119–129

Murphy K.A., Erickson J.R., Johnson C.S., Seiler C.E., Bedi J., Hu P., Pluhar G.E., Epstein A.L., Ohlfest J.R. (2014) CD8+ T cell-independent tumor regression induced by Fc-OX40L and therapeutic vaccination in a mouse model of glioma. *Journal of Immunology*, 192(1): 224–233

Murthy V., Minehart J., Sterman D.H. (2017) Local immunotherapy of cancer: innovative approaches to harnessing tumor-specific immune responses. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(12): djx097

Ngwenya B.Z., Yamamoto N. (1985) Activation of peritoneal macrophages by lysophosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 839(1): 9–15

Ngwenya B.Z., Yamamoto N. (1986) Effects of inflammation products on immune systems. Lysophosphatidylcholine stimulates macrophages. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 21(3): 174–182

Nozari A., Berezovski M.V. (2017) Aptamers for CD antigens: from cell profiling to activity modulation. *Molecular Therapy – Nucleic Acids*, 6: 29–44

Olmos G., Lladó J. (2014) Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*, 2014: 861231

Pan X.-Q. (2012) The mechanism of the anticancer function of M1 macrophages and their use in the clinic. *Chinese Journal of Cancer*, 31(12): 557–563

Peipp M., van Bueren J.J.L., Schneider-Merck T., Bleeker W.W.K., Dechant M., Beyer T., Repp R., van Berkel P.H.C., Vink T., van de Winkel J.G.J., Parren P.W.H.I., Valerius T. (2008) Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*, 112(6): 2390–2399

Pericle F., Kirken R.A., Epling-Burnette P.K., Blanchard D.K., Djeu J.Y. (1996) Direct killing of interleukin-2-transfected tumor cells by human neutrophils. *International Journal of Cancer*, 66(3): 367–373

Peter M.E., Krammer P.H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation*, 10(1): 26–35

Petty A.J., Yang Y. (2017) Tumor-associated macrophages: Implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 9(3): 289–302

Philchenkov A.A. (2003) Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions. *Biochemistry (Moscow)*, 68(4): 365–376

Piontek G.E., Taniguchi K., Ljunggren H.G., Grönberg A., Kiessling R., Klein G., Kärre K. (1985) YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage. *Journal of Immunology*, 135(6): 4281–4288

Pratico E.D., Sullenger B.A., Nair S.K. (2013) Identification and characterization of an agonistic aptamer against the T cell costimulatory receptor, OX40. *Nucleic Acid Therapeutics*, 23(1): 35–43

Redmond W.L., Weinberg A.D. (2007) Targeting OX40 and OX40L for the treatment of autoimmunity and cancer. *Critical Reviews in Immunology*, 27(5): 415–436

Sagiv-Barfi I., Czerwinski D.K., Levy S., Alam I.S., Mayer A.T., Gambhir S.S., Levy R. (2018) Eradication of spontaneous malignancy by local immunotherapy. *Science Translational Medicine*, 10(426): eaan4488

Schneider-Merck T., van Bueren J.J.L., Berger S., Rossen K., van Berkel P.H.C., Derer S., Beyer T., Lohse S., Bleeker W.K., Peipp M., Parren P.W.H.I., van de Winkel J.G.J., Valerius T., Dechant M.

(2010) Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *Journal of Immunology*, 184(1): 512–520

Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2): 163–189

Segal A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, 23: 197–223

Sersa G., Teissie J., Cemazar M., Signori E., Kamensek U., Marshall G., Miklavcic D. (2015) Electrochemotherapy of tumors as *in situ* vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(10): 1315–1327

Sgambato A., Casaluze F., Sacco P.C., Palazzolo G., Maione P., Rossi A., Ciardiello F., Gridelli C. (2016) Anti PD-1 and PDL-1 immunotherapy in the treatment of advanced non- small cell lung cancer (NSCLC): a review on toxicity profile and its management. *Current Drug Safety*, 11(1): 62–68

Sködl M., Behar S.M. (2003) Role of CD1d-restricted NKT cells in microbial immunity. *Infection and Immunity*, 71(10): 5447–5455

Smyth M.J., Godfrey D.I. (2000) NKT cells and tumor immunity – a double-edged sword. *Nature Immunology*, 1(6): 459–460

Song Y., Margolles-Clark E., Bayer A., Buchwald P. (2014) Small-molecule modulators of the OX40-OX40 ligand co-stimulatory protein-protein interaction. *British Journal of Pharmacology*, 171(21): 4955–4969

Sтары G., Bangert C., Tauber M., Strohal R., Kopp T., Stingl G. (2007) Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204(6): 1441–1451

Sтары G., Klein I., Kohlhofer S., Koszik F., Scherzer T., Mullauer L., Quendler H., Kohrgruber N., Stingl G. (2009) Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4⁺ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood*, 114(18): 3854–3863

Street S.E.A., Cretney E., Smyth M.J. (2001) Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, 97(1): 192–197

Subrahmanyam P.B., Carey G.B., Webb T.J. (2014) Bcl-xL regulates CD1d-mediated antigen presentation to NKT cells by altering CD1d trafficking through the endocytic pathway. *Journal of Immunology*, 193(5): 2096–2105

Takahashi Y., Matsutani N., Nakayama T., Dejima H., Uehara H., Kawamura M. (2017) Immunological effect of local ablation combined with immunotherapy on solid malignancies. *Chinese Journal of Cancer*, 36: 49

Tang X., Li Q., Zhu Y., Zheng D., Dai J., Ni W., Wei J., Xue Y., Chen K., Hou W., Zhang C., Feng X., Liang Y. (2015) The advantages of PD1 activating chimeric receptor (PD1-ACR) engineered lymphocytes for PDL1(+) cancer therapy. *American Journal of Translational Research*, 7(3): 460–473

Thiery J., Keefe D., Boulant S., Boucrot E., Walch M., Martinvalet D., Goping I.S., Bleackley R.C., Kirchhausen T., Lieberman J. (2011) Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature Immunology*, 12(8): 770–777

Trinchieri G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(2): 133–146

Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Mishinov S.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Y., Stupak V.V., Pendyurin I.V., Shilov A.G., Alyamkina E.A., Rubtsova N.V., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. (2013) Cytotoxic activity of ex-vivo generated IFN α -induced monocyte-derived dendritic cells in brain glioma patients. *Cellular Immunology*, 284(1–2): 146–153

van Dommelen S.L.H., Degli-Esposti M.A. (2004) NKT cells and viral immunity. *Immunology and Cell Biology*, 82(3): 332–341

Vanderheyde N., Aksoy E., Amraoui Z., Vandenabeele P., Goldman M., Willems F. (2001) Tumoricidal activity of monocyte-derived dendritic cells: evidence for a caspase-8-dependent, Fas-associated death domain-independent mechanism. *Journal of Immunology*, 167(7): 3565–3569

Vicari A.P., Chiodoni C., Vaure C., Ait-Yahia S., Dercamp C., Matsos F., Reynard O., Taverne C., Merle P., Colombo M.P., O'Garra A., Trinchieri G., Caux C. (2002) Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 196(4): 541–549

Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*, 10(1): 45–65

Wang L., Yang J.K., Kabaleeswaran V., Rice A.J., Cruz A.C., Park A.Y., Yin Q., Damko E., Jang S.B., Raunser S., Robinson C.V., Siegel R.M., Walz T., Wu H. (2010) The Fas–FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(11): 1324–1329

Wang W., Erbe A.K., Hank J.A., Morris Z.S., Sondel P.M. (2015) NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 6: 368

Webb T.J., Carey G.B., East J.E., Sun W., Bollino D.R., Kimball A.S., Brutkiewicz R.R. (2016) Alterations in cellular metabolism modulate CD1d-mediated NKT-cell responses. *Pathogens and Disease*, 74(6): ftw055

Weinberg A.D., Morris N.P., Kovacovics-Bankowski M., Urba W.J., Curti B.D. (2011) Science gone translational: the OX40 agonist story. *Immunological Reviews*, 244(1): 218–231

Wu H., Hymowitz S.G. (2010) Structure and function of tumor necrosis factor (TNF) at the cell surface. *Handbook of Cell Signaling*. Bradshaw R., Dennis E. (eds.) Academic Press, p. 265–275

Yamamoto N., Ngwenya B.Z. (1987) Activation of mouse peritoneal macrophages by lysophospholipids and ether derivatives of neutral lipids and phospholipids. *Cancer Research*, 47(8): 2008–2013

Yamamoto N., Kumashiro R. (1993) Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. *Journal of Immunology*, 151(5): 2794–2802

Yamamoto N., Suyama H., Yamamoto N. (2008) Immunotherapy for prostate cancer with Gc protein-derived macrophage-activating factor, GcMAF. *Translational Oncology*, 1(2): 65–72

Yu Y., Liu S., Wang W., Song W., Zhang M., Zhang W., Qin Z., Cao X. (2002) Involvement of tumour necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand in enhanced cytotoxicity of lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells to activated T cells. *Immunology*, 106(3): 308–315

Yue Z., Liu Y., Ruan J., Zhou L., Lu Y. (2012) Tumor-associated macrophages: a novel potential target for cancer treatment. *Chinese Medical Journal*, 125(18): 3305–3311

Zaini J., Andarini S., Tahara M., Saijo Y., Ishii N., Kawakami K., Taniguchi M., Sugamura K., Nukiwa T., Kikuchi T. (2007) OX40 ligand expressed by DCs costimulates NKT and CD4⁺ Th cell antitumor immunity in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 117(11): 3330–3338

Zajonc D.M., Girardi E. (2015) Recognition of microbial glycolipids by natural killer T cells. *Frontiers in Immunology*, 6: 400

Zhang N., Sadun R.E., Arias R.S., Flanagan M.L., Sachsman S.M., Nien Y.-C., Khawli L.A., Hu P., Epstein A.L. (2007) Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 13(9): 2758–2767

Zhdanova N.S., Rubtsov N.B., Minina Yu.M. (2007) Terminal regions of mammal chromosomes: Plasticity and role in evolution. *Russian Journal of Genetics*, 43(7): 721–732

DOI 10.17516/1997-1389-0327

УДК 611.98:616-089.811

Blebbing of the Lymphocyte Plasma Membrane as a Pathogenetic Marker of Critical Ischemia of the Lower Extremities

**Yuriy S. Vinnik,
Svetlana S. Dunaevskaya and Dar'ya A. Antyufrieva***
*V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 22.04.2018, received in revised form 23.09.2019, accepted 23.09.2020

Abstract. The increasing interest in studying obliterating atherosclerosis of vessels of the lower extremities (OAVLE) has been triggered by the growing incidence of the disease and the need for a multidisciplinary approach to diagnostics and treatment of OAVLE. Patients with OAVLE had the following tests: lipid profile, the state of the coagulation component of hemostasis, total homocysteine, the state of arterial lumens, and blebbing of the lymphocyte plasma membrane. The patients were divided into two groups: Group 1 (30 patients) – patients with class IIB ischemia, according to Pokrovsky-Fontaine's classification, and Group 2 (30 patients) – patients with critical ischemia of the lower extremities. The tests revealed a strong positive correlation between the total blebbing of lymphocytes and the development of critical ischemia ($rS=0.85$, $p<0.001$) and a very strong positive correlation between the number of lymphocytes in the state of terminal blebbing and the development of critical ischemia ($rS=0.96$, $p<0.001$). Other significant factors were a decrease in LPHD, an increase in total homocysteine, and development of hypercoagulation. The data obtained in the present study confirm the importance of assessing the blebbing of the lymphocyte plasma membrane in patients with critical ischemia of the lower extremities.

Keywords: atherosclerosis, ischemia, lymphocytes, blebbing, homocysteine.

Citation: Vinnik Yu.S., Dunaevskaya S.S., Antyufrieva D.A. Blebbing of the lymphocyte plasma membrane as a pathogenetic marker of critical ischemia of the lower extremities. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2020, 13(3), 270-279. DOI: 10.17516/1997-1389-0327

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: antyufrievadaria@gmail.com

ORCID: 0000-0002-8995-2862 (Vinnik Yu.); 0000-0003-2820-4737 (Dunaevskaya S.)

Блеббинг плазматической мембраны лимфоцитов как патогенетический маркер критической ишемии нижних конечностей

Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Д.А. Антюфриева
*Красноярский государственный медицинский университет
им. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Российская Федерация, Красноярск*

Аннотация. Возрастающий интерес к изучению облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей связан с увеличением заболеваемости и необходимостью мультидисциплинарного подхода к диагностике и лечению данного заболевания. У пациентов с атеросклерозом был исследован липидный профиль, состояние коагуляционного звена гемостаза, уровень общего гомоцистеина, состояние просвета артерий и блеббинг плазматической мембраны лимфоцитов. Больные были разделены на две группы: 1-я группа (30 пациентов) с ишемией II В степени по классификации Покровского-Фонтейна и 2-я группа (30 пациентов) с критической ишемией нижних конечностей. Выявили высокую положительную корреляцию между суммарным блеббингом лимфоцитов и развитием критической ишемии ($rS=0,85$, $p<0,001$) и очень высокую положительную корреляцию между числом лимфоцитов в состоянии терминального блеббинга и развитием критической ишемии ($rS=0,96$, $p<0,001$). Кроме того, значимую роль играет снижение ЛПВП, повышение уровня общего гомоцистеина и развитие гиперкоагуляции. Полученные данные свидетельствуют о важности оценки блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов у пациентов с критической ишемией нижних конечностей.

Ключевые слова: атеросклероз, ишемия, лимфоциты, блеббинг, гомоцистеин.

Цитирование: Винник, Ю.С. Блеббинг плазматической мембраны лимфоцитов как патогенетический маркер критической ишемии нижних конечностей / Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Д.А. Антюфриева // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(3). С. 270-279. DOI: 10.17516/1997-1389-0327

Введение

Возрастающий интерес к изучению облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей (ОАСНК) связан с увеличением заболеваемости и необходимостью мультидисциплинарного подхода к диагностике и лечению этого заболевания (Gallino et al., 2014). В настоящее время прогресс заболевания и развитие критической ишемии являются одной из наиболее важных про-

блем сосудистой хирургии (Lambert, Belch, 2013; Харазов и др., 2016). Для успешного лечения необходимо понимать, что прогрессирование атеросклеротического поражения сосудов зависит от множества факторов: состояния липидного обмена, свертывающей и противосвертывающей системы крови, а также клеточных механизмов повреждения эндотелия сосудов (Lu, Daugherty, 2015). Активация лимфоцитов и их взаимодействие

с эндотелиальными клетками приводят к развитию асептического воспаления в стенке артерии, провоцируя образование атеросклеротической бляшки (Libby, 2012). При усилении внутриклеточных сигнальных систем лимфоцита за счет блеббинга плазматической мембраны формируется активный рецепторный полюс, который взаимодействует с эндотелиоцитом. В результате блеббинга образуются микрочастицы лимфоцитарного происхождения, взаимодействующие с эндотелиальными клетками, что приводит к асептическому воспалению и является пусковым моментом формирования атеросклеротической бляшки в стенке сосуда. Кроме того, постоянная стимуляция эндотелиоцитов приводит к апоптозу и слущиванию эндотелия, усиливая его дисфункцию (Martinez et al., 2005; Veum et al., 2008; Inzhutova et al., 2012). Дисфункция эндотелия запускает каскад патологических реакций, провоцирующих формирование атеросклеротических бляшек, нарушает баланс между антитромбогенными и тромбогенными факторами, вазоконстрикторами и вазодилататорами (Шабров и др., 2016). Важность оценки блеббинга лимфоцитов как маркера эндотелиальной дисфункции была доказана для многих сердечно-сосудистых заболеваний, таких как гипертоническая болезнь и ишемическая болезнь сердца, в патогенезе которых значимую роль играет формирование атеросклеротических бляшек (Инжутова и др., 2010; Зимницкая и др., 2015). Это обуславливает интерес к исследованию состояния активации лимфоцитов и блеббинга плазматической мембраны у пациентов с ОАСНК.

Целью исследования являлась оценка диагностической значимости блеббинга лимфоцитов в диагностике и прогнозировании критической ишемии сосудов нижних конечностей.

Материалы и методы

Когортное проспективное исследование, включавшее пациентов с ОАСНК, находившихся на лечении в хирургическом отделении СНКЦ ФМБА России, проводили с 2015 по 2017 г. Исследование одобрено на заседании локального этического комитета ГБОУ ВПО КрасГМУ, протокол 57/2014 от 29.10.2014. На основании анамнестических данных (длительность заболевания, дистанция безболевой ходьбы, уменьшение дистанции безболевой ходьбы в течение года, наличие болей в покое, длительность сохранения эффекта от консервативного лечения) и данных объективного осмотра (состояние кожных покровов, пульсация магистральных артерий нижних конечностей, наличие трофических расстройств и признаков формирующегося некроза) были сформированы две группы пациентов: 1-я группа (30 пациентов) с ишемией II В степени по классификации Покровского-Фонтейна и 2-я группа (30 пациентов) с критической ишемией нижних конечностей. В соответствии с «Национальными рекомендациями по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей», разработанными Российским обществом ангиологов и сосудистых хирургов, ассоциацией сердечно-сосудистых хирургов России, Российским научным обществом рентгеноваскулярных хирургов и интервенционных радиологов, Всероссийским научным обществом кардиологов и Ассоциацией флебологов России (Москва, 2013 г.), под критической ишемией понимали синдром декомпенсации хронической артериальной недостаточности конечности вследствие заболевания артерий нижних конечностей, основными клиническими признаками которого являются боль в покое, не купируемая наркотическими анальгетиками, и (или) наличие язвенно-некротического процесса стопы. Для объективизации

ишемии оценивали лодыжечное артериальное давление, лодыжечно-плечевой индекс, пальцевое артериальное давление, транскутанное напряжение кислорода в пальцах стопы. Характер гемодинамики и мультифокальное поражение артерий нижних конечностей было подтверждено инструментальными методами исследования (УЗДГ артерий нижних конечностей, КТ-ангиографией). Обе группы пациентов были сравнимы по возрастному и половому составу: в группах все пациенты являлись мужчинами, возраст пациентов в 1-й группе составил 68 [57; 74] лет, во 2-й – 70 [56; 73] лет. В качестве контрольной группы выступали 15 практически здоровых добровольцев мужского пола, сопоставимые с исследуемыми группами пациентов по возрасту, который составил 67 [55; 74] лет, без признаков ОАСНК.

В рамках исследования были использованы физикальные, лабораторные и инструментальные методы. Для объективизации оценки состояния магистральных артерий при поступлении в стационар всем пациентам выполнили ультразвуковую доплерографию артерий нижних конечностей и по показаниям компьютерную ангиографию.

Исследование блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов проводили на базе НИИ молекулярной медицины и патофизиологии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. Забор крови осуществляли при поступлении в стационар до начала терапии. Лимфоциты периферической крови выделяли по стандартному протоколу. Центрифугировали гепаринизированную кровь по градиенту плотности со средой Lympholyte H CL5010 (Cedarlane Laboratories Limited, Канада). Полученные клетки оценивали при помощи фазово-контрастной микроскопии (увеличение $\times 80$) на универсальном микроскопе Olympus

BX-41 (Olympus, Япония), цифровые снимки сделаны с помощью камеры Olympus DP72 (Olympus, Япония). Оценивали число лимфоцитов в состоянии начального блеббинга (мелкие везикулы на плазматической мембране, занимающие до 1/3 радиуса клетки), число лимфоцитов в состоянии терминального блеббинга (крупные множественные везикулы плазматической мембраны, занимающие более 1/3 радиуса), суммарный блеббинг – сумма клеток в состоянии начального и терминального блеббинга – в процентах от общего числа лимфоцитов (не менее 10 полей зрения, при этом подсчет вели на 100 выделенных лимфоцитов).

Уровни общего холестерина (ОХ), холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов (ТГ) и индекса атерогенности (ИА) были использованы для оценки состояния липидного обмена. Исследование проводили с помощью гомогенного энзиматического колориметрического теста. Оценивали коагулограмму: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), международное нормализованное отношение (МНО) и уровень фибриногена с использованием автоматического анализатора параметров свертывающей системы ACL TOP 700 (Instrumentation Laboratory Werfen, США). Уровень общего гомоцистеина определяли методом твердофазного хемилюминесцентного иммуноферментного анализа с помощью анализатора Architect i2000 с хемилюминесцентной технологией Chemiflex (Abbott Laboratories, США).

Описательная статистика представлена в виде медианы 25; 75 перцентилей Me [Q₁; Q₃]. Характер распределения полученных величин оценивали на основании теста Шапиро-Уилка. Большинство величин не соответ-

ствоvalи нормальному распределению, для попарного сравнения в группах применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Критический уровень статистической значимости при проверке нулевой гипотезы считали равным 0,05.

С помощью множественного регрессионного анализа и коэффициентов корреляции Спирмена (rS), Гамма и Кендалл-Тау установили взаимосвязи между отдельными парами признаков.

Результаты

У пациентов с ОАСНК регистрировали значимые изменения в плазматической мембране лимфоцитов (табл. 1). В 1-й группе с ишемией II В степени суммарный блеббинг составил 18,2 [12,6; 20,6], что было выше показателя практически здоровых лиц 10,6 [7,2; 11,5] ($p_1 < 0,001$), при этом преобладали клетки в состоянии начального блеббинга 13,3 [8,4; 15,7], а число клеток в состоянии терминального блеббинга было относительно невелико 6,3 [5,2; 8,7]. При развитии критической ишемии активация лимфоцитов происходила значительно интенсивнее. Суммарный блеббинг при критической ишемии составил 48,4 [32,7;

50,4], что более чем в 4 раза превышало показатель контрольной группы ($p_1 < 0,001$) и более чем в 2 раза показатель в группе пациентов с ишемией II В степени ($p_2 < 0,001$). Кроме того, при критической ишемии преобладало число клеток в состоянии терминального блеббинга 26,4 [19,6; 29,3] в сравнении с числом лимфоцитов в стадии начального блеббинга (табл. 1).

Нарушение липидного обмена играет важную роль в течении ОАСНК. Уровень общего холестерина был значимо повышен у пациентов обеих групп в сравнении с группой контроля, но при этом не имел значимых отличий между группами ($p_2 = 0,461$) и составил 6,30 [6,10; 7,20] ммоль/л для пациентов 1-й группы и 5,50 [4,80; 5,90] ммоль/л – для 2-й группы (табл. 2). Уровень ЛПНП, обладающих атерогенными свойствами, был высоким у пациентов в обеих группах и составил у пациентов со II В стадией ишемии 3,85 [3,10; 4,20] ммоль/л, а у пациентов с критической ишемией – 4,78 [4,10; 6,75] ммоль/л, при этом значимого различия показателей между группами выявлено не было ($p_2 = 0,603$). Уровень «хорошего холестерина» ЛПВП значимо отличался у пациентов и был выше в 1-й груп-

Таблица 1. Блеббинг плазматической мембраны лимфоцитов в зависимости от степени ишемии

Table 1. Blebbing of the lymphocyte plasma membrane as dependent on the degree of ischemia

Показатели	Контрольная группа (n=15)	1-я группа (n=30)	2-я группа (n=30)
Лимфоциты в состоянии начального блеббинга, в пересчете на 100 клеток	7,2 [5,4; 7,9]	13,3 [8,4; 15,7] $p_1 < 0,001$	19,5 [16,8; 21,4] $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Лимфоциты в состоянии терминального блеббинга, в пересчете на 100 клеток	2,5 [1,0; 3,3]	6,3 [5,2; 8,7] $p_1 < 0,001$	26,4 [19,6; 29,3] $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Суммарный блеббинг лимфоцитов, в пересчете на 100 клеток	10,6 [7,2; 11,5]	18,2 [12,6; 20,6] $p_1 < 0,001$	48,4 [32,7; 50,4] $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Примечание: p_1 – значимость различий группы по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни), p_2 – значимость различий между 1-й и 2-й группами (U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 2. Липидный профиль в зависимости от степени ишемии

Table 2. Lipid profile as dependent on the degree of ischemia

Показатели	Контрольная группа (n=15)	1-я группа (n=30)	2-я группа (n=30)
Общий холестерин, ммоль/л	4,30 [4,20; 4,70]	6,30 [6,10; 7,20] $p_1 < 0,001$	5,50 [4,80; 5,90] $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,461$
ЛПНП, ммоль/л	2,60 [2,40; 2,88]	3,85 [3,10; 4,20] $p_1 < 0,001$	4,78 [4,10; 6,75] $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,603$
ЛПВП, ммоль/л	1,10 [1,00; 1,22]	1,80 [1,40; 2,35] $p_1 < 0,001$	0,95 [0,75; 1,10] $p_1 = 0,408$ $p_2 < 0,001$
Триглицериды	0,85 [0,80; 0,98]	1,56 [1,00; 2,20] $p_1 = 0,188$	2,15 [1,78; 2,60] $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Индекс атерогенности	2,05 [1,80; 2,70]	2,32 [1,85; 2,99] $p_1 = 0,611$	3,92 [3,78; 5,06] $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Общий гомоцистеин, мкмоль/л	8,4 [7,0; 10,3]	13,9 [11,9; 15,1] $p_1 < 0,001$	32,1 [29,3; 37,0] $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Примечание: p_1 – значимость различий группы по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни), p_2 – значимость различий между 1-й и 2-й группами (U-критерий Манна-Уитни).

пе – 1,80 [1,40; 2,35] ммоль/л по сравнению со 2-й – 0,95 [0,75; 1,10] ммоль/л ($p_2 < 0,001$). Дисбаланс между «плохим» и «хорошим» холестерином нашел свое отражение в индексе атерогенности, который у пациентов с критической ишемией был выше – 3,92 [3,78; 5,06] ($p_2 < 0,001$), что способствовало прогрессии патологического процесса и усилению ишемии нижних конечностей. Особый интерес представлял уровень общего гомоцистеина как вещества, являющегося маркером повреждения эндотелия. У пациентов с ОАСНК наблюдали повышение этого показателя в сравнении с практически здоровыми лицами ($p_1 < 0,001$). При этом при критической ишемии уровень гомоцистеина был в 3 раза выше, чем у пациентов 1-й группы, и составил 32,1 [29,3; 37,0] мкмоль/л ($p_2 < 0,001$) (табл. 2).

Одно из проявлений нарушений функционального состояния эндотелия – разви-

тие гиперкоагуляции. У пациентов с критической ишемией наблюдали значимое укорочение ПВ до 11,3 [9,9; 11,9] с ($p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$), у пациентов с ишемией II В степени этот показатель оставался в пределах нормальных значений (табл. 3). При критической ишемии регистрировали укорочение ТВ до 12,0 [11,4; 12,3] с ($p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$). Уровень фибриногена был выше значений контрольной группы у всех пациентов с ОАСНК и в 1-й группе составлял 3,9 [3,7; 4,2] г/л ($p_1 < 0,001$), а во 2-й – 5,2 [4,9; 6,4] г/л ($p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$) (табл. 3).

Для объективной оценки сохраненного просвета артерий нижних конечностей целесообразно выполнение современных методов визуализации. Мультиэтажное поражение артерий нижних конечностей делает невозможными реконструктивные операции у этой категории больных. При критической

Таблица 3. Показатели коагуляционного звена гемостаза в зависимости от степени ишемии

Table 3. Parameters of the coagulation component of hemostasis as dependent on the degree of ischemia

Показатели	Контрольная группа (n= 15)	1-я группа (n=30)	2-я группа (n=30)
АЧТВ, с	36,4 [35,2; 37,2]	35,4 [32,6; 37,4] $p_1=0,323$	34,7 [31,2; 35,1] $p_1=0,018$ $p_2=0,499$
ПВ, с	13,8 [12,3; 16,2]	13,5 [12,7; 14,4] $p_1=0,588$	11,3 [9,9; 11,9] $p_1<0,001$ $p_2<0,001$
ТВ, с	15,6 [14,2; 16,9]	14,7 [13,6; 15,1] $p_1=0,399$	12,0 [11,4; 12,3] $p_1<0,001$ $p_2<0,001$
МНО	0,84 [0,67; 0,95]	1,03 [0,95; 1,18] $p_1=0,712$	0,76 [0,65; 1,10] $p_1=0,506$ $p_2=0,822$
Фибриноген, г/л	2,4 [2,1; 3,0]	3,9 [3,7; 4,2] $p_1<0,001$	5,2 [4,9; 6,4] $p_1<0,001$ $p_2<0,001$

Примечание: АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ПВ – протромбиновое время, ТВ – тромбиновое время, МНО – международное нормализованное отношение, p_1 – значимость различий группы по сравнению с контролем (U-критерий Манна-Уитни), p_2 – значимость различий между 1-й и 2-й группами (U-критерий Манна-Уитни).

ишемии сохраненный просвет поверхностной бедренной артерии (ПБА) составил 21,4 [16,0; 23,5] %, что значимо ниже, чем просвет при ишемии II В 30,4 [27,9; 37,6] % ($p_2<0,001$) (табл. 4). Было выявлено поражение подколенной артерии (ПА) – сохраненный просвет в 1-й группе составил 28,19 [15,4; 34,8] %, а во 2-й всего 14,9 [10,3; 18,4] % ($p_2<0,001$). Наибольшую проблему при критической ишемии представляет практически полная окклюзия передней большеберцовой (ПББА) и задней большеберцовой артерий (ЗББА). Нами не было выявлено статистически значимых различий между сохраненным просветом ПББА в исследуемых группах. Сохраненный просвет ПББА в 1-й группе равнялся 20,0 [14,6; 32,7] %, а во 2-й – 9,7 [6,4; 16,8] % ($p_2=0,085$). При этом разница между клиническими проявлениями ишемии была обусловлена возможностью коллатерального кровотока из системы ЗББА, просвет которой у пациентов

с ишемией II степени был равен 23,5 [19,4; 36,4] %, в то время как у пациентов с критической ишемией – всего 11,7 [5,2; 20,4] % ($p_2<0,001$). При этом у троих пациентов во 2-й группе кровотока в бассейне ЗББА отсутствовал полностью. Группы пациентов значимо различались по показателю лодыжечно-плечевого индекса (табл. 4).

Была выявлена высокая положительная корреляция между суммарным блеббингом лимфоцитов и развитием критической ишемии ($rS=0,85$, $p<0,001$) и очень высокая положительная корреляция между числом лимфоцитов в состоянии терминального блеббинга и развитием критической ишемии ($rS=0,96$, $p<0,001$). Кроме того, значимую роль играет снижение ЛПВП, коэффициент корреляции между уровнем ЛПВП и развитием критической ишемии составил $rS= - 0,78$, ($p<0,001$). Коэффициент корреляции между развитием критической ишемии

Таблица 4. Сохранный просвет артерий нижних конечностей в зависимости от степени ишемии

Table 4. The preserved arterial lumens of the lower extremities as dependent on the degree of ischemia

	1-я группа (n=30)	2-я группа (n=30)
ОБА, %	60,2 [52,3; 70,4]	50,8 [48,1; 53,6] $p_2=0,112$
ПБА, %	30,4 [27,9; 37,6]	21,4 [16,0; 23,5] $p_2<0,001$
ГБА, %	68,4 [65,2; 78,3]	52,9 [42,6; 59,4] $p_2=0,031$
ПА, %	28,19 [15,4; 34,8]	14,9 [10,3; 18,4] $p_2<0,001$
ЗББА, %	23,5 [19,4; 36,4]	11,7 [5,2; 20,4] $p_2<0,001$
ПББА, %	20,0 [14,6; 32,7]	9,7 [6,4; 16,8] $p_2=0,085$
Комплекс Интима-медиа, мм	0,84 [0,82; 0,89]	0,87 [0,85; 0,92] $p_2=0,660$
Лодыжечно-плечевой индекс	0,62 [0,58; 0,84]	0,38 [0,35; 0,46] $p_2<0,001$

Примечание: ОБА – общая бедренная артерия, ПБА – поверхностная бедренная артерия, ГБА – глубокая бедренная артерия, ПА – подколенная артерия, ЗББА – задняя большеберцовая артерия, ПББА – передняя большеберцовая артерия, p_2 – значимость различий между 1-й и 2-й группами (U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 5. Коэффициенты корреляции между развитием критической ишемии и основными показателями

Table 5. Coefficients of correlation between the development of critical ischemia and the key parameters

Показатель	Коэффициент корреляции
Индекс атерогенности	$rS=0,74, p<0,001$
Уровень общего гомоцистеина, мкмоль/л	$rS=0,87, p<0,001$
Уровень ЛПВП, ммоль/л	$rS= - 0,78, p<0,001$
ТВ, сек.	$rS= - 0,64, p<0,001$
Фибриноген, г/л	$rS=0,57, p<0,001$
Суммарный блеббинг лимфоцитов	$rS=0,85, p<0,001$
Лимфоциты в состоянии терминального блеббинга	$rS=0,96, p<0,001$

Примечание: rS – коэффициент корреляции Спирмана, p – двусторонняя значимость коэффициента корреляции Спирмана, считается достоверной при $p \leq 0,01$.

и уровнем общего гомоцистеина – $rS=0,87, p<0,001$ (табл. 5).

Коэффициенты корреляции между лабораторными и инструментальными показателями на фоне критической ишемии даны в таблице (см. материал, размещенный на сайте).

Обсуждение

Высокий уровень суммарного блеббинга и преобладание терминального блеббинга при критической ишемии свидетельствуют об интенсивности активации лимфоцитов и повреждении эндотелия сосудов нижних конечностей.

Формирующиеся в результате блеббинга микрочастицы лимфоцитарного происхождения взаимодействуют с эндотелиальными клетками сосудов и приводят к повреждению эндотелия. Доказана высокая корреляция клеточных показателей, таких как блеббинг лимфоцитов и формирование микрочастиц лимфоцитарного происхождения с гуморальными показателями повреждения эндотелия, в частности, уровнем sPECAM-1 и антителами к фосфолипидам (Петрова и др., 2007). Повреждение эндотелия приводит к прогрессированию и образованию новых атеросклеротических бляшек, что достоверно отражается на снижении сохраненного просвета сосудов у пациентов. Снижение просвета сосудов вызывает снижение кровотока в тканях нижних конечностей, обуславливая нарушение перфузии и развитие критической ишемии нижних конечностей. Таким образом, лимфоцитарная активация является косвенным маркером облитерации просвета артериального сосуда, что согласуется с данными ранее проведенных исследований (Martinez et al., 2005; Inzhutova et al., 2012; Emeryanchik et al., 2017). В ходе нашей работы впервые оценена корреляция между уровнем клеток в различных фазах блеббинга и развитием критической ишемии.

Активность лимфоцитарных микрочастиц, формирующихся в результате блеббин-

га плазматической мембраны, также приводит к дисбалансу между антитромбогенными и тромбогенными факторами, что нашло свое отражение в выявленных признаках гиперкоагуляции у пациентов с критической ишемией и согласуется с литературными данными (Martinez et al., 2005; Шабров и др., 2016).

Проведенные исследования доказывают значимую роль гомоцистеина в повреждении эндотелиальных клеток и его влияние на процессы фибринолиза и коагуляции. Повышение уровня гомоцистеина среди прочего приводит к развитию гиперкоагуляции и тромбоза (Malinowska et al., 2012), что также подтверждается полученным в нашей работе высоким коэффициентом корреляции между развитием критической ишемии и уровнем общего гомоцистеина.

Заключение

Суммарный блеббинг и число лимфоцитов в состоянии терминального блеббинга объективно отражают интенсивность поражения эндотелия и являются перспективными маркерами развития критической ишемии нижних конечностей при облитерирующем атеросклерозе. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важности оценки блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов у пациентов с критической ишемией нижних конечностей.

Список литературы / References

- Зимницкая О.В., Малиновская Н.А., Петрова М.М., Салмина А.Б. (2015) Мобилизация эндотелиальных прогениторных клеток у пациентов с гипертонической болезнью II-III стадии. *Сибирское медицинское обозрение*, 5: 40-44 [Zimnitskaya O.V., Malinovskaya N.A., Petrova M.M., Salmina A.B. (2015) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with hypertensive disease stage II-III. *Siberian Medical Review* [Sibirskoe meditsinskoe obozrenie], 5: 40-44 (in Russian)]
- Инжутова А.И., Ларионов А.А., Салмина А.Б., Петрова М.М. (2010) Молекулярно-клеточные механизмы эндотелиальной дисфункции различного генеза (сообщение 1). *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*, 96(5): 85-88 [Inzhutova A.I., Larionov A.A., Salmina A.B., Petrova M.M. (2010) Molecular and cellular mechanisms of endothelial dysfunction

in different pathology. Report 1. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)* [Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)], 96(5): 85-88 (in Russian)]

Петрова М.М., Салмина А.Б., Инжутова А.И. (2007) Современные подходы к диагностике эндотелиальной дисфункции у больных гипертонической болезнью. *Сибирское медицинское обозрение*, 4: 17-20 [Petrova M.M., Salmina A.B., Inzhutova A.I. (2007) Modern approach to diagnostics of endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Siberian Medical Review* [Sibirskoe meditsinskoe obozrenie], 4: 17-20 (in Russian)]

Харазов А.Ф., Каляев А.О., Исаев А.А. (2016) Распространенность симптомной ишемии нижних конечностей в Российской Федерации. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*, 7: 58-61 [Kharazov A.F., Kalyev A.O., Isaev A.A. (2016) PAD prevalence in Russian Federation. *Pirogov Russian Journal of Surgery* [Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova], 7: 58-61 (in Russian)]

Шабров А.В., Апресян А.Г., Добкес А.Л., Ермолов С.Ю., Ермолова Т.В., Манасян С.Г., Сердюков С.В. (2016) Современные методы оценки эндотелиальной дисфункции и возможности их применения в практической медицине. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*, 12(6): 733-742 [Shabrov A.V., Apresyan A.G., Dobkes A.L., Ermolov S.U., Ermolova T.V., Manasyan S.G., Serdyukov S.V. (2016) Current methods of endothelial dysfunction assessment and their possible use in the practical medicine. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* [Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii], 12(6): 733-742 (in Russian)]

Beum P.V., Lindorfer M.A., Beurskens F., Stukenberg P.T., Lokhorst H.M., Pawluczkowycz A.W., Parren P.W.H.I., van de Winkel J.G.J., Taylor R.P. (2008) Complement activation on B lymphocytes opsonized with rituximab or ofatumumab produces substantial changes in membrane structure preceding cell lysis. *Journal of Immunology*, 181(1): 822-832

Emeryanchik E.Y., Vol'f N.G., Vesemiller O.A., Salmina A.B. (2017) Functional state of vascular endothelium in patients with pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart diseases. *Kardiologiya*, 57(8): 40-46

Gallino A., Aboyans V., Diehm C., Cosentino F., Stricker H., Falk E., Schouten O., Lekakis J., Amann-Vesti B., Siclari F., Poredos P., Novo S., Brodmann M., Schulte K.L., Vlachopoulos C., De Caterina R., Libby P., Baumgartner I. (2014) Non-coronary atherosclerosis. *European Heart Journal*, 35(17): 1112-1119

Inzhutova A.I., Larionov A.A., Petrova M.M., Salmina A.B. (2012) Theory of intercellular communication in the development of endothelial dysfunction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 153(2): 201-205

Lambert M.A., Belch J.J.F. (2013) Medical management of critical limb ischaemia: where do we stand today? *Journal of Internal Medicine*, 274(4): 295-307

Libby P. (2012) Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 32(9): 2045-2051

Lu H., Daugherty A. (2015) Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 35(3): 485-491

Malinowska J., Kolodziejczyk J., Olas B. (2012) The disturbance of hemostasis induced by hyperhomocysteinemia; the role of antioxidants. *Acta Biochimica Polonica*, 59(2): 185-194

Martinez M.C., Tesse A., Zobairi F., Andriantsitohaina R. (2005) Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288(3): H1004-H1009

DOI 10.17516/1997-1389-0328

УДК 372.41:612.846

Oculomotor Activity During Reading in Elementary School-Aged Students with Different Cognitive Skills

Ekaterina A. Budenkova* and **Irina A. Vakoliuk**
*Immanuel Kant Baltic Federal University, School of Life Science
Kaliningrad, Russian Federation*

Received 02.11.2018, received in revised form 13.07.2019, accepted 11.10.2019

Abstract. Eye movements provide relevant information about the functional state of some cognitive functions. The connection between eye movements and cognitive processes is based on the anatomical and functional overlap of structures controlling them in different parts of the brain. Various human activities, including reading, are associated with eye movements. Reading skills include two components: reading technique (a motor component) and reading comprehension (a cognitive component). Monitoring and interpretation of oculomotor response is a useful tool for studying the reading process. The present study characterizes saccadic and fixation eye-movement components in 7-8 year-old elementary school students that showed poor reading comprehension. The students were divided into three groups based on answer quality: giving no answer, giving a wrong answer, and coping with the task only with a prompt. The groups were found to differ in the amplitude, velocity, and deceleration of pro- and regressive saccades and the average duration of fixations per word. Thus, eye-movement parameters can be used to characterize the groups of schoolchildren that experience difficulty in reading comprehension or in formulating an answer to a semantic question. The present study contributes insight into various cognitive reading strategies and can be useful for creating personal learning paths for elementary school students to master reading skills, which are important for social success.

Keywords: eye tracking, saccades, gaze fixation, reading, elementary school-aged students.

Citation: Budenkova E.A., Vakoliuk I.A. Oculomotor activity during reading in elementary school-aged students with different cognitive skills. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2020, 13(3), 280-296. DOI: 10.17516/1997-1389-0328

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: KBudenkova@gmail.com

ORCID: 0000-0003-4854-5459 (Budenkova E.)

Параметры движений глаз у младших школьников при оценке когнитивного компонента чтения

Е.А. Буденкова, И.А. Ваколюк
*Балтийский федеральный университет
им. И. Канта, Институт живых систем
Российская Федерация, Калининград*

Аннотация. Движения глаз могут отражать релевантную информацию о функциональном состоянии некоторых когнитивных функций. Взаимосвязь движений глаз и когнитивных процессов основана на анатомо-функциональном перекрытии контролируемых их структур в различных отделах головного мозга. С движениями глаз связаны многие формы активности человека, в том числе и чтение. Навык чтения складывается из двух компонентов: техника чтения (моторный компонент) и понимание читаемого текста (когнитивный компонент). Регистрация и интерпретация глазодвигательных реакций представляют собой полезный инструмент для изучения процессов чтения. В нашем исследовании получена характеристика саккадического и фиксационного компонентов движений глаз у школьников 7-8 лет с неудовлетворительным уровнем понимания читаемого текста, с выделением трех групп на основе качества ответа на вопрос (не давшие ответ, давшие неправильный ответ или справившиеся с задачей только после подсказки). Установлены особенности этих групп по амплитуде и скорости про- и регрессивных саккад, а также средней продолжительности фиксаций на слово. Исходя из полученных результатов, можно охарактеризовать группы учеников, испытывавших сложность с пониманием смысла читаемого текста или формулировкой ответа на смысловой вопрос, через параметры движений глаз. Полученные результаты вносят вклад в понимание разных типов когнитивных стратегий чтения, что представляется полезным для построения индивидуальных траекторий обучения школьников начальных классов такому важному навыку, как чтение, необходимому для успешного социального функционирования.

Ключевые слова: айтрекинг, саккады, фиксации взора, чтение, младшие школьники.

Цитирование: Буденкова, Е.А. Параметры движений глаз у младших школьников при оценке когнитивного компонента чтения / Е.А. Буденкова, И.А. Ваколюк // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(3). С. 280-296. DOI: 10.17516/1997-1389-0328

Введение

Начиная со второй половины XIX в. вопрос развития эффективного навыка чтения приобрел широкий интерес, но, несмотря на многообразие разработанных стратегий чтения, проблема остается актуальной. Так, по данным PISA 2015 (Programme for International Student Assessment), среди 70 стран школьни-

ки России в возрасте 15 лет занимают 26 место в области читательской грамотности. В качестве инструмента для оценки развития навыка чтения внимание исследователей привлекла окуломоторная активность (Дубасова, 2010; Clifton et al., 2016; Foster et al., 2018; Гарипова, 2018), базовыми компонентами которой являются саккады и фиксации. Сак-

када – это краткий быстрый перевод взгляда с одного объекта на другой. Фиксация – это относительно неподвижная установка взгляда на объекте, состоящая из низкоамплитудных высокочастотных саккад (микросаккад). С помощью метода регистрации движений глаз (айтрекинг) создан ряд математических и теоретических моделей чтения с целью изучить механизм чтения и выявить его максимально эффективный, «идеальный», алгоритм (Дубасова, 2010).

Значительное количество работ посвящено изучению окуломоторной активности школьников с хорошо и плохо сформированным навыком чтения, при чтении текстов разной сложности и неоднозначности. Смена «технической» стратегии чтения на «информационную» после 6 лет под влиянием усиления лингвистических и семантических факторов и совершенствования когнитивных функций сопровождается сменой окуломоторной стратегии чтения, например, уменьшается количество просаккад (движения по направлению чтения) и регрессивных саккад (возвратных саккад). При сформированном навыке чтения продолжительность фиксаций и время ожидания саккады в среднем составляют 200-250 мс, продолжительность саккад 10-80 мс, а скорость саккад принимает значение 200-600 град/с (Дубасова, 2010; Scassau, Bucci, 2013).

Нейрональный субстрат глазодвигательных реакций тесно связан с обеспечением когнитивных функций (Kustov, Robinson, 1996; Hutton, 2008; Zhao et al., 2012; Eckstein et al., 2017), поэтому движения глаз представляют интерес в качестве нейрофизиологического маркера состояния внимания, памяти, восприятия, мышления и более сложного интегративного процесса, такого как чтение. Принято считать, что когнитивный компонент глазодвигательных реакций обе-

спечивается корковыми взаимодействиями. Например, повышенная активность теменно-височной коры (ПТС) связана со звукобуквенным декодированием, рост активности префронтальной коры (PFC) левого полушария и дорсолатеральной префронтальной коры (dlPFC) правого полушария – с рабочей памятью (Sharp et al., 2004). Длительность фиксаций связывается главным образом с трудностью идентификации слов в тексте (Безруких, Иванов, 2015) и коррелирует с увеличением активности в вентральной части височно-затылочной коры (vТОС) левого полушария (Steindorf, Rummel, 2020), которая отвечает за визуально-орфографическое распознавание слов по памяти (Rodrigues et al., 2019). Косвенный вклад в когнитивную регуляцию движений глаз приносят и стволовые структуры мозга (Voogd et al., 2012; Mäki-Marttunen et al., 2019; Schmahmann et al., 2019). Регуляция саккад и фиксаций осуществляется по общему принципу (Leigh, Zee, 2015). В регуляции саккад задействованы многие структуры головного мозга, сбой на любом из уровней могут отразиться на окулограмме (графическое отображение движений глаз) качественно и количественно. Сигнал к началу саккады генерируют пачечные нейроны (BNs) ретикулярной формации, стимулируемые глубинными слоями верхних бугорков четверохолмия (SC) среднего мозга, которые, в свою очередь, имеют большое количество прямых и не прямых связей с корой и подкорковыми образованиями (Leigh, Zee, 2015). Переход в режим фиксации, вероятно, связан с передачей сигнала от ОМВ (окуломоторная часть червя мозжечка) на rSC (ростральная часть SC) и омнипаузные нейроны (OPNs) продолговатого мозга (Optican, Pretegianni, 2017).

Продолжительность фиксаций между саккадами отражает процессы интеграции и анализа входящей информации (Иванов и др.,

2010; Bezrukikh, Ivanov, 2013; Frey et al., 2013; Rayner, Reingold, 2015; Rucci, Poletti, 2015; Lopez-Perez et al., 2016). Во время фиксации происходит смещение внимания, селекция места следующей фиксации и запоминание выбранной локации, принимается решение о генерации коррекционной или регрессивной (возвратной) саккады (Leigh, Zee, 2015). Распределение фиксаций (пространственное и временное) и направление саккад служат критерием оценки зон интереса наблюдателя, распределения внимания. При выполнении саккад также происходит обработка поступающей информации: восприятие и распознавание слов, трансаккадическое запоминание, семантический и идентификационный прайминг (ускоренное опознание слова, когда ему предшествовало слово, связанное с ним по смыслу) и др. (Irwin, Thomas, 2007; Schneegans et al., 2014; Yeh et al., 2014; Edwards et al., 2018). Особый интерес представляет процесс трансаккадического запоминания, связанный с переносом информации между пре- и постсаккадическим этапом обработки информации (Stewart, Schütz, 2018). Трансаккадическое запоминание на всех этапах зависит от уровня внимания. Помимо этого, известно, что динамика диаметра зрачка, кроме реакции на свет, коррелирует с общим уровнем бодрствования, внимания и рабочей памяти за счет проекций от голубого пятна (Aminihajibashi et al., 2019; Hakim et al., 2019).

С учетом многокомпонентности и индивидуальности когнитивной регуляции чтения представляется интересным более подробное разделение и описание группы плохо понимающих читаемый текст учеников. В связи с этим целью данного исследования является характеристика глазодвигательных реакций учеников младшего школьного возраста, имеющих разные уровни понимания текста при чтении.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 117 человек (63 мальчика, 54 девочки), ученики вторых классов МБОУ СОШ «Школа будущего» г. Калининграда (средний возраст 8 лет 2 ± 6 мес.). Все участники исследования – здоровые дети с нормальным развитием. Перед проведением исследования родители подписали информированное согласие на участие детей в исследовании. Исследование проводили с соблюдением условия экологической валидности. Проведение исследования было одобрено локальным российским этическим комитетом города Санкт-Петербурга, чья деятельность согласуется с Хельсинской Декларацией, WHO Guidelines, ICH GCP и законами РФ.

У учеников зарегистрировали движения глаз в процессе чтения с помощью аппарата RED250mobile (Sensomotoric Instruments, www.smivision.com). Данная система соответствует европейским стандартам медицинского оборудования (CE-marked, FCC EyeSafety). REDm независимо регистрирует движение обоих глаз. Частота регистрации 120 Hz, разрешающая способность 0,1 углового градуса. RED-m обладает функцией автоматической компенсации движений головы испытуемого. Система обладает достаточной гибкостью и подходит для людей разного возраста и зрения с учетом таких параметров, как цвет глаз, наличие очков и линз.

Во время выполнения заданий испытуемый сидел напротив монитора ноутбука на расстоянии 60 ± 5 см. Тестирование одного испытуемого занимало около 5 мин. Перед началом выполнения задания для каждого испытуемого проводилась калибровка аппарата, испытуемого инструктировали: сфокусировать внимание на центре калибровочной точки, которая движется на экране. После того как аппарат проходил калибровку, на

экране появлялся отрывок текста, испытуемым предлагалось прочесть его вслух, при этом отмечалось количество ошибок при чтении (замена букв/слов, орфоэпические ошибки учитывались в общем), тип чтения (по словам, по словам, бегло) и время чтения. После прочтения текста ученику задавали вопрос о содержании прочитанного («Как думаешь, о чем ты прочел(а) в тексте?», правильный ответ – черепаха). Стимульный материал – отрывок текста из учебника для вторых классов (55 слов, текст без синтаксической неоднозначности), шрифт Times New Roman, 14 кегль:

“Это животное часто заводят в живом уголке в школе и дома, так как оно достаточно неприхотливо. Лежит себе в коробочке или аквариуме, ест мало, ничего не просит. Туловище этого животного покрыто панцирем, состоящим из отдельных щитков, а ноги, голова и хвост – роговыми чешуйками. Животное относится к хладнокровным, его поведение полностью зависит от температуры окружающей среды.”

Численные параметры (амплитуда, продолжительность, средняя и пиковая скорость саккад, длительность фиксаций на слово) были получены с помощью программы BeGaze 3.0 (SMI, Германия). Для характеристики просаккад (по направлению чтения), регрессивных саккад (против направления текста), саккад, переводящих взор на начало новой строки, проведена оценка следующих параметров: длительность и амплитуда, средняя и пиковая скорость, замедление, количество саккад и морганий. Для оценки фиксации составляющей выбраны следующие параметры: продолжительность фиксаций после просаккад, регрессивных саккад и перевода взгляда на новую строку, динамика диаметра зрачка. В результатах описаны только те параметры, по отношению к которым были

обнаружены статистически значимые внутри- или/и межгрупповые различия.

Статистическую обработку полученного материала проводили с использованием SPSS 21.0. Учитывая гетерогенность по количественному составу групп и нормальности распределения, приняли решение применить непараметрические критерии для статистического анализа. Для проверки нормальности распределения параметров использовали критерий Колмогорова-Смирнова ($k-s$ – стандартизированное значение критерия, при $p \leq 0,05$ принимается гипотеза о нормальности распределения значений параметра). Обнаружено, что в группах часть параметров имеет нормальное распределение и часть – ненормальное. Учитывая это, а также малый объем выборки в группах NoA и RWP, для статистической обработки данных выбрали непараметрические критерии. Для сравнения двух несвязанных выборок использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на множественность сравнений (U – критерий Манна-Уитни, Z – показатель отклонения средних значений по выборкам в пределах трех сигм U-критерия, наличие различий при $p \leq 0,01$), для сравнения двух связанных выборок – непараметрический W-критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони на множественность сравнений (W – значение критерия Вилкоксона, наличие различий при $p \leq 0,016$).

Результаты

Ученики были разделены на группы по степени понимания прочитанного текста (табл. 1), критерием служил ответ на вопрос о его содержании. Выделены ученики, правильно ответившие на вопрос (группа Right или R), неправильно ответившие на вопрос (примеры ответов: подводная лодка, фильтр, рыбы и др.) и не давшие никакого ответа.

Таблица 1. Характеристика участников

Table 1. Sample characteristics

Группа	Количество учеников	Пол (м/ж)	Возраст	Тип чтения					
				По слогам		По словам		Бегло	
				Кол-во чел., %	N ошибок	Кол-во чел., %	N ошибок	Кол-во чел., %	N ошибок
R	59	28/25	7 – 8 лет	11	2-4	5	1-5	84	0
W	32	28/29		14	2-4	2	2-5	84	0
NoA	19	15/4		8	0-1	1	0-1	91	0
RwP	7	1/6		23	1-3	4	2-8	73	0

R – школьники, давшие правильный ответ на вопрос; W – школьники, давшие неправильный ответ на вопрос; NoA – школьники, не давшие ответ на вопрос; RwP – школьники, давшие правильный ответ на вопрос после наводящих вопросов.

Всем ученикам, давшим неверный ответ или не ответившим, были заданы наводящие вопросы по содержанию текста. Ученики, которые смогли правильно ответить после наводящих вопросов («Это живое или неживое? Умеет ли это плавать?»), составили группу RwP (Right with prompting), те, которым не помогли наводящие вопросы, составили группы W (Wrong) и NoA (No answer). В каждой группе присутствуют дети с разными типами чтения и, соответственно, с разной скоростью чтения в сравнительно равных соотношениях (табл. 1).

Примеры окулограмм представлены на рис. 1 и 2, а численные значения окуломоторных параметров сведены в табл. 2. Статистически значимых различий по общему количеству на читаемый текст просаккад, регрессивных и межстрочных саккад (и, соответственно, фиксаций) между группами не обнаружено. Согласно литературным данным, регрессивные саккады в норме составляют 10-15 % от общего числа саккадических движений (Smadja et al., 2019). В данном исследовании доля регрессивных саккад составила 13 ± 7 % вне зависимости от группы. Пиковая и средняя скорости саккад имеют схожий характер различий между группами,

поэтому для удобства в дальнейшем будем описывать только среднюю скорость саккад.

Средние значения скорости и амплитуды саккад отображены на рис. 3 и 4 соответственно. Во всех группах средняя скорость просаккад и регрессивных саккад ниже, чем средняя скорость саккад при переводе взора на новую строку, что предсказуемо за счет исходно большей амплитуды межстрочных саккад (табл. 2). Внутригрупповое сравнение показало, что скорость и амплитуда регрессивных саккад достоверно выше, чем скорость и амплитуда просаккад в группах R и NoA (табл. 2, 3). Среднее значение скорости и амплитуды саккад не имеет статистически значимых различий между группами, но стоит отметить увеличение размаха значений скорости в группах W и NoA и размаха значений амплитуды в группах NoA и RwP.

На рис. 5 и 6 приведены, соответственно, средние значения продолжительности фиксаций после саккад и диаметра зрачка при фиксациях. Средняя продолжительность фиксации на слово после просаккад и после перехода на новую строку статистически значимо выше в группе RwP по сравнению с остальными группами (табл. 4). Средняя продолжительность фиксаций после регрессив-

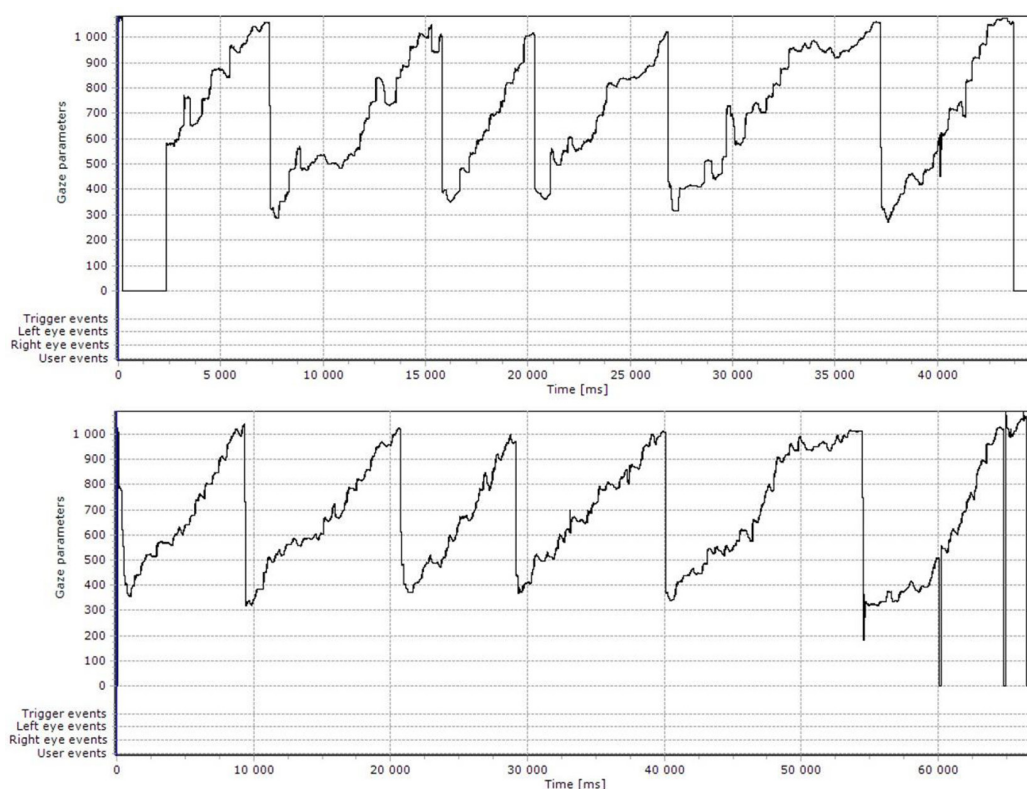


Рис. 1. Примеры окулограмм при чтении: сверху – ученик К., правильно ответивший на вопрос после чтения (группа R); снизу – ученик А., неправильно ответивший на вопрос после чтения (группа W)

Fig. 1. Examples of schoolchildren's video-oculograms recorded during reading: top – school student K., who gave the correct answer to the question after reading (group R); bottom – school student A., who gave a wrong answer to the question after reading (group W)

ных саккад в группах R и W выше, чем в NoA и R_wP (табл. 4). При этом продолжительность фиксации после регрессивных саккад внутри группы W выше, чем после просаккад и перехода на новую строку (табл. 3). А в группе R_wP продолжительность фиксации после регрессивных саккад меньше, чем после просаккад и перехода на новую строку (табл. 3). Среднее значение диаметра зрачка при фиксации после саккад в группах R и W статистически значимо ниже, чем в NoA и R_wP (табл. 4, рис. 6). Внутригрупповое сравнение показало, что в группе R диаметр зрачка при фиксации после регрессивных саккад выше, чем при фиксации после просаккад и после перехода на новую строку (табл. 3).

Обсуждение

Цель данного исследования заключалась в выявлении особенностей oculomotorной активности у школьников 7-8 лет с разным уровнем вдумчивости чтения. В отличие от работ других авторов, в данном исследовании не было обнаружено зависимости между количеством фиксации/саккад, скоростью чтения и степенью понимания текста (Безруких, Иванов, 2015; Vorstius et al., 2014; Steindorf, Rummel, 2020). Скорость чтения и количество фиксации/саккад естественным образом зависят от типа чтения, однако распределение участников в группы по уровню понимания текста показало, что в каждой группе присутствуют ученики с разным типом чтения (табл. 1).

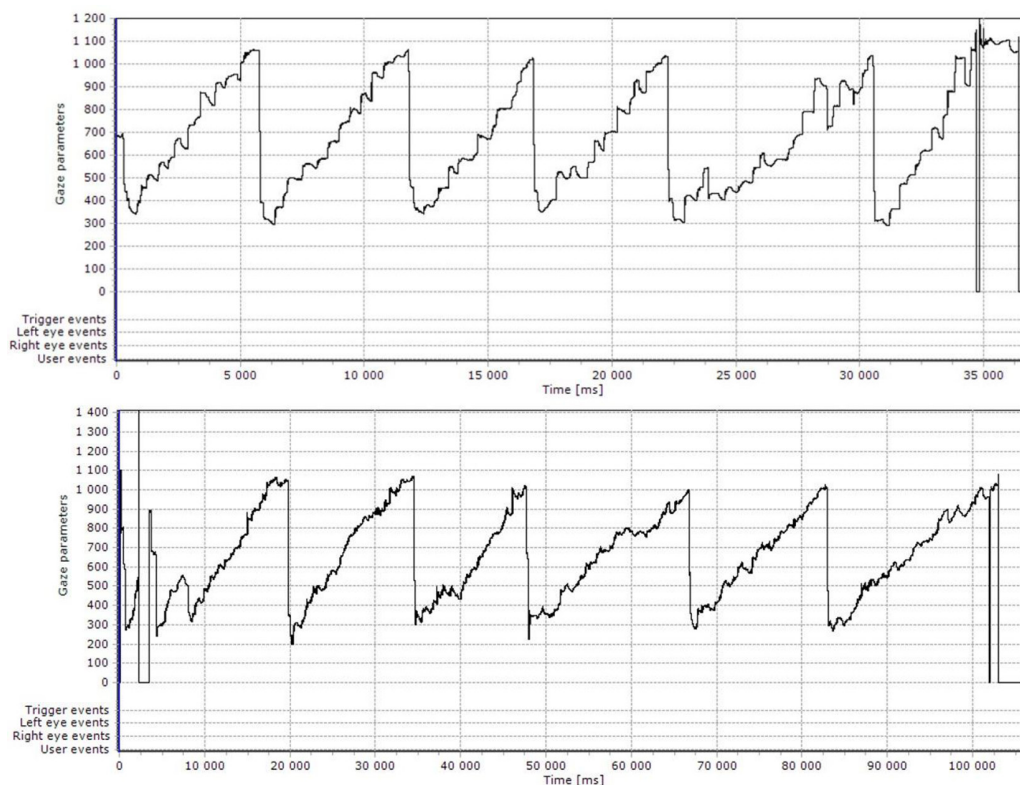


Рис. 2. Примеры окулограмм при чтении: сверху – ученик Т., не ответивший на вопрос после чтения (группа NoA); снизу – ученик Д., правильно ответивший на вопрос после чтения, но после наводящих вопросов (группа RwP)

Fig. 2. Examples of schoolchildren’s video-oculograms recorded during reading: top – school student T., who did not give any answer (group NoA); bottom – school student D., who gave the correct answer to the question with a prompt (group RwP)

Таблица 2. Значения скорости и амплитуды саккад, продолжительности фиксации и диаметр зрачка для школьников всех групп

Table 2. Saccadic velocity, saccadic amplitude, duration of fixation and pupil diameter for all groups

Группы	Просаккады		Регрессивные саккады		Межстрочные саккады	
	медиана; CI	k-s; p-value	медиана; CI	k-s; p-value	медиана; CI	k-s; p-value
1	2	3	4	5	6	7
Скорость саккад при чтении, градус/с						
R	24,9; 6,3	1,5; <0,05	46,0; 12,4	0,4; >0,05	168,0; 10,8	1,2; >0,05
W	21,1; 7,1	0,5; >0,05	28,1; 11,7	0,9; >0,05	154,6; 16,2	1,2; <0,05
NoA	14,4; 8,2	1,9; <0,05	41,4; 15,1	1,3; >0,05	150,3; 24,0	1,4; <0,05
RwP	15,2; 13,5	0,8; >0,05	19,8; 15,4	1,1; <0,05	148,5; 12,1	1,0; <0,05
Амплитуда саккад при чтении, градус						
R	0,4; 0,02	1,4; <0,05	0,8; 0,5	0,7; >0,05	12,4; 1,2	1,4; <0,05
W	0,3; 0,1	1,0; >0,05	0,5; 0,2	0,9; >0,05	11,0; 0,8	1,6; <0,05

Продолжение табл. 2

Continued Table 2

1	2	3	4	5	6	7
NoA	0,2; 0,01	2,4; <0,05	0,7; 0,3	1,2; >0,05	11,0; 3,2	0,6; >0,05
RwP	0,3; 0,2	1,1; >0,05	0,3; 0,2	1,7; <0,05	11,0; 2,2	1,3; <0,05
Длительность фиксации при чтении, мс						
R	683,8; 83,5	2,0; <0,05	992,3; 86,7	4,5; <0,05	672,3; 32,0	2,9; <0,05
W	692,3; 68,2	1,3; <0,05	1106; 117	1,7; <0,05	884,2; 42,7	2,0; <0,05
NoA	508,1; 54,5	1,4; <0,05	615,7; 69,8	4,6; <0,05	523,8; 25,0	2,2; <0,05
RwP	1123; 85	1,1; >0,05	674,1; 62,5	3,0; <0,05	2672,1; 28,0	3,5; <0,05
Диаметр зрачка при фиксациях, мм						
R	4,20; 0,03	2,10; <0,05	4,30; 0,02	1,20; <0,05	4,10; 0,03	2,07; <0,05
W	4,20; 0,03	1,79; <0,05	4,30; 0,03	2,50; <0,05	4,20; 0,03	2,50; <0,05
NoA	4,60; 0,03	1,50; <0,05	4,60; 0,01	4,80; <0,05	4,60; 0,03	1,50; >0,05
RwP	4,70; 0,05	1,20; >0,05	4,80; 0,10	0,80; >0,05	4,70; 0,03	4,10; >0,05

Обозначения групп как в табл. 1; CI – доверительный интервал; k-s – значение критерия Колмогорова-Смирнова, при $p \leq 0,05$ принимается гипотеза о нормальности распределения значений.

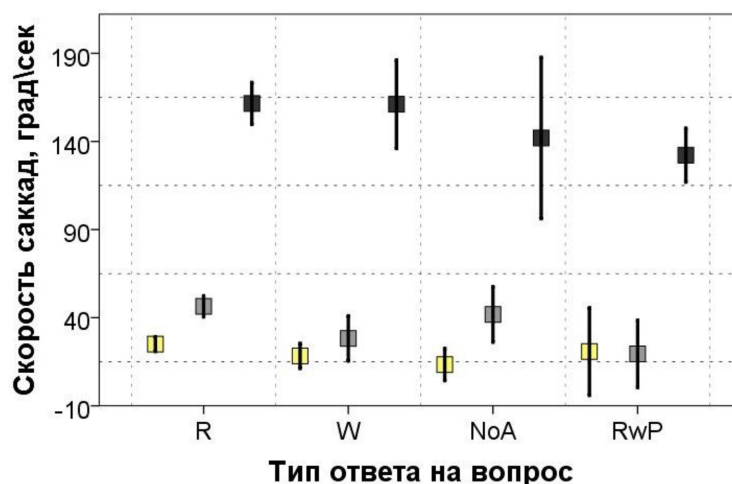


Рис. 3. Среднее значение (медиана) скорости саккад при чтении, столбики ошибок обозначают 95%-ный доверительный интервал: столбики с желтым маркером – фиксации после просаккад, столбики с серым маркером – фиксации после регрессивных саккад, столбики с черным маркером – фиксации после перехода на новую строку; тип ответа на вопрос: правильный ответ (группа R), неправильный ответ (группа W), без ответа (группа NoA), правильный ответ после подсказки (группа RwP)

Fig. 3. Median saccadic velocity during reading, the 95% confidence interval: yellow marker – prosaccades, gray marker – regressive saccades, black marker – interline saccades; type of answer to question: right answer (group R), wrong answer (group W), no answer (group NoA), right only with a prompt (group RwP)

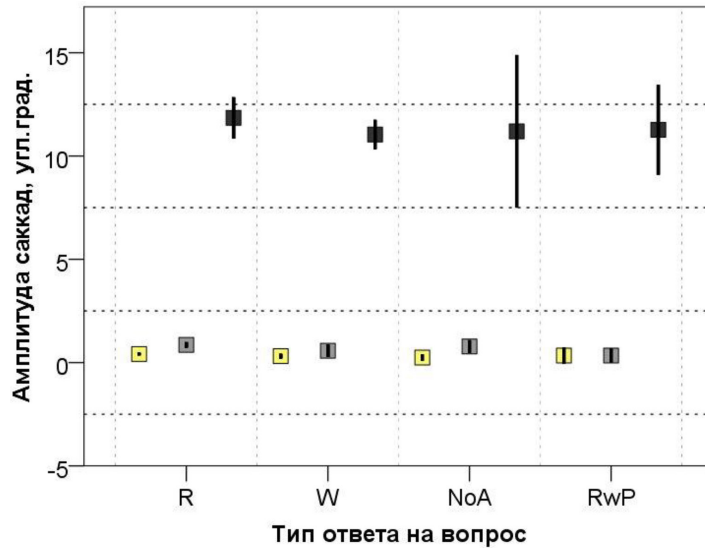


Рис. 4. Средняя (медиана) амплитуда саккад при чтении, столбики ошибок обозначают 95%-ный доверительный интервал: столбики с желтым маркером – фиксации после просаккад, столбики с серым маркером – фиксации после регрессивных саккад, столбики с черным маркером – фиксации после перехода на новую строку; типы ответа на вопрос – см. рис. 3

Fig. 4. Median saccadic amplitude during reading, the 95% confidence interval: yellow marker – prosaccades, gray marker – regressive saccades, black marker – interline saccades; type of answer to question – see Fig. 3

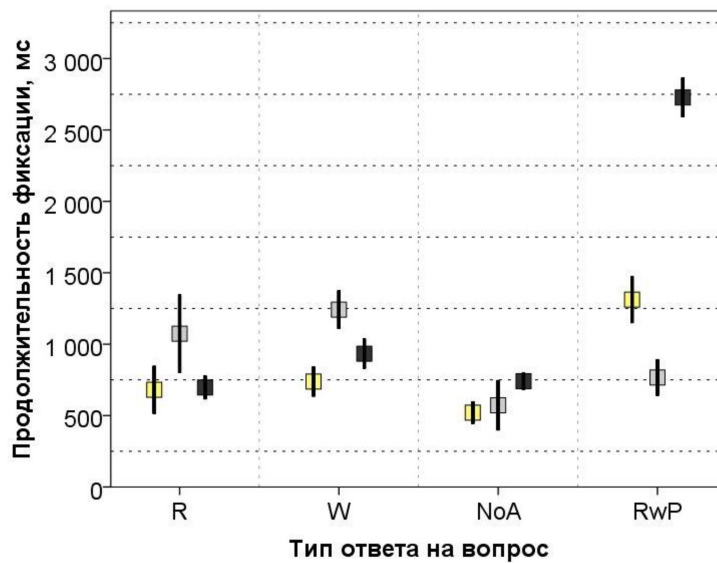


Рис. 5. Средняя (медиана) длительность фиксации на слово, столбики ошибок обозначают 95%-ный доверительный интервал: столбики с желтым маркером – фиксации после просаккад, столбики с серым маркером – фиксации после регрессивных саккад, столбики с черным маркером – фиксации после перехода на новую строку; типы ответа на вопрос – см. рис. 3

Fig. 5. Median fixation duration, the 95% confidence interval: yellow marker – prosaccades, gray marker – regressive saccades, black marker – interline saccades; type of answer to question – see Fig. 3

Таблица 3. Внутригрупповое сравнение окуломоторных параметров

Table 3. Intragroup comparison of oculomotor parameters

		Скорость саккад										
группы	R	reg	int	W	reg	int	NoA	reg	int	RwP	reg	int
	pro	W=43 p<0,01	-	pro	-	-	pro	W=56 p<0,01	-	pro	-	-
	int	-		int	-		int	-		int	-	
		Амплитуда саккад										
группы	R	reg	int	W	reg	int	NoA	reg	int	RwP	reg	int
	pro	W=42 p<0,01	-	pro	-	-	pro	W=56 p<0,01	-	pro	-	-
	int	-		int	-		int	-		int	-	
		Продолжительность фиксации										
группы	R	reg	int	W	reg	int	NoA	reg	int	RwP	reg	int
	pro	-	-	pro	W=75 p<0,01	-	pro	-	-	pro	W=30 p<0,01	-
	int	-		int	W=34 p<0,01		int	-		int	W=99 p<0,01	
		Диаметр зрачка										
группы	R	reg	int	W	reg	int	NoA	reg	int	RwP	reg	int
	pro	W=76 p<0,01	-	pro	-	-	pro	-	-	pro	-	-
	int	W=9 p<0,01		int	-		int	-		int	-	

Обозначения групп – см. табл. 1; pro – просаккады, reg – регрессивные саккады, int – межстрочные саккады; W – значение W-критерия Вилкоксона, p – p-value с поправкой Бонферрони (статистически значимое различие при $p \leq 0,016$), прочерк обозначает отсутствие статистически значимых различий между сравниваемыми параметрами групп.

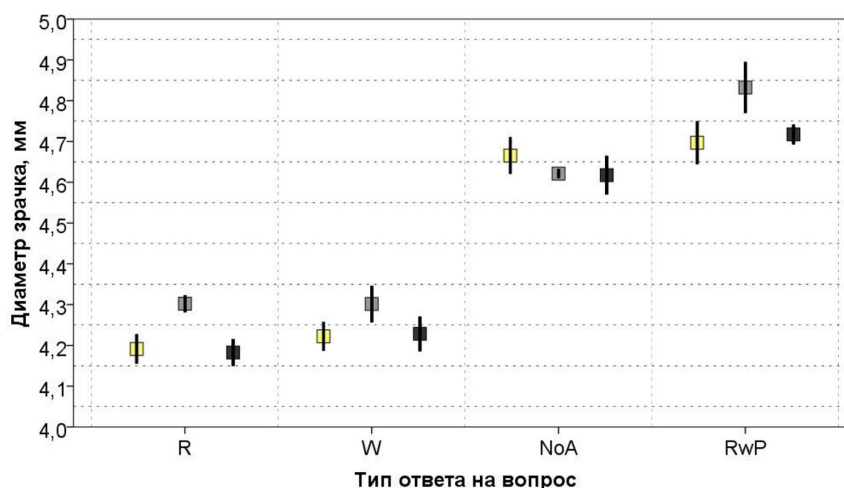


Рис. 6. Среднее значение (медиана) диаметра зрачка во время фиксации при чтении, столбики ошибок обозначают 95%-ный доверительный интервал: столбики с желтым маркером – фиксации после просаккад, столбики с серым маркером – фиксации после регрессивных саккад, столбики с черным маркером – фиксации после перехода на новую строку; типы ответа на вопрос – см. рис. 3

Fig. 6. Mean pupil diameter (median) during fixating, the 95% confidence interval: yellow marker – prosaccades, gray marker – regressive saccades, black marker – interline saccades; type of answer to question – see Fig. 3

Таблица 4. Межгрупповое сравнение окуломоторных параметров

Table 4. Intergroup comparison of oculomotor parameters

группы	Продолжительность фиксации							Диаметр зрачка при фиксации						
	U	z	p	U	z	p	NoA	U	z	p	U	z	p	NoA
	W							R						
Просаккады														
W	-	-	-					-	-	-				
NoA	-	-	-					79	-8,4	<0,01*	99	-9,1	<0,01*	
RwP	21	-5,3	<0,01*	19	-4,9	<0,01*	40	-7	-9,0	<0,01*	100	-9,7	<0,01*	-
Регрессивные саккады														
W	-	-	-					-	-	-				
NoA	29	-5,9	<0,01*	23	-6,7	<0,01*		35	-6,8	<0,01*	119	-9,6	<0,01*	
RwP	6	-2,7	>0,01	17	-5,2	<0,01*	-	10	-8,9	<0,01*	109	-8,5	<0,01*	-
Межстрочные саккады														
W	-	-	-					-	-	-				
NoA	-	-	-					65	-8,5	<0,01*	83	-8,8	<0,01*	
RwP	56	-9,7	<0,01*	112	-10,0	<0,01*	61	-10	-10,1	<0,01*	112	-11,3	<0,01*	-

Обозначения групп – см. табл. 1; U – значение критерия Манна-Уитни, z – стандартизированное значение критерия Манна-Уитни, p – p-value, * – поправка Бонферрони (статистически значимое различие при $p \leq 0,01$), прочерк обозначает отсутствие статистически значимых различий между сравниваемыми параметрами групп.

К основным полученным результатам можно отнести следующее: 1) средняя длительность фиксации после просаккад и перехода на новую строку больше в группе RWP (наводящие вопросы экспериментатора приводят к инсайту), чем в остальных группах; 2) внутри группы W (неправильный ответ на вопрос) средняя длительность фиксации после регрессивных саккад больше, чем после просаккад и перехода на новую строку; 3) внутри групп NoA (нет ответа) и R (правильный ответ) средняя скорость регрессивных саккад выше скорости просаккад; 4) в группах W, NoA и RWP увеличен размах средних значений скорости и амплитуды регрессивных саккад по сравнению с группой R; 5) среднее значение диаметра зрачка при фиксациях выше в группах NoA и RWP в сравнении с группами W и R.

Зарегистрированное в исследовании увеличение диаметра зрачка в NoA и RWP может отражать недостаточность тормозной норадреналинергической стимуляции сфинктера зрачка со стороны голубого пятна (Locus Coeruleus, LC). Известно, что помимо влияния на частоту сердечных сокращений, кровяное давление и состояние бодрствования, активность LC косвенно связана с регуляцией памяти (эпизодической и рабочей) и внимания за счет широкой сети проекций в головном мозге (Mather, Harley, 2016). Также диаметр зрачка может служить относительным показателем уровня тревожности (Keil et al., 2018). В группах NoA и RWP диаметр зрачка выше, чем в группах R и W, из чего можно предположить, что в группах NoA и RWP наблюдается дефицит функций внимания и памяти, базовый или в ответ на когнитивную нагрузку.

Несмотря на то что чтение как сложный процесс зависит от целого ряда когнитивных умений и степени развития высших психических функций, результирующее понимание

текста может определяться дефицитом какой-либо одной (или нескольких) когнитивной функции, наподобие «слабого звена». Так, в группе NoA навык чтения технически развит хорошо, т.е. преобладает беглый тип чтения без ошибок или с 1-2 ошибками, но целостного восприятия текста нет (нет ответа на смысловой вопрос). В литературе такой тип чтения принято называть механическим. Отличительной окуломоторной особенностью данной группы является увеличение размаха средних значений скорости регрессивных саккад, что может коррелировать с качеством трансаккадического запоминания и рабочей памятью. Учитывая прямо пропорциональную связь между скоростью саккад и частотой разрядов пачечных нейронов центра генерации саккад, интегралом от этой частоты и амплитудой саккад (Leigh, Zee, 2015), а также взаимосвязь между амплитудой саккад и объемом рабочей памяти (Luke et al., 2018), можно предположить, что трансаккадическое запоминание в некоторой степени зависит от стабильности скорости саккад. В противном случае трансаккадический перенос информации также становится нестабильным. Тогда увеличение размаха значений скорости и амплитуды регрессивных саккад во всех группах кроме R можно рассматривать как признак относительной или минимальной дисрегуляции стволовых центров генерации саккад. Дисрегуляция между стволовыми центрами генерации саккад, нейрональными интеграторами и мозжечком может отражаться в увеличении размаха значений окуломоторных параметров (Sparks, 2002; Soetedjo et al., 2002; Voogd et al., 2012; Di Stasi et al., 2013; Leigh, Zee, 2015).

У школьников группы W имеется целостное, но неверное восприятие текста. С точки зрения теории лексической неоднозначности перед переходом к следующему

слову ученик должен сделать выбор относительно значения текущего слова, но у школьников группы W выбор оказывается ошибочным, что сказывается на общем понимании смысла текста. Если наилучшее зрительное восприятие при чтении (интеграция фовеальной и парафовеальной информации) требует терминирования (завершения) саккад в оптимальном для фиксации месте, то неточность программирования амплитуды саккад и, как следствие, увеличение доли дисметричных саккад (слишком большая или маленькая амплитуда саккад) ведут к увеличению времени фиксаций (Lopez-Perez et al., 2016). Вместе с тем известно, что фиксации после регрессивных саккад в большей степени способствуют разрешению контекстной неясности, чем лексической идентификации слова (Schotter et al., 2019). Исходя из этого, можно предположить, что увеличение длительности фиксации после регрессивных саккад в группе W в большей степени обусловлено недостаточно эффективной стратегией анализа информации или дефицитом антиципации (способность предвосхищать содержание текста), нежели состоянием функций памяти и/или внимания.

Дополняя вышеизложенное, следует упомянуть, что параметры движений глаз обладают высокой чувствительностью к самому широкому спектру экзо- и эндогенных факторов (Leigh, Zee, 2015; Vinuela-Navarro et al., 2017). Например, на продолжительность фиксаций может влиять наличие интроспекции во время чтения (Reichle et al., 2010), чтение

вслух (Vorstius et al., 2014). На окулоmotorную активность может повлиять изменение фоновой активности дефолтной системы, лежащей в основе работы других функциональных систем (Raichle, 2015). Кроме когнитивных факторов на окулоmotorную активность при чтении в любом возрасте могут влиять факторы, тем или иным образом изменяющие общий тонус нервной ткани, например степень утомления, уровень кровоснабжения головного мозга и другие влияния со стороны вегетативной нервной системы.

Заключение

Для четырех групп учеников 7-8 лет с разным уровнем сформированности когнитивного компонента чтения определены особенности саккадической окулоmotorной активности. Результаты данного исследования дают возможность более точной характеристики когнитивных функций при чтении. Полученные результаты могут оказаться полезными для оптимизации обучения чтению, внести вклад в фундаментальное понимание обеспечения когнитивных процессов головным мозгом. В заключение стоит отметить, что при дальнейшей работе по данной теме планируется увеличение размера выборки в группах NoA и RwP и привлечение метода ЭЭГ для уточнения различий функционирования нейрофизиологических систем между группами школьников с разным уровнем понимания читаемого.

Благодарности / Acknowledgments

Наш коллектив желает выразить свою благодарность Школе будущего и гимназии № 32 города Калининграда за помощь в наборе участников для исследования.

The authors are grateful to School of Future and School No. 32 in Kaliningrad for their assistance in selecting research participants.

Список литературы / References

- Безруких М.М., Иванов В.В. (2015) Окуломоторная активность при чтении у детей с разной степенью сформированностью навыка (Сообщение 2. Особенности окуломоторной активности у хорошо и плохо читающих детей 9-10 лет). *Новые исследования*, 43(2): 4-12 [Bezrukikh M.M., Ivanov V.V. (2015) Reading oculomotor activity in children with different reading skills (Message 2: peculiarities of oculomotor activity in 9-10-year-old children with good and poor reading skills). *New Research* [Novye issledovaniya], 43(2): 4-12]
- Гарипова А.Б. (2018) Айттрекинг в методике обучения чтению на английском языке. *Казанский лингвистический журнал*, 1(2): 86-94 [Garipova A.B. (2018) Eye-tracking in teaching methods of reading in English. *Kazan Linguistic Journal* [Kazanskii lingvisticheskii zhurnal], 1(2): 86-94 (in Russian)]
- Дубасова А.В. (2010) Движения глаз во время чтения: от общих теорий к частным. URL: <https://www.academia.edu/3074458> [Dubasova A.V. (2010) Eye movements during reading: from general to specific theories. URL: <https://www.academia.edu/3074458> (in Russian)]
- Иванов В.В., Демидов А.А., Безруких М.М. (2010) Окуломоторная активность при чтении у детей с разной степенью сформированности навыка чтения. *Экспериментальная психология в России*, с. 611-616 [Ivanov V.V., Demidov A.A., Bezrukikh M.M. (2010) Oculomotor activity while reading in children with different reading skills. *Experimental psychology in Russia*, p. 611-616 (in Russian)]
- Aminihajibashi S., Hagen T., Foldal M.D., Laeng B., Espeseth T. (2019) Individual differences in resting-state pupil size: Evidence for association between working memory capacity and pupil size variability. *International Journal of Psychophysiology*, 140: 1-7
- Bezrukikh M.M., Ivanov V.V. (2013) Eye movements in the process of reading as an indicator of development of reading skill. *Human Physiology*, 39: 68-77
- Clifton C., Ferreira F., Henderson J.M., Inhoff A.W., Liversedge S.P., Reichle E.D., Schotter E.R. (2016) Eye movements in reading and information processing: Keith Rayner's 40-year legacy. *Journal of Memory and Language*, 86: 1 – 19
- Di Stasi L., Catena A., Canas J., Macknik S., Martinez-Conde S. (2013) Saccadic velocity as an arousal index in naturalistic task. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(5): 968-975
- Eckstein M.K., Guerra-Carrillo B., Singley A.T.M., Bunge S.A. (2017) Beyond eye gaze: What else can eyetracking reveal about cognition and cognitive development. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 25: 69-91
- Edwards G., VanRullen R., Cavanagh P. (2018) Decoding trans-saccadic memory. *Journal of Neuroscience*, 38(5): 1114-1123
- Foster T.E., Ardoin S.P., Binder K.S. (2018) Reliability and validity of eye movement measures of children's reading. *Reading Research Quarterly*, 53(1): 71-89
- Frey A., Ionescu G., Lemaire B., López-Orozco F., Baccino T., Guérin-Dugué A. (2013) Decision-making in information seeking on texts: an eye-fixation-related potentials investigation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7: 39
- Hakim N., Adam K.C.S., Gunseli E., Awh E., Vogel E.K. (2019) Dissecting the neural focus of attention reveals distinct processes for spatial attention and object-based storage in visual working memory. *Psychological Science*, 30(4): 526-540

- Hutton S.B. (2008) Cognitive control of saccadic eye movements. *Brain and Cognition*, 68(3): 327-340
- Irwin D.E., Thomas L.E. (2007) The effect of saccades on number processing. *Perception & Psychophysics*, 69(3): 450 – 458
- Keil V., Hepach R., Vierrath S., Caffier D., Tuschen-Caffier B., Klein C., Schmitz J. (2018) Children with social anxiety disorder show blunted pupillary reactivity and altered eye contact processing in response to emotional faces: Insights from pupillometry and eye movements. *Journal of Anxiety Disorders*, 58: 61-69
- Kustov A.A., Robinson D.L. (1996) Shared neural control of attentional shifts and eye movements. *Nature*, 384(6604): 74-77
- Leigh R.J., Zee D.S. (2015) *The neurology of eye movements*. Oxford University Press
- Lopez-Perez P.J., Dampure J., Hernández-Cabrera J.A., Barber H.A. (2016) Semantic parafoveal-on-foveal effects and preview benefits in reading: Evidence from Fixation Related Potentials. *Brain and Language*, 162: 29 – 34
- Luke S.G., Darowski E.S., Gale S.D. (2018) Predicting eye-movement characteristics across multiple tasks from working memory and executive control. *Memory & Cognition*, 46(5): 826-839
- Mäki-Marttunen V., Hagen T., Espeseth T. (2019) Task context load induces reactive cognitive control: An fMRI study on cortical and brain stem activity. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 19(4): 945–965
- Mather M., Harley C.W. (2016) The locus coeruleus: Essential for maintaining cognitive function and the aging brain. *Trends in Cognitive Sciences*, 20(3): 214-226
- Optican L.M., Pretegianni E. (2017) What stops a saccade? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1718): 20160194
- Raichle M.E. (2015) The brain's default mode network. *Annual Review of Neuroscience*, Vol. 38, p. 433-447
- Reichle E.D., Reineberg A.E., Schooler J.W. (2010) Eye movements during mindless reading. *Psychological Science*, 21(9): 1300-1310
- Rayner K., Reingold E.M. (2015) Evidence for direct cognitive control of fixation durations during reading. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 1: 107 – 112
- Rodrigues A.P., Rebola J., Pereira M., van Asselen M., Castelo-Branco M. (2019) Neural responses of the anterior ventral occipitotemporal cortex in developmental dyslexia: beyond the visual word form area. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60(4): 1063-1068
- Rucci M., Poletti M. (2015) Control and functions of fixational eye movements. *Annual Review of Vision Science*, 1: 499-518
- Schmahmann J.D., Guell X., Stoodley C.J., Halko M.A. (2019) The theory and neuroscience of cerebellar cognition. *Annual Review of Neuroscience*, 42: 337-364
- Schneegans S., Spencer J.P., Schöner G., Hwang S., Hollingworth A. (2014) Dynamic interactions between visual working memory and saccade target selection. *Journal of Vision*, 14(11): 9
- Schotter E.R., Li C., Gollan T.H. (2019) What reading aloud reveals about speaking: Regressive saccades implicate a failure to monitor, not inattention, in the prevalence of intrusion errors on function words. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 72(8): 2032-2045
- Seassau M., Bucci M.P. (2013) Reading and visual search: a developmental study in normal children. *PLoS One*, 8(7): e70261

- Sharp D.J., Scott S.K., Wise R.J.S. (2004) Monitoring and the controlled processing of meaning: distinct prefrontal systems. *Cerebral Cortex*, 14(1): 1 – 10
- Smadja U., Grusky M., Artzi Y., Naaman M. (2019) Understanding reader backtracking behavior in online news articles. *The Web Conference 2019 – Proceedings of the World Wide Web Conference, WWW 2019*. p. 3237-3243
- Soetedjo R., Kaneko C.R.S., Fuchs A.F. (2002) Evidence that the superior colliculus participates in the feedback control of saccadic eye movements. *Journal of Neurophysiology*, 87(2): 679 – 695
- Sparks D. (2002) The brainstem control of saccadic eye movements. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(12): 952 – 964
- Steindorf L., Rummel J. (2020) Do your eyes give you away? A validation study of eye-movement measures used as indicators for mindless reading. *Behavior Research Methods*, 52(1): 162-176
- Stewart E.E.M., Schütz A.C. (2018) Attention modulates trans-saccadic integration. *Vision Research*, 142: 1-10
- Vinuela-Navarro V., Erichsen J.T., Williams C., Woodhouse J.M. (2017) Saccades and fixations in children with delayed reading skills. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 37(4): 531-541
- Voogd J., Schraa-Tam C.K.L., van der Geest J.N., De Zeeuw C.I. (2012) Visuomotor cerebellum in human and nonhuman primates. *Cerebellum*, 11(2): 392-410
- Vorstius C., Radach R., Lonigan C.J. (2014) Eye movements in developing readers: A comparison of silent and oral sentence reading. *Visual Cognition*, 22(3-4): 458-485
- Yeh Y.C., Tsai J.L., Hsu W.C., Lin C.F. (2014) A model of how working memory capacity influences insight problem solving in situations with multiple visual representations: An eye tracking analysis. *Thinking Skills and Creativity*, 13: 153-167
- Zhao M., Gersch T.M., Schnitzer B.S., Doshier B.A., Kowler E. (2012) Eye movements and attention: The role of pre-saccadic shifts of attention in perception, memory and the control of saccades. *Vision Research*, 74: 40-60

DOI 10.17516/1997-1389-0329

УДК 597-169:595.12

The Contribution of Perch (*Perca fluviatilis* L. 1758) to Maintaining the Diphyllbothriasis Focus in the Krasnoyarsk Reservoir and the Yenisei River

Julia K. Chugunova^{*a},

Tatyana Yu. Ronzhina^b and Alexey A. Syromyatnikov^c

*^aResearch Institute for Ecology of Fishery Waterbodies
Krasnoyarsk, Russian Federation*

*^bV.M. Krutovsky Krasnoyarsk Specialized Medical College
Krasnoyarsk, Russian Federation*

*^cV.P. Astafyev Krasnoyarsk State Pedagogical University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 05.12.2018, received in revised form 16.04.2019, accepted 05.06.2019

Abstract. The study investigates infection rates of perch by plerocercoids of the *Dibothriocephalus latus* (Linnaeus, 1758) Lühe, 1899 (syn. *Diphyllbothrium latum*) broad tapeworm in the creeks of the Krasnoyarsk Water Reservoir and in the Yenisei River (within the limits of the city of Krasnoyarsk). Plerocercoids were found in the perch in all study areas. The rates of invasion of the fish in the Yenisei River and in the creeks of the lower part of the Reservoir – Biryusa and Shumikha – were low (9.8, 6.9, and 13.5%, respectively); the infection of perch was higher in the middle part of the Reservoir, in the Sisim Creek (21.4%). The fish purchased at an unauthorized market was the most infected – 68.5%. The sample included large fish, weighing from 70 to 970 g. A positive correlation was noted between invasion rate and fish age ($r=0.7$). The plerocercoids found in the fish were viable. They were mainly localized in the fish muscle. Diphyllbothriosis is a commonly occurring helminthiasis in the riverine communities transformed because of the damming of rivers. In the Krasnoyarsk Water Reservoir, the broad tapeworms are usually transmitted along the plankton – perch – pike chain. The data obtained in this study show that small perch, consuming infected plankton, plays a leading role in maintaining the abundance of *D. latus* in the water reservoir. However, the main contribution to the epidemiological situation in the region is made by the large perch, which is heavily infected with broad tapeworm plerocercoids because of its cannibalistic feeding behavior. Both recreational fishermen and the people purchasing fish at unauthorized markets prefer large perch. Commercial and recreational fishing,

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: jhermann@mail.ru

ORCID: 0000-0001-6925-5851 (Chugunova J.)

settlements on the shores of the Reservoir, and the increasing number of tourists have contributed to the invasion of pathogenic organisms in the Reservoir. The perch caught in the Krasnoyarsk Water Reservoir or in the Yenisei River or purchased at unauthorized markets, which have not been inspected for disease, could be a source of diphyllbothriosis infection for people.

Keywords: perch, plerocercoids, *Dibothriocephalus latus*, diphyllbothriosis, infection rate.

Citation: Chugunova J.K., Ronzhina T.Yu., Syromyatnikov A.A. The contribution of perch (*Perca fluviatilis* L. 1758) to maintaining the diphyllbothriosis focus in the Krasnoyarsk Reservoir and the Yenisei River. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(3), 297-309. DOI: 10.17516/1997-1389-0329

Роль окуня (*Perca fluviatilis* L. 1758) в поддержании очага дифиллоботриоза в Красноярском водохранилище и р. Енисей

Ю.К. Чугунова^а,

Т.Ю. Ронжина^б, А.А. Сыромятников^в

^а*Научно-исследовательский институт экологии
рыбохозяйственных водоемов*

Российская Федерация, Красноярск

^б*Красноярский базовый медицинский колледж
им. В.М. Крутовского*

Российская Федерация, Красноярск

^в*Красноярский государственный педагогический университет
им. В.П. Астафьева*

Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. Исследована зараженность окуня плероцеркоидами широкого лентеца *Dibothriocephalus latus* (Linnaeus, 1758) Lühe, 1899 (syn. *Diphyllbothrium latum*) в заливах Красноярского водохранилища и в р. Енисей (в черте г. Красноярска). Плероцеркоиды были обнаружены у окуня на всех исследованных участках. Низкий процент инвазии отмечен у рыб в р. Енисей – 9,8 % и в заливах нижней части водохранилища: Бирюса (6,9 %) и Шумиха (13,5 %), зараженность окуня выше в средней части: залив Сисим (21,4 %). Рыба, приобретенная на несанкционированном рынке г. Красноярска, оказалась наиболее зараженной – 68,5 % (в выборке присутствовали крупные особи, массой от 70 до 970 г). Отмечена положительная корреляция интенсивности инвазии с возрастом рыб. Обнаруженные плероцеркоиды были жизнеспособны. Основная локализация плероцеркоидов – мускулатура рыб. Дифиллоботриоз является распространенным гельминтозом в условиях трансформации речных сообществ при зарегулировании стока. В Красноярском водохранилище основной путь циркуляции широкого лентеца проходит в цепи: планктон – окунь – щука. Полученные данные показали, что мелкий окунь, потребляя зараженный планктон, играет ведущую роль в поддержании численности

D. latus в водохранилище. Однако эпидемиологическая обстановка в регионе связана с крупным окунем, высокая зараженность которого плероцеркоидами широкого лентеца объясняется типом его питания (каннибализм). Крупный окунь – предпочитаемый пищевой продукт как для рыбаков-любителей, так и для населения, приобретающего рыбу на несанкционированных рынках. Промышленное и любительское рыболовство, населенные пункты на берегах водохранилища, а также увеличивающийся туристический поток способствуют поступлению в водоем инвазионного начала. Окунь, выловленный в Красноярском водохранилище или р. Енисей, а также приобретенный в местах несанкционированной торговли и не прошедший ветеринарно-санитарную экспертизу, может быть источником заражения человека дифиллоботриозом.

Ключевые слова: окунь, плероцеркоид, *Dibothriocephalus latus*, дифиллоботриоз, зараженность.

Цитирование: Чугунова, Ю.К. Роль окуня (*Perca fluviatilis* L. 1758) в поддержании очага дифиллоботриоза в Красноярском водохранилище и р. Енисей / Ю.К. Чугунова, Т.Ю. Ронжина, А.А. Сыромятников // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(3). С. 297-309. DOI: 10.17516/1997-1389-0329

Введение

Дифиллоботриоз на территории Красноярского края по-прежнему остается важной медико-социальной проблемой и, несмотря на некоторую тенденцию к снижению заболеваемости населения, занимает третье место в статистике гельминтозов, его доля составляет 11,1 % (показатель заболеваемости в 2017 г. – 33,3 на 100 тысяч населения).

Проблеме дифиллоботриоза посвящено много работ в отечественной и зарубежной литературе, особое внимание в последнее время уделяется популяционно-генетическим исследованиям (Bazsalovicsová at al., 2018). К сожалению, в Красноярском крае систематического изучения зараженности рыб плероцеркоидами дифиллоботриид и возможных путей инвазии человека не проводится.

У рыб в этом регионе встречаются три вида личинок дифиллоботриид (Герман, Вышегородцев, 2004), два из которых – лентец широкий *Dibothriocephalus latus* (Linnaeus, 1758) Lühe, 1899 (syn. *Diphyllobothrium latum*) и лентец чаечный *Dibothriocephalus dendriticus* (Nitzsch, 1824) Lühe, 1899 (syn.

Diphyllobothrium dendriticum) – представляют опасность в эпидемиологическом отношении. Рыбы, вторые промежуточные хозяева обоих видов лентецов, неравномерно распространены в водоемах края, и их роль в питании человека также различна. В центральных и южных районах Красноярского края, где созданы крупнейшие водохранилища: Саяно-Шушенское, Красноярское и Богучанское, основу промысла составляют окунь и щука (вторые промежуточные хозяева лентеца широкого), тогда как в северных районах, в бассейнах Енисея, Хатанги, Пясины, озер п-ова Таймыр, преимущество в промысле сохраняется за сиговыми видами рыб (вторые промежуточные хозяева лентеца чаечного).

В первых работах по дифиллоботриозу в Красноярском крае указано, что в бассейне р. Енисей дифиллоботриоз человека вызывает лентец широкий, окончательными хозяевами также могут быть собака и лисица (Козминская, 1964). На севере Красноярского края (п-ов Таймыр, бассейн р. Хатанги) возбудителями дифиллоботриозов являются широкий и

чаечный лентецы (Клебановский и др., 1977; Делямуре и др., 1985).

В 2017 г., по материалам Управления Роспотребнадзора по Красноярскому краю, зарегистрировано 955 случаев дифиллоботриоза, из них 61,2 % случаев заболевания связаны с употреблением рыбы из Красноярского водохранилища, 30,5 % – выловленной в р. Енисей, его притоках и озерах Таймыра, 4,8 % – за пределами Красноярского края. Известно, что основной путь заражения человека – употребление рыбы, выловленной самостоятельно, в меньшей степени – приобретенной у частных лиц в местах несанкционированной торговли (О состоянии санитарно-эпидемиологического..., 2018).

В качестве объекта паразитологического исследования был выбран окунь – массовый вид в Красноярском водохранилище и объект

любительского и спортивного рыболовства в ряде водных объектов края.

Цель настоящей работы – изучение зараженности окуня плероцеркоидами лентеца широкого в заливах Красноярского водохранилища и на участке р. Енисей, имеющих рыбохозяйственное и рекреационное значение, а также оценка качества и безопасности рыбной продукции, поступающей в продажу в местах несанкционированной торговли.

Материалы и методы

Материал был собран в ноябре-марте 2016-2017 гг. в р. Енисей (в черте г. Красноярска, р-н пос. Удачный) и на Красноярском водохранилище: зал. Шумиха и Бирюса (нижняя часть) и Сисим (средняя часть водохранилища) (рис. 1). Отлов рыбы в р. Енисей проводили крючковыми орудиями лова (спиннинг),

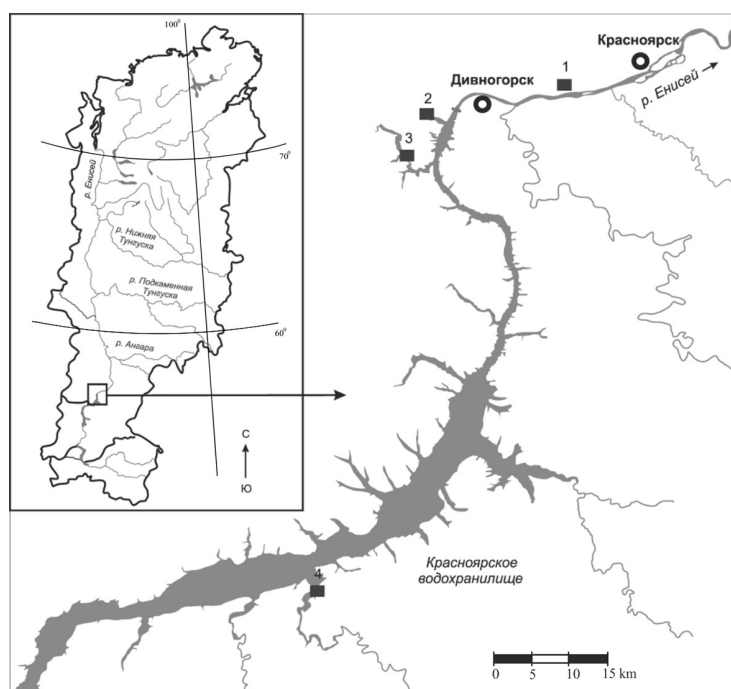


Рис. 1. Карта-схема района исследований: ■ – место отбора проб: 1 – р. Енисей, 2 – зал. Шумиха, 3 – зал. Бирюса, 4 – зал. Сисим

Fig. 1. Diagrammatic map of the study area: ■ – sampling positions: 1 – Yenisei River, 2 – Shumikha bay, 3 – Biryusa bay, 4 – Sisim bay

в водохранилище – ставными жаберными сетями с размером ячеи 18-35 мм.

Места отбора проб различаются между собой по гидрологическим, гидробиологическим параметрам, а также уровнем антропогенной нагрузки, но все они являются местами любительского рыболовства и отдыха населения Красноярского края.

Дополнительно для определения безопасности рыбной продукции в ветеринарно-санитарном отношении на стихийном рынке г. Красноярска у частного лица было приобретено 35 свежемороженых окуней общим весом 10,2 кг. Место вылова рыбы неизвестно (предположительно из Красноярского водохранилища), ветеринарные документы на продукцию отсутствовали.

Всего методом специального паразитологического вскрытия (просмотрена мускулатура, стенка желудка, жировая ткань и гонады) (Быховская-Павловская, 1985) исследовано 222 экз. окуня (табл. 1). Жизнеспособность плероцеркоидов из замороженной рыбы определяли по морфологическим признакам личинок и наличию у них двигательной активности в соответствии с МУК 3.2.988-00. Для этого личинок помещали в чашку Петри с подогретым до 38 °С

физиологическим раствором и стимулировали движение путем физического раздражения, уколов личинку препаровальной иглой (МУК 3.2.988-00, 2000).

Для количественной характеристики зараженности рыб использовали следующие показатели (Беклемишев, 1961; Пронин и др., 1991):

экстенсивность инвазии (E , %):

$$E = (N_i \times 100) / N,$$

где N_i – количество зараженных рыб, N – количество исследованных рыб;

средняя интенсивность (I) инвазии (количество экз. на одну зараженную рыбу):

$$I = \sum n / N_i,$$

где $\sum n$ – сумма паразитов, обнаруженных в зараженной рыбе;

лимиты интенсивности (минимальная–максимальная);

индекс обилия (M) или относительная плотность (количество экз. на одну исследованную рыбу):

$$M = \sum n / N.$$

Таблица 1. Количество исследованных рыб и характеристика биологических показателей окуня по участкам, 2016-2017 гг.

Table 1. The number of fish examined and characterization of the biological parameters of perch at different sites, 2016-2017

Район исследований	Число вскрытых рыб, экз.	Возраст, лет	Длина (АВ), мм	Масса, г
р. Енисей	51	1+ – 4+	120-231 (153,9±3,4)	13,5-156 (42,5±3,4)
Зал. Шумиха	37	2+ – 5+	123-247 (157,9±4,2)	18-199 (46,2±5,3)
Зал. Бирюса	43	1+ – 5+	123-214 (173,2±3,3)	20-135 (56,9±3,6)
Зал. Сисим	56	2+ – 6+	160-270 (198,9±3,6)	38-297 (96,2±6,7)
Неизвестен	35	4+ – 8+	176-380 (255,6±9,9)	69-970 (294,1±43,1)

Примечание: длина тела (АВ) абсолютная, от начала рыла до конца хвостового плавника.

Проверка гипотезы о соответствии полученных данных по численности плероцеркоидов *D. latus* негативному биномиальному распределению выполнена с использованием программ Quantitative Parasitology 3.0 (Rozsa et al., 2000) и Statgraphics. Оценка однородности выборок распределений (отсутствие/присутствие статистически значимых различий), полученных при изучении различных популяций окуня, проводилась с применением критерия Колмогорова–Смирнова (D) в пакете Statgraphics.

Фотографии выполнены с помощью фотокамеры Canon PowerShot D 10 (фрагмент стробилы гельминта и плероцеркоид в мускулатуре окуня) и цифровой камеры (видеоокуляр) для микроскопа TopCam 14 MP при увеличении 2x10 микроскопа Микромед MC-2 ZOOM var. 2 CR.

В свете последних исследований систематическое положение широкого лентеца было пересмотрено. Полифилетический род *Diphyllobothrium* разделен на род *Dibothriocephalus* с типовым видом *Dibothriocephalus latus* (Linnaeus, 1758) Lühe, 1899 (ранее известный как *Diphyllobothrium latum*) и род *Diphyllobothrium*, виды которого паразитируют у китообразных (Waeschenbach et al., 2017). В настоящей

работе используется современное название цестоды – *D. latus*.

Результаты

Плероцеркоиды *D. latus* обнаружены у окуня на всех участках сбора материала, минимальная зараженность у рыб р. Енисей – 9,8 % (табл. 2). В исследуемых заливах Красноярского водохранилища экстенсивность инвазии рыб выше, чем в реке, – 14,7 %, при этом самая низкая, 6,9 %, отмечена у окуня в зал. Бирюса. В средней части водохранилища (зал. Сисим) зараженность рыб существенно выше, чем в низовье, и составляет 21,4 %. Средняя интенсивность инвазии рыб плероцеркоидами лентеца низкая как в водохранилище, так и в р. Енисей, варьирует от 1,7 до 2,2 экз/зараженную рыбу соответственно. При сходных показателях инвазии (экстенсивность и индекс обилия) распределения численности плероцеркоидов в исследованных выборках окуня из водохранилища и р. Енисей достоверно отличались, тест Колмогорова–Смирнова $DN = 0,90$ ($p < 0,05$).

Окунь, приобретенный на стихийном рынке, оказался самым зараженным – 68,5 %, индекс обилия – 1,9 экз/исследованную особь хозяина (табл. 2). Все обнаруженные гельминты (за исключением 2 экз.) были живые.

Таблица 2. Зараженность окуня плероцеркоидами *Dibothriocephalus latus*, 2016-2017 гг.

Table 2. Infestation of perch with *Dibothriocephalus latus* plerocercoids, 2016-2017

Район исследований	<i>E</i> , %	<i>I</i> , экз. (lim.)	<i>M</i> , экз.
р. Енисей	9,8	2,2 (1-4)	0,2
Красноярское водохранилище (в целом по заливам)	14,7	1,7 (1-3)	0,2
Зал. Шумиха	13,5	1,2 (1-2)	0,2
Зал. Бирюса	6,9	1,3 (1-2)	0,09
Зал. Сисим	21,4	1,5 (1-3)	0,3
Неизвестен	68,5	2,8 (1-7)	1,9

Примечание: *E* – экстенсивность инвазии, *I* – интенсивность инвазии, *M* – индекс обилия.

У отдельных рыб количество личинок колебалось от 1 до 7, преимущественная локализация – мускулатура (84 %), единично плероцеркоиды встречались в жировой ткани, икре и стенке желудка. Отмечена положительная корреляция ($r=0,7$) средней интенсивности инвазии плероцеркоидами с возрастом рыб.

Обсуждение результатов

Лентец широкий имеет сложный цикл развития, включающий двух промежуточных и окончательного хозяев. Половой зрелости

этот гельминт достигает в тонком отделе кишечника человека (рис. 2) и различных плотоядных (кошки, собаки, медведя, лисицы и др.). В организме человека продолжительность жизни лентеца может достигать 20 лет (Бауер, 1958; Чебышев и др., 2004; Scholz et al., 2009). Взрослые особи широкого лентеца выделяют яйца, из которых при попадании их в воду вылупляются личинки (корацидии). Первым промежуточным хозяином цестоды являются преимущественно массовые представители планктона – веслоногие рачки

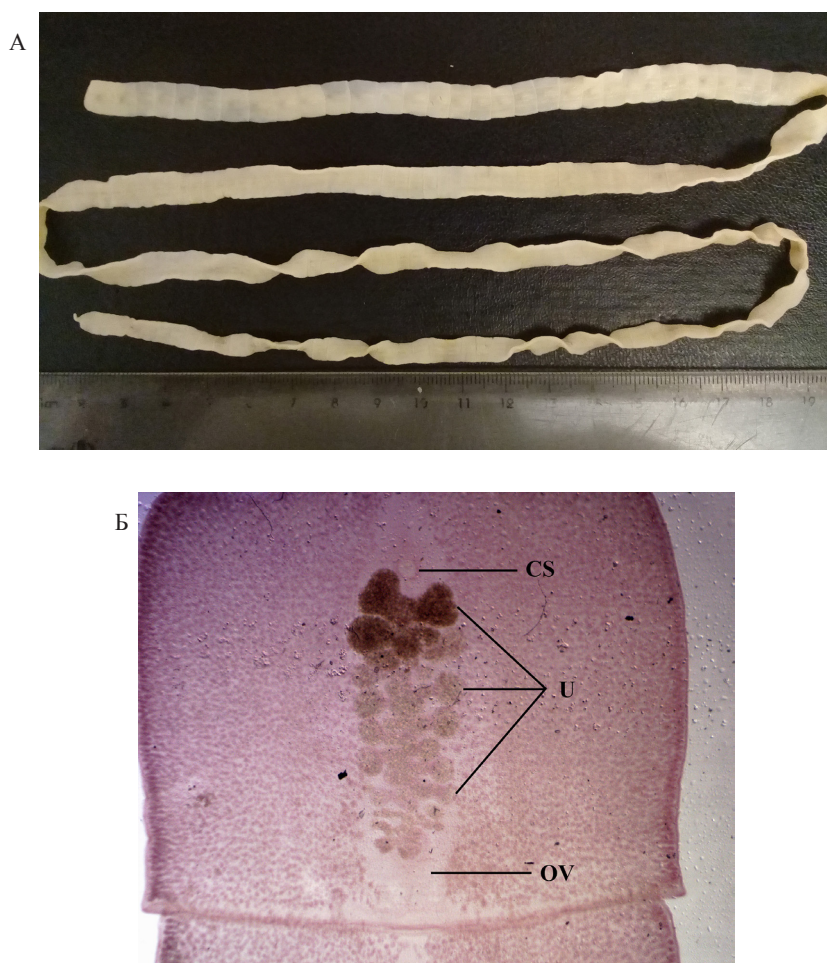


Рис. 2. А – фрагмент стробилы лентеца широкого (*D. latus*) из человека; Б – гермафродитный членик лентеца широкого (*D. latus*). CS – Cirrus Sac (сумка цирруса), U – Uterus (матка), OV – Ovary (яичник)

Fig. 2. A – A fragment of a tapeworm strobilus (*D. latus*) from the human. B – Hermaphroditic segment of a tapeworm (*D. latus*). CS – Cirrus Sac, U – Uterus, OV – Ovary

Сорепода, в полости тела которых после проглатывания корацидия развивается личиночная стадия – процеркоид. Следующий этап цикла развития личиночной фазы паразита начинается после поедания зараженных рачков рыбами, у которых формируются инвазионные плероцеркоиды (Гинецинская, 1958; Scholz et al., 2009). Личинки могут находиться в различных органах и тканях рыбы, согласно нашим исследованиям, преимущественно в мускулатуре, единично – в жировой ткани, икре и стенке желудка. Зараженная плероцеркоидами планктоноядная молодь рыб, преимущественно семейства окуневых, обеспечивает длительное существование инвазионного начала в водоеме. При этом для увеличения устойчивости и расширения очага заражения плероцеркоиды широкого лентеца эволюционно выработали способность сохранять инвазионность при поедании зараженных рыб хищниками, в число которых входят крупный окунь, щука, налим.

До зарегулирования реки и создания водохранилища в верховьях Енисея широкий лентец не встречался (Артамошин, Павленко, 1972; Плющева и др., 1989; Плющева, Герасимов, 1995), в низовьях он был зарегистрирован как очень редкий паразит рыб (Бауер, 1948). Гидрологические особенности реки, а именно высокие скорости течения на уровне горного потока, ограничивали развитие планктона – необходимого звена в развитии паразита. Доминирующей группой речного зоопланктона являлись коловратки, копеподы (первый промежуточный хозяин широкого лентеца) были малочисленными (Грезе, 1957).

В 1984 г. (по прошествии 14 лет после наполнения водоема) зараженность окуня плероцеркоидами в отдельных заливах составляла 11,4-17,5 % (Романенко и др., 1986; Плющева и др., 1989), к 2004 г. она возросла до 44,0 %, (Вышегородцев и др., 2005), в 2008-

2010 гг. (после 40-летнего существования водоема) колебалась от 31,5 до 52,2 % (Чугунова, Вышегородцев, 2009; Чугунова, 2018). Аналогичная ситуация по дифиллоботриозу наблюдалась при создании ряда других водохранилищ (Рыбинского, Горьковского, Куйбышевского и др.), где на 3-4-й год существования водоема отмечался рост инвазии рыб цестодами (Изюмова, 1956; Изюмова, 1977; Романов, 1960).

Увеличение зараженности окуня Красноярского водохранилища с момента зарегулирования водоема обусловлено, прежде всего, ухудшением пищевой обеспеченности рыб. Значительная сработка уровня водохранилища – до 19 м (Вышегородцев и др., 2005), уменьшение выноса биогенов из затопленных почв и разлагающейся растительности, замещение продуктивных грунтов наносами с малым содержанием органических веществ определяют невысокую биомассу и численность бентосных организмов. С другой стороны, последовавшее после зарегулирования водоема эвтрофирование повлекло за собой развитие зоопланктона. Окунь – эврифаг, у которого в условиях нехватки бентоса произошла смена пищевой специализации и он вынужденно перешел на питание зоопланктоном. Причем это касается как молоди, так и взрослых рыб (3+ – 5+ лет).

Крупный окунь преимущественно хищник, поедая молодь ерша и собственную молодь, заражается диботрицефалюсом посредством реинвазии, что способствует циркуляции дифиллоботриоза (рис. 3). Высокая зараженность окуня ($E = 68,5 \%$, $I = 2,8$ экз.), купленного на стихийном рынке, очевидно, обусловлена тем, что исследованная выборка представлена крупными рыбами в возрасте 4+–8+ лет, 60 % из них шести- и семилетки длиной от 20 см и массой более 300 г. Наличие живых и активных личинок

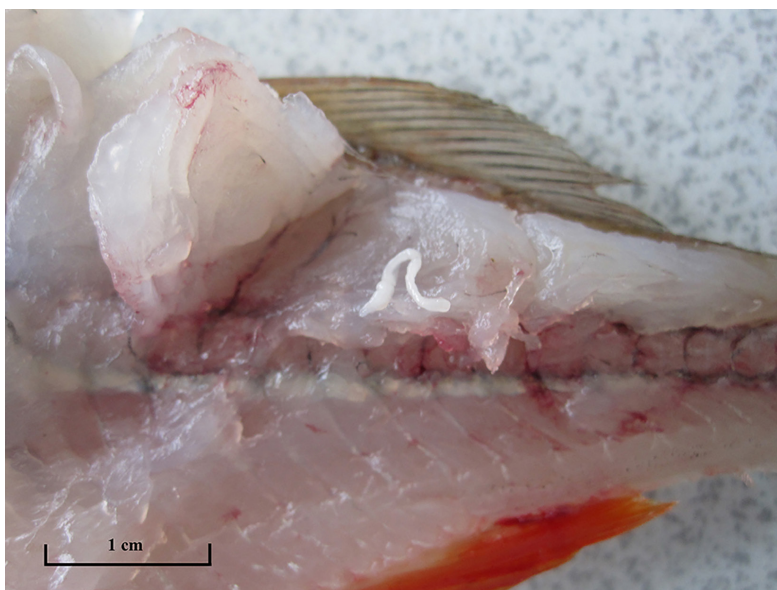


Рис. 3. Плероцеркоид лентеца широкого (*D. latus*) в мышцах окуня

Fig. 3. Plerocercoid of a tapeworm (*D. latus*) in muscle of a perch

в свежемороженой рыбе позволяет нам предполагать, что возможное место вылова рыб – один из заливов Красноярского водохранилища. Незначительный объем продаваемой рыбы и отсутствие каких-либо ветеринарных сопроводительных документов на продукцию также косвенно свидетельствуют о том, что данная партия рыбы выловлена в местном водоеме, а не завезена из другого региона.

Минимальная зараженность окуня в зал. Бирюса Красноярского водохранилища обусловлена тем, что этот залив в силу своих гидрологических особенностей (глубоководный, каньонного типа) менее подвержен антропогенному воздействию. Еще И.В. Герасимовым (1987) было отмечено, что значительная (возможно, и ведущая) роль в загрязнении водоема яйцами лентеца широкого принадлежит рыболовецким точкам, санитарное состояние которых неудовлетворительное, а также рыболовецким судам, курсирующим по акватории и сбрасываю-

щим фановые воды без очистки. Населенные пункты по берегам зал. Бирюса отсутствуют, основные рыбопромысловые точки расположены преимущественно в заливах средней и верхней частей водохранилища, любительское рыболовство развито в меньшей степени. Соответственно, попадание инвазионного начала здесь минимальное. Напротив, зал. Шумиха – ближайший крупный залив к городам Красноярску и Дивногорску, здесь расположены причалы и лодочные станции. На берегах зал. Шумиха имеется жилой частный сектор, дачные массивы, базы отдыха. В течение всего года отмечается значительное количество отдыхающих и рыбаков-любителей. Тенденция увеличения зараженности окуня Красноярского водохранилища по направлению к верховьям (зал. Сисим) обусловлена совокупностью гидрологических (в верховье самые крупные заливы с большой площадью мелководий), гидробиологических (благоприятные условия для развития зоопланктона, хорошая кормовая база для рыб) факторов,

а также наличием крупных населенных пунктов с развитой инфраструктурой.

Заключение

В настоящее время в Красноярском водохранилище продолжает существовать очаг дифиллоботриоза. Подтверждение тому – наличие плероцеркоидов в окуне, тенденция увеличения зараженности рыб личинками лентеца по направлению к верховьям, а также результаты ранее проведенных (Чугунова, 2018) исследований. Окунь в водохранилище – массовый вид, вылов которого (по

данным промысловой статистики Енисейского территориального управления Росрыболовства) в 2018 г. составил 94 % от общего вылова окуня в бассейне р. Енисей в Красноярском крае. Таким образом, основным вторым промежуточным хозяином лентеца широкого является именно окунь водохранилища в силу своей численности и характера питания.

Мелкий и крупный окунь, поступающий в продажу и не прошедший ветеринарно-санитарную экспертизу, потенциально опасен для здоровья населения.

Список литературы / References

Артамошин А.С., Павленко М.И. (1972) Обследование рыб и населения на дифиллоботриоз в районе верховья Енисея. *Зоологические проблемы Сибири: материалы IV совещания зоологов Сибири*. Новосибирск, Наука, с. 510-511 [Artamoshin A.S., Pavlenko M.I. (1972) Inspection of fish and human population for diphillobotriosis at the upper reaches of the Yenisei. *Zoological problems of Siberia: Proceedings of IV Meeting of Zoologists of Siberia*. Novosibirsk, Nauka, p. 510-511 (in Russian)]

Бауер О.Н. (1948) Паразиты рыб реки Енисей. *Известия ВНИОРХ*. Т. 27. Л., ВНИОРХ, с. 97 – 156 [Bauer O.N. (1948) Parasites of fishes in the Yenisei River. *Newsletter of All-Union Scientific Research Institute of Lake and River Fisheries*. Vol. 27. Leningrad, VNIORH, p. 97 – 156 (in Russian)]

Бауер О.Н. (1958) Рыбы как источник гельминтозов человека. *Основные проблемы паразитологии рыб*. Л., Ленинградский университет, с. 321 – 335 [Bauer O.N. (1958) Fish as a source of helminthiasis in humans. *Major problems of fish parasitology*. Leningrad, Leningrad State University, p. 321 – 335 (in Russian)]

Беклемишев В.Н. (1961) Термины и понятия, необходимые при количественном изучении паразитов и нидиколов. *Зоологический журнал*, 40(2): 149–158 [Beklemishev V.N. (1961) Terms and concepts necessary for the quantitative examination of parasites and nidicolous organisms. *Journal of Zoology* [Zoologicheskii zhurnal], 40(2): 149-158 (in Russian)]

Быховская-Павловская И.Е. (1985) *Паразиты рыб. Руководство по изучению*. Л., Наука, 122 с. [Bykhovskaya-Pavlovskaya I.E. (1985) *Parasites of fish. Study Guide*. Leningrad, Nauka, 122 p. (in Russian)]

Вышегородцев А.А., Космаков И.В., Ануфриева Т.Н., Кузнецова О.А. (2005) *Красноярское водохранилище*. Новосибирск, Наука, 212 с. [Vyshegorodtsev A.A., Kosmakov I.V., Anufrieva T.N., Kuznetsova O.A. (2005) *Krasnoyarsk Reservoir*. Novosibirsk, Nauka, 212 p. (in Russian)]

Герасимов И.В. (1987) Выявление путей попадания яиц лентеца широкого в акваторию Красноярского водохранилища как основа построения профилактических мероприятий. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*, 6: 72-77 [Gerasimov I.V. (1987) Revealing the ways via which tapeworm eggs enter the waters of the Krasnoyarsk Reservoir as the basis for developing

preventive measures. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases* [Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni], 6: 72-77 (in Russian)]

Герман Ю.К., Вышегородцев А.А. (2004) Оценка эпидемиологической ситуации в водоемах бассейна Енисея. *Вестник Красноярского государственного университета. Естественные науки*, 7: 77-81 [German Yu.K., Vyshegorodtsev A.A. (2004) Assessment of an epidemiological situation in waterbodies of the Yenisei basin. *Bulletin of the Krasnoyarsk State University. Natural Sciences* [Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki], 7: 77-81 (in Russian)]

Гинецинская Т.А. (1958) Жизненные циклы и биология личиночных стадий паразитических червей рыб. *Основные проблемы паразитологии рыб*. Л., Ленинградский университет, с. 144- 183 [Ginetsinskaya T.A. (1958) Life cycles and biology of larval stages of parasitic fish worms. *Major problems of fish parasitology*. Leningrad, Leningrad State University, p. 144 – 183 (in Russian)]

Грезе В.Н. (1957) Кормовые ресурсы рыб реки Енисея и их использование. *Известия ВНИОРХ*. Т. 41. Л., ВНИОРХ, 236 с. [Greze V.N. (1957) Food resources of fish of the Yenisei River and use thereof. *Newsletter of All-Union Scientific Research Institute of Lake and River Fisheries*. Vol. 41. Leningrad, VNIORN, 236 p. (in Russian)]

Делямуре С.Л., Скрябин А.С., Сердюков А.М. (1985) *Основы цестодологии. Т. II. Дифиллоботрииды – ленточные гельминты человека, млекопитающих и птиц*. Судариков В.Е. (ред.) М., Наука, 200 с. [Delyamure S.L., Scriabin A.C., Serdyukov A.M. (1985) *Fundamentals of Cestodology. Vol. II. Difillobotriida – tape helminthes of humans, mammals and birds*. Sudarikov V.E. (ed.) Moscow, Nauka, 200 p. (in Russian)]

Изюмова Н.А. (1956) О зараженности хищных рыб Рыбинского водохранилища личинками широкого лентеца. *Доклады Академии наук СССР*, 110(4): 711-712 [Izyumova N.A. (1956) On infection rates of predatory fishes of the Rybinsk Reservoir with larvae of the broad tapeworm. *Reports of Academy of Sciences of the USSR* [Doklady Akademii nauk SSSR], 110(4): 711-712 (in Russian)]

Изюмова Н.А. (1977) *Паразитофауна водохранилищ и пути ее формирования*. Л., Наука, 284 с. [Izyumova N.A. (1977) *Parasitic fauna of reservoirs and ways of formation thereof*. Leningrad, Nauka, 284 p. (in Russian)]

Клебановский В.А., Смирнов П.Л., Клебановская И.А., Обголец А.А. (1977) Гельминтозы населения Восточного Таймыра (Хатангский район). *Проблемы эпидемиологии и профилактики природоочаговых болезней в Заполярье*. Корнилова Г.В. (ред.) Омск, Омский медицинский институт, с. 144–164 [Klebanovsky V.A., Smirnov P.L., Klebanovskaya I.A., Obgol'ts A.A. (1977) Helminthiases of the population of East Taimyr (Khatanga district). *Problems of epidemiology and prophylaxis of natural focal diseases in the Polar region*. Kornilova G.V. (ed.) Omsk, Omsk Medical Institute, p. 144–164 (in Russian)]

Козминская И.Ф. (1964) О распространении дифиллоботриоза в низовьях Енисея и роли озерных рыб в инвазии людей широким лентецом. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*, 33(1): 82–86 [Kozminskaya I.F. (1964) On the distribution of diphyllobotriasis in the lower reaches of the Yenisei and the role of lake fishes in broad tapeworm invasion of people. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases* [Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni], 33(1): 82-86 (in Russian)]

Методические указания МУК 3.2.988-00 «Методы санитарно-паразитологической экспертизы рыбы, моллюсков, ракообразных, земноводных, пресмыкающихся и продуктов их пере-

работки» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 25 октября 2000 г.). Гарант. Информационно-правовая система. URL: <http://base.garant.ru/4178173/> [Guidelines MI 3.2.988-00 “Methods of sanitary and parasitological examination of fish, mollusks, crustaceans, amphibians, reptiles and products of processing thereof” (app. by Chief Public Health Physician of the Russian Federation on October 25, 2000). Garant. Legal and information system. URL: <http://base.garant.ru/4178173/> (in Russian)]

О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Красноярском крае в 2017 году: Государственный доклад (2018) Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Красноярскому краю, 323 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Krasnoyarsk Territory in 2017: State report (2018) Office of the Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare in the Krasnoyarsk Territory, 323 p. (in Russian)]

Плющева Г.Л., Герасимов И.В. (1995) Становление очага дифиллоботриоза на Саяно-Шушенском водохранилище. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*, 1: 20-22 [Plyushcheva G.L., Gerasimov I.V. (1995) The formation of the focus of difilllobothriosis at the Sayano-Shushensky Reservoir. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases* [Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni], 1: 20-22 (in Russian)]

Плющева Г.Л., Клебановский В.А., Герасимов И.В., Лосева Т.А., Дарченкова Н.Н., Смирнов П.Л., Обголец А.А., Клебановская И.А., Старостина О.Ю., Бочарова Т.А., Маштаков Б.П., Куркатов С.В., Акулова Л.М., Володин Ю.Ф., Воробьева Н.П. (1989) Распространение и оценка возможностей формирования новых очагов описторхоза и дифиллоботриоза в бассейне Енисея. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*, 6: 54-60 [Plyushcheva G.L., Klebanovskiy V.A., Gerasimov I.V., Loseva T.A., Darchenkova N.N., Smirnov P.L., Obgol'c A.A., Klebanovskaya I.A., Starostina O.Yu., Bocharova T.A., Mashtakov B.P., Kurkatov S.V., Akulova L.M., Volodin Yu.F., Vorob'eva N.P. (1989) The distribution and evaluation of potential formation of new foci of opisthorchiasis and diphillobotriosis in the Yenisei basin. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases* [Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni], 6: 54-60 (in Russian)]

Пронин Н.М., Жалцанова Д.- С.Д., Пронина С.В., Некрасов А.В., Ринчино В.Л., Русинек О.Т., Санжиева С.Д., Белякова Ю.В., Кудряшов А.С. (1991) *Динамика зараженности животных гельминтами*. Улан-Удэ, БНЦ СО АН СССР, 202 с. [Pronin N.M., Zhaltsanova D.-S.D., Pronina S.V., Nekrasov A.V., Rinchino V.L., Rusinek O.T., Sanzhieva S.D., Belyakova Yu.V., Kudryashov A.S. (1991) *The dynamics of helminthes infestation of animals*. Ulan-Ude, Buryat Scientific Center of the Siberian Branch of Academy of Sciences of the USSR, 202 p. (in Russian)]

Романов И.В. (1960) Распространение дифиллоботриоза в районе Горьковского водохранилища. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*, 5: 611-614 [Romanov I.V. (1960) Distribution of diphyllobothriosis in the Gorky Reservoir area. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases* [Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni], 5: 611-614 (in Russian)]

Романенко Н.А., Клебановский В.А., Плющева Г.Л., Артамошин А.С., Обголец А.А., Герасимов И.В., Сулейманов Н.Т., Левицкая Н.А., Старостина О.Ю., Степанов Л.Г., Немиро Т.В., Володин Ю.Ф., Воробьева Н.П. (1986) Возникновение и современное состояние очага дифиллоботриоза на Красноярском водохранилище. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*, 1: 69-73 [Romanenko N.A., Klebanovskij V.A., Plyushcheva G.L., Artamoshin A.S.,

Obgol's A.A., Gerasimov I.V., Sulejmanov N.T., Levickaya N.A., Starostina O.Yu., Stepanov L.G., Nemiro T.V., Volodin Yu.F., Vorob'eva N.P. (1986) Emergence and the current state of the focus of diphyllobotriosis at the Krasnoyarsk Reservoir. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases* [Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni], 1: 69-73 (in Russian)]

Чебышев Н.В., Далин М.В., Гусев В.К., Гузикова Г.С., Карпенко Л.П., Демченко А.Н. (2004) *Атлас по зоопаразитологии*. М., ИНТЕРХИМ, 173 с. [Chebyshev N.V., Dalin M.V., Gusev V.K., Guzikova G.S., Karpenko L.P., Demchenko A.N. (2004) *Atlas of zooparasitology*. Moscow, INTER-KHIM, 173 p. (in Russian)]

Чугунова Ю.К., Вышегородцев А.А. (2009) Паразитофауна рыб Красноярского водохранилища (видовой состав, эпизоотическая ситуация). *Проблемы и перспективы использования водных биоресурсов Сибири в XXI веке: мат. Всерос. конф. Красноярск, 8-12 декабря 2008 г.* Красноярск, ИПК СФУ, с. 366-370 [Chugunova Yu.K., Vyshegorodtsev A.A. (2009) Parasitic fauna of fishes of the Krasnoyarsk Reservoir (species composition, epizootic situation). *Problems and prospects of the use of water bioresources of Siberia in the 21st century: Proceedings of the All-Russian Conference. Krasnoyarsk, December 8-12, 2008*. Krasnoyarsk, Institute of Professional Development of Siberian Federal University, p. 366-370 (in Russian)]

Чугунова Ю.К. (2018) Развитие антропогенных очагов гельминтозов при трансформации водоемов на примере Красноярского водохранилища. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук. Серия: Экологические исследования*, 5: 58-64 [Chugunova Ju.K. (2018) Development of helminthiasis pestholes of anthropogenic origin during transformation of water bodies, example of Krasnoyarskoye storage reservoir. *Transactions of Karelian Research Centre of Russian Academy of Science. Ecological Studies Series* [Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk. Seriya: Ekologicheskie issledovaniya], 5: 58-64 (in Russian)]

Bazsalovicsova E., Kolenicova A., Kralova-Hromadova I., Minarik G., Soltys K., Kuchta R., Stefka J. (2018) Development of microsatellite loci in zoonotic tapeworm *Dibothriocephalus latus* (Linnaeus, 1758), Lühe, 1899 (syn. *Diphyllobothrium latum*) using microsatellite library screening. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 225: 1-3

Rozsa L., Reiczigel J., Majoros G. (2000) Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology*, 86(2): 228-232

Scholz T., Garcia H.H., Kuchta R., Wicht B. (2009) Update on the human broad tapeworm (genus *Diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1): 146-160

Waeschenbach A., Brabec J., Scholz T., Littlewood D.T.J., Kuchta R. (2017) The catholic taste of broad tapeworms – multiple routes to human infection. *International Journal for Parasitology*, 47(13): 831-843

DOI 10.17516/1997-1389-0296

УДК 543.645.3

A Test System for Tick-Borne Encephalitis Virus Detection Based on Bioluminescent Immunoassay

**Alexander N. Kudryavtsev^a, Ludmila P. Burakova^{a,b},
Ksenia A. Barinova^b and Ludmila A. Frank^{*a,b}**

*^aInstitute of Biophysics SB RAS
FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”
Krasnoyarsk, Russian Federation*

*^bSiberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 23.04.2018, received in revised form 20.06.2018, accepted 25.06.2018, published online 03.06.2019

Abstract. The tick-borne encephalitis virus (TBEV) is the causative agent of one of the most severe human neuroinfections. The infection transmitted by ixodid ticks is spread throughout the forest and forest-steppe zones of the temperate climatic belt of the Eurasian continent, including the Siberian region of the Russian Federation. Despite the availability of commercial analytical systems for the detection of TBEV, the task of developing approaches to a quick and reliable analysis that can be performed routinely, particularly in environmental studies, remains topical. A solid-phase bioluminescent immunoassay for determining the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks was developed. The assay is based on the hybrid protein consisting of a modified thermostable version of *Renilla muelleri* luciferase and a single-chain mini-antibody to protein E. This unique protein had been obtained and investigated by the authors earlier. The current study describes the expression of the hybrid protein in two different strains of recombinant *E. coli* cells. The optimal conditions for obtaining a highly purified protein were found. The bioluminescent reaction of the luciferase domain was triggered with the help of the stable natural form of the substrate, a Ca²⁺-dependent coelenterazine-binding protein, the recombinant variant of which was obtained by the authors. The conditions for production and storage of the immunoassay components (the hybrid protein, the stable form of the luciferase substrate, and activated microplates) were determined. Using the developed test system, more than 900 tick samples were analyzed for TBEV. In terms of sensitivity (89.5%) and specificity (98.9%), the proposed method is not inferior to colorimetric detection and is much simpler and faster than the latter.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: lfrank@yandex.ru

Keywords: tick-borne encephalitis virus (TBEV), bioluminescent microassay, hybrid protein 14D5a-Rm7.

Citation: Kudryavtsev A.N., Burakova L.P., Barinova K.A., Frank L.A. A test system for tick-borne encephalitis virus detection based on bioluminescent immunoassay. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(3), 310-321. DOI: 10.17516/1997-1389-0296

Тест-система для выявления вируса клещевого энцефалита биолюминесцентным иммуноанализом

**А.Н. Кудрявцев^{а,б}, Л.П. Буракова^{а,б},
К.А. Баринава^б, Л.А. Франк^{а,б}**
*^аИнститут биофизики СО РАН
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск
^бСибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск*

Аннотация. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является инфекционным агентом тяжелого нейрозаболевания – клещевого энцефалита. Он переносится иксодовыми клещами, инфекция распространена по всей лесной и лесостепной зоне умеренного пояса Евразийского континента, в том числе в Сибирском регионе Российской Федерации. Несмотря на наличие коммерческих аналитических систем для выявления ВКЭ, задача разработки быстрых и достоверных методов анализа, пригодных для рутинного применения, в том числе и при экологических исследованиях, остается актуальной. В результате проведенных исследований разработана и испытана тест-система для выявления вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в клещах твердофазным биолюминесцентным иммуноанализом. В качестве сенсора использовали гибридный белок, состоящий из одноцепочечного мини-антитела мыши к вирионному белку Е и термостабильного варианта люциферазы *Renilla muelleri*. Этот уникальный белок был получен и исследован авторами ранее. В работе рассмотрены варианты экспрессии гибрида рекомбинантными клетками *E. coli* разных штаммов и найдены оптимальные условия получения высокоочищенного препарата этого белка. Запуск биолюминесцентной реакции люциферазного домена осуществляли с помощью стабильной природной формы субстрата – Ca^{2+} -зависимого целентеразин-связывающего белка, рекомбинантный вариант которого был получен авторами ранее. Найдены условия долгосрочного хранения ключевых элементов системы – гибридного белка, стабильной формы субстрата люциферазы, активированных планшетов. Анализ осуществляется в высокопроизводительном микропланшетном варианте. Разработанным способом исследовано более 900 образцов природных клещей. По чувствительности (89,5 %) и специфичности (98,9 %) биолюминесцентный анализ не уступает колориметрическому, будучи при этом проще и быстрее.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), биолюминесцентный иммуноанализ, гибридный белок 14D5a-Rm7.

Цитирование: Кудрявцев, А.Н. Тест-система для выявления вируса клещевого энцефалита биолюминесцентным иммуноанализом / А.Н. Кудрявцев, Л.П. Буракова, К.А. Барина, Л.А. Франк // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(3). С. 310-321. DOI: 10.17516/1997-1389-0296

Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является инфекционным агентом тяжелейшего нейрозаболевания – клещевого энцефалита. Он переносится иксодовыми клещами, ареал распространения которых вся лесная и лесостепная зона умеренного пояса Евразийского континента, в том числе Сибирский регион Российской Федерации, Китай и Монголия (Süss, 2011). Современная эпидемическая ситуация в отношении клещевого энцефалита характеризуется значительным ростом заболеваемости как в России, так и в мире (Lenhard et al., 2016). Экстренная профилактика клещевого энцефалита у невакцинированных укушенных пациентов включает введение препарата иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита, полученного из сыворотки донорской крови. Применение продуктов донорской крови всегда сопровождается биологическим риском. Вместе с тем показано, что в среднем носителями вируса клещевого энцефалита являются лишь 5-10 % клещей. Поэтому быстрое, высокочувствительное выявление его наличия или отсутствия необходимо во избежание необоснованного применения иммунопрофилактики и, как следствие, для снижения количества случаев возможных осложнений.

Несмотря на наличие коммерческих аналитических систем для выявления ВКЭ колориметрическим иммуноанализом или на основе ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), известными производителями которых в России являются биотехнологические

компании «Вектор-Бест» и «Микроген», задача разработки подходов, обеспечивающих быстрый и достоверный анализ, пригодный для рутинного применения, в том числе и при экологических исследованиях, остается актуальной.

Недавно нами был предложен способ выявления ВКЭ на основе биолюминесцентного твердофазного иммуноанализа. Ключевым элементом способа выступает гибридный белок 14D5a-Rm7 (Burakova et al., 2015; Патент РФ, 2014), включающий люциферазу мягкого коралла *Renilla muelleri* (Rm7, генетически модифицированный термостабильный вариант, Stepanyuk et al., 2010) и одноцепочечное мини-антитело мыши 14D5a против поверхностного вирионного белка Е (Tsekhanovskaya et al., 1993; Байков и др., 2012). Эксперименты с модельными объектами (белком Е и лабораторными клещами) показали, что с помощью этого репортера возможно выявлять до 10^4 – 10^5 вирусных частиц или 0,1 пг (Burakova et al., 2015). Это превосходит возможности колориметрического иммуноанализа и сопоставимо с анализом на основе ОТ-ПЦР.

В качестве субстрата люциферазного домена исследован целентеразин, а также его природная форма в виде целентеразина, «упакованного» в полости Ca^{2+} -зависимого целентеразин-связывающего белка (СВР) (Titushin et al., 2008). Показано, что последний взаимодействует с доменом люциферазы более эффективно (Kudryavtsev et al., 2017).

Целью данной работы была разработка быстрой и чувствительной биолюминесцент-

ной тест-системы по выявлению ВКЭ и демонстрация ее пригодности для анализа природных клещей.

Материалы и методы

Материалы

Целентеразин (СЕ) получен от Prolume Ltd. (Pinetop, США). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи, органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

Экстракты природных клещей были получены из Центра гигиены и эпидемиологии Красноярского края. Около 5 % исследованных образцов экстрактов было приготовлено из целых клещей самостоятельно, по методу, описанному для набора D-1154 (Вектор Бест, Россия). ВКЭ в клещах выявляли колориметрическим иммуноанализом с использованием «Набора реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита D-1154» (Вектор Бест, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Получение гибридного белка 14D5a-Rm7

А) Клетки *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) RIPL (Stratagene, США), трансформированные плазмидой pFLAG-ompA-14D5a-Rm7, культивировали при активном перемешивании в LB среде, содержащей 200 мкг/мл ампициллина, при 37 °С. При оптической плотности культуры OD_{590} 0,6–0,7 ее охлаждали до 23 °С, вносили 0,5 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ; Диа-М, Россия) и продолжали культивирование при 23 °С в течение 20 ч. Клетки отделяли центрифугированием, из них выделяли периплазматическую фракцию, из которой очищали целевой белок хроматографией на колонке HisTrap Ni-NTA Agarose (QIAGEN, Germany), уравновешенной 50 мМ К-Na фосфатным

буфером (ФБ) pH=7,0, линейным градиентом имидазола (10–200 мМ) в том же буфере. Фракции, содержащие целевой белок (определяли по биолюминесцентной активности), объединяли.

Выделение целевого белка из периплазмы клеток *E. coli* HB2151 (Stratagene, США), трансформированных данной плазмидой, проводили аналогично.

Б) Клетки *E. coli* Rosetta-gami 2 (Novagen, США), трансформированные плазмидой pFLAG-14D5a-Rm7 (Патент РФ, 2014), культивировали, как описано выше. Клетки осаждали центрифугированием, суспендировали в буфере А (5 мМ имидазол, 0,3 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl pH 7,0) и дезинтегрировали ультразвуком при охлаждении льдом. Смесь центрифугировали, супернатант наносили на колонку HisTrap™ HP (GE Healthcare), уравновешенную буфером А, и элюировали вещества с колонки линейным градиентом имидазола (50–200 мМ) в том же буфере. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли, концентрировали и наносили на колонку Superdex 75 (GE Healthcare), уравновешенную 20 мМ Tris-HCl pH 7,0, содержащим 0,5 мМ ЭДТА и 25 мМ NaCl, элюировали этим же раствором. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли.

Получение

целентеразин-связывающего белка

Целентеразин-связывающий белок (СВР) получали, как описано ранее (Titushin et al., 2008). Кратко: клетки *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus (RIPL), трансформированные плазмидой с геном апо-СВР, культивировали в условиях, описанных выше. При оптической плотности культуры OD_{590} 0,6–0,7 вносили 1 мМ ИПТГ и культивировали в тех же условиях 3 ч. Клетки осаждали, суспендировали в 20 мМ Tris-HCl pH 7,0 и дезинтегриро-

вали ультразвуком при охлаждении льдом. Смесь центрифугировали, осадок растворяли в 6 М мочевины, наносили на колонку DEAE-Sepharose FF, уравновешенную 6 М мочевиной в 20 mM Tris-HCl pH 7,0, и хроматографировали в градиенте ацетата аммония (0–0,3 М) в том же буфере. Образец, содержащий апо-СВР, разводили десятикратным объемом раствора целентеразина (1,2-молярный избыток) в 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 5 mM ЭДТА и инкубировали при 8 °С в течение ночи. Целевой белок СВР очищали хроматографией на колонке Mono-Q (GE Healthcare), уравновешенной 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 5 mM ЭДТА в градиенте NaCl (0–0,35 М). Типичный выход высокоочищенного СВР составлял 30–35 мг на литр культуры.

Измерение биолюминесцентного сигнала

Биолюминесцентный сигнал измеряли при быстром смешивании: а) 5 мкл свежеприготовленного раствора целентеразина (от 1,32 до 660 мМ в этаноле) с 500 мкл раствора 14D5a-Rm7 (13,3 нМ в 50 mM Tris-HCl pH 7,0, 25 mM NaCl, 0,5 mM ЭДТА); б) 5 мкл раствора СВР (от 0,15 до 150 мМ в 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 25 mM NaCl, 0,5 mM ЭДТА) с 500 мкл раствора 14D5a-Rm7 (1,5 нМ в 50 mM Tris-HCl pH 7,0, 25 mM NaCl, 10 mM CaCl₂). Измерения проводили при 20 °С в термостатированной кювете люминометра БЛМ 8802 (СКТБ Наука, Красноярск). Все измерения проводили не менее чем в трех повторностях.

Приготовление и хранение активированных микропланшетов

В лунки непрозрачного микропланшета (Corning, США) вносили по 100 мкл раствора мышинных моноклональных антител 14D5 (Биосан, Россия), 5 мкг/мл в 50 mM K-Na фосфатном буфере pH 7,0, содержащем 0,15 М NaCl (ФСБ), инкубировали ночь при 8 °С, про-

мывали (ФСБ, содержащий 0,1 % Tween 20) и блокировали свободную поверхность лунки инкубированием со 150 мкл 1%-го раствора поливинилпирролидона в ФСБ в течение 1 ч при 37 °С. Далее планшеты промывали, сушили на воздухе, покрывали клейкой пленкой и хранили при температуре 8 или минус 18 °С.

Биолюминесцентный микроанализ экстрактов клещей

В лунки активированного планшета вносили по 100 мкл экстрактов клещей, позитивного (К+) или негативного (К-) контролей из набора D-1154 (Вектор Бест, Россия) и инкубировали 1 ч при 37 °С при встряхивании. После промывки вносили раствор 14D5a-Rm7 (по 100 мкл, 1 мкг/мл в ФСБ), инкубировали 1 ч при 23 °С, затем тщательно промывали. Биолюминесценцию связавшегося 14D5a-Rm7 измеряли с помощью планшетного люминометра LB 940 Mithras (Berthold, Германия) сразу после впрыска 100 мкл раствора СВР (1,5 мкМ, 100 mM CaCl₂ в Tris-HCl pH 7,0).

Приготовление и хранение лиофилизированных образцов СВР и 14D5a-Rm7

Растворы белков в ФСБ (СВР – 2,5 мг/мл, 14D5a-Rm7 – 0,5 мг/мл), а также в ФСБ, содержащем: 5 % трегалозы, 0,1 % либо 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma-Aldrich, США), быстро замораживали при минус 80 °С и лиофилизовали в камере BenchTop Pro (SP 85 Scientific, США). Полученные образцы хранили в камере бытового холодильника (около 8 °С) и периодически проверяли их в модельном иммуноанализе с использованием образцов К+ (Вектор Бест, Россия) в качестве антигена. Для сравнения тот же анализ проводили параллельно с использованием свежеприготовленных белков.

Результаты и обсуждение

Разработка тест-системы включала: получение наиболее оптимальным способом гибридного белка, обладающего функциями родительских белков; разработку стабильного субстрата люциферазного домена; поиск условий хранения ключевых белковых элементов анализа, а также активированных микропланшетов; экспериментальное подтверждение пригодности разрабатываемой системы для выявления ВКЭ в природных клещах.

Получение и свойства гибридного белка

В состав гибридного сенсорного белка входят: распознающий элемент – одноцепочечное мини-антитело мыши 14D5a против белка Е ВКЭ, состоящее из переменных доменов тяжелой и легкой цепей (V_H и V_L), соединенных гибким линкером, и сигнальный элемент – термостабильный вариант люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri* (Rm7), способный генерировать световой сигнал при добавлении субстрата – целентеразина (рис. 1А). Домен мини-антитела присоединен

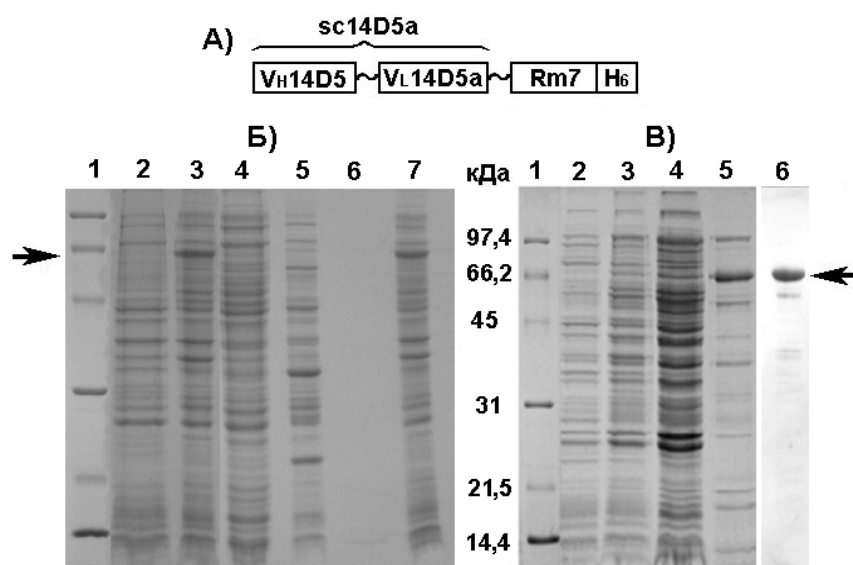


Рис. 1. А) Домены в составе гибридного белка. Б) Электрофоретический анализ образцов, полученных при выделении гибридного белка 14D5a-Rm7 из клеток *E. coli* штамм BL21 Codon Plus (DE3) RIPL; 1 – стандартные белки; 2, 3 – лизат клеток до и после индукции; 4 – цитоплазматическая фракция; 5 – периплазматическая фракция, сконцентрированная в 10 раз; 6 – препарат после очистки из периплазмы; 7 – экстракт телец включения в 6 М мочевины. В) Электрофоретический анализ образцов при выделении гибридного белка из клеток *E. coli* Rosetta-gami 2: 1-4 – то же, что и для случая (Б); 5, 6 – препараты после первой и второй хроматографий. Молекулярная масса стандартных белков (Amersham Bioscience) показана числами. Электрофорез проводили в 12,5%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, окрашивание Coomassie blue. Стрелками показана полоса гибридного белка

Fig. 1. А) Hybrid protein domains. Б) SDS-PAGE analysis of 14D5a-Rm7-containing-protein fractions during purification of the sample obtained from *E. coli*, strain BL21 Codon Plus (DE3) RIPL. Lanes: 1 – standard proteins; 2 and 3, whole-cell lysates before and after IPTG induction respectively; 4 – cytoplasm; 5 – periplasmic fraction (concentrated 10-fold); 6 – sample from periplasmic fraction after purification; 7 – 6 M urea extract of inclusion bodies; В) SDS-PAGE analysis of 14D5a-Rm7-containing protein fractions during purification of the sample obtained from *E. coli* Rosetta-gami 2. Lanes: 1-4 – the same samples like in case (Б); 5, 6 – samples after metal affinity chromatography and gel-filtrations, correspondingly. Molecular masses of standard proteins (Amersham Bioscience) are shown with numbers. 12.5 % polyacrylamide gels stained with Coomassie blue. Arrows show the band corresponding to the hybrid protein

к люциферазе с *N*-конца через линкер (GGC)₄, а с *C*-конца люциферазы присоединен гексистиридиновый пептид Н₆ для выделения целевого гибрида с помощью металл-аффинной хроматографии.

Для получения с помощью бактериальной экспрессии бифункционального гибридного белка, проявляющего свойства обоих входящих в его состав доменов, были рассмотрены два варианта с локализацией: (а) в периплазматическом пространстве клеток *E. coli*, для чего ген целевого белка включал последовательность, кодирующую лидерный пептид ompA; (б) в цитоплазме клеток *E. coli* Rosetta-gami 2, содержащих мутированные гены тиредоксин редуктазы и глутатион редуктазы, в результате чего существенно активируется образование дисульфидных связей в белках. На рис. 1Б, В приведен анализ фракций при получении и очистке гибридного белка. В обоих случаях добавление ИПТГ инициирует синтез целевого гибрида: на электрофореграммах появляется полоса с молекулярной массой, близкой к расчетному значению 65,5 кДа. Видно, что количество белка, выделяемое из периплазматического пространства клеток *E. coli* BL21 (рис. 1Б), чрезвычайно мало, его присутствие контролировали по биолюминесцентной активности люциферазного домена. После хроматографической очистки выход белка составил 0,02–0,025 мг на литр культуры. Как видно из данных электрофореграммы, значительное количество белка локализовано в виде телец включения. К сожалению, после растворения 6 М мочевиной с последующей заменой буфера гибрид не обладает биолюминесцентной активностью. Попытки увеличить выход целевого белка в периплазматическом пространстве клеток *E. coli* штаммов TG1, HB2151 и DH5a не привели к желаемому результату (данные не приводятся). Можно предположить, что перенос

гибридного белка в периплазму затруднен из-за его высокой молекулярной массы или специфической пространственной структуры.

Рисунок 1В демонстрирует, что при синтезе гибрида в клетках *E. coli* Rosetta-gami 2 практически весь гибридный белок сосредоточен в цитоплазматической фракции, где его количество составляет 0,9 % от всех цитоплазматических белков. В результате двух хроматографий получали препарат целевого белка 87%-й чистоты с выходом 2–3 мг на литр культуры, обладающего биолюминесцентной активностью при добавлении целентеразина.

Каталитические свойства домена люциферазы

Биолюминесценция *Renilla* возникает в результате реакции окисления целентеразина кислородом, катализируемой люциферазой, с образованием целентерамида, СО₂ и кванта света ($\lambda_{\text{max}} = 480$ нм). В фотофорах животного это соединение иммобилизовано во внутренней полости Ca²⁺-активируемого целентеразин-связывающего белка (СВР) (Titushin et al., 2008). Присоединение ионов Ca²⁺ вызывает конформационные изменения молекулы, в результате которых целентеразин становится доступным для окисления, катализируемого люциферазой (Stepanyuk et al., 2009).

Применение целентеразина в системах *in vitro* сопровождается рядом неудобств: он является гидрофобным соединением, плохо растворимым в водных средах. Поскольку это соединение довольно быстро самопроизвольно окисляется, необходимо использовать только свежеприготовленные растворы. В то же время СВР – стабильный, хорошо растворимый белок, представляет собой более удобную для рутинного использования форму субстрата. Нами были рассмотрены каталитические свойства домена люциферазы при

взаимодействии с обеими формами субстрата (рис. 2). В табл. 1 приведены значения кинетических параметров этих реакций: константы Михаэлиса (K_m), максимальная скорость реакции (V_{max}). Необходимо заметить, что биолюминесцентная реакция люциферазы протекает с определенным квантовым выходом и потому полученные по биолюминесценции значения кинетических параметров следует считать кажущимися (термин, который мы далее опускаем).

Можно видеть, что значение K_{cat} , отражающее число оборотов фермента в едини-

цу времени, а также параметр K_{cat}/K_m для случая СВР существенно выше, чем для свободного целентеразина, что свидетельствует в пользу более высокой эффективности биолюминесцентной реакции. Аналогичные результаты были получены при исследовании каталитических свойств свободной люциферазы *Renilla muelleri* с этими формами субстрата (Titushin et al., 2008). Было показано, что присоединение ионов Ca^{2+} вызывает конформационные изменения белка с разрушением сети водородных связей, участвующих в иммобилизации целентеразина, делая его

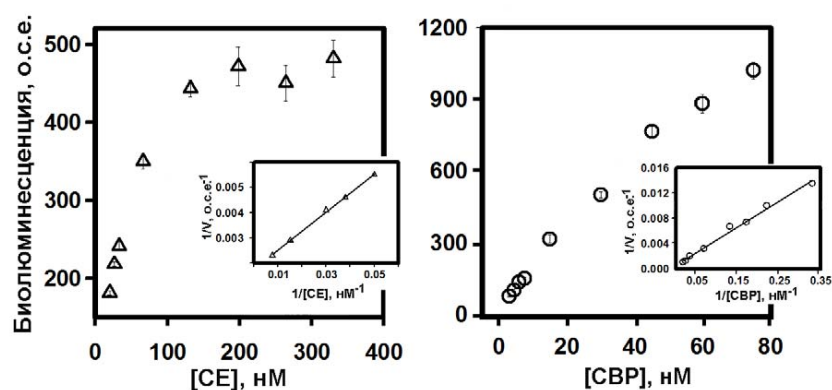


Рис. 2. Зависимость биолюминесцентного сигнала 14D5a-Rm7 от концентрации целентеразина (слева) и СВР (справа). Каждая точка – среднее от трех измерений начальной (максимальной) интенсивности сигнала. На врезках – графики Лайнуивера-Берка. о.с.е. – относительные световые единицы

Fig. 2. 14D5a-Rm7 bioluminescence vs. coelenterazine (left) and CBP (right) concentration. Each point is the average of the initial (maximal) bioluminescence intensity \pm standard deviation, $n=3$. Inset: Lineweaver–Burk plots. r.l.u. – relative light units

Таблица 1. Кинетические параметры биолюминесцентной реакции 14D5a-Rm7 с разными формами субстрата

Table 1. Kinetic parameters of the 14D5a-Rm7 bioluminescent reaction with two substrate types

Параметр	CE	CBP
K_m (мкМ) ¹	0,91	0,43
V_{max} (о.с.е.) ²	588	1094
K_{cat} (с ⁻¹)	44,54	729
K_{cat}/K_m (мкМ с ⁻¹)	48,95	1696

¹ 10⁻⁶ М;

² относительные световые единицы.

доступным для окисления. Наблюдаемое увеличение эффективности биолюминесцентной реакции с высокой долей вероятности объясняется образованием короткоживущего комплекса «люцифераза – Ca^{2+} -активированный СВР» (Stepanyuk et al., 2009). Таким образом, использование СВР как субстрата в разрабатываемой тест-системе дает очевидные преимущества по сравнению со «свободным» целентеразином. Рекомбинантный СВР доступен благодаря наличию бактериального штамма-суперпродуцента апобелка, а также разработанному простому способу его получения.

Аффинные свойства полученного гибрида проверяли с помощью твердофазного биолюминесцентного анализа рекомбинантного белка E ВКЭ (Burakova et al., 2015). Полученное для гибридного белка значение константы аффинности $K_{\text{aff}} = 2,65 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ близко таковому для немодифицированного рекомбинантного антитела мыши sc14D5a – $1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Вауков et al., 2009).

Таким образом, синтез в клетках *E. coli* Rosetta-gami 2 обеспечивает хороший выход гибрида, домены которого обладают биоспецифическими свойствами исходных белков.

Стабильность 14D5a-Rm7 и СВР при хранении в лиофилизированном виде

Нами обнаружено, что образцы, лиофилизированные из фосфатно-солевого буфера, необратимо теряют до 80 % биолюминесцентной активности. Добавление к раствору трегалозы либо бычьего сывороточного альбумина существенно увеличивает стабильность белков при лиофильной сушке. Показано, что биолюминесцентная активность 14D5a-Rm7, лиофилизированного в присутствии 0,1 % БСА, практически не изменялась через сутки, 4 месяца и год и составляла $86,5 \pm 0,7$, $85,1 \pm 1,6$ и $88,3 \pm 1,2$ %, $n=4$, от активности свежевыде-

ленного образца соответственно. Биолюминесцентные сигналы при запуске добавленным лиофилизированного в тех же условиях препарата СВР через сутки, 4 месяца и год хранения практически не изменялись: их интенсивность составляла $98 \pm 4,5$, $93,3 \pm 5,8$, $90,9 \pm 5,3$ %, $n=3$, соответственно, от сигналов, полученных при использовании свежеприготовленного препарата.

Хранение планшета, активированного иммуноглобулином 14D5

Планшеты, подготовленные, как описано в «Материалах и методах», хранили при 8 либо минус 18 °С. Периодически планшеты использовали для биолюминесцентного иммуноанализа контрольного образца К+. Показано, что поверхность планшетов не теряет способности иммобилизовать мишень: после 1, 3, 12 месяцев хранения величина сигнала составила $95,2 \pm 3,43$ % ($n=12$) от сигнала при аналогичном анализе на свежеприготовленных планшетах.

Биолюминесцентный иммуноанализ клещей

В течение сезонов 2016 и 2017 гг. разработанный способ выявления ВКЭ был применен к исследованию природных клещей. Анализ проводили по составленному протоколу, в который помимо описанной процедуры (см. «Материалы и методы») входило описание порядка измерения сигналов и автоматической обработки результатов с помощью планшетного люминометра Mithras. В качестве критерия наличия вируса использовали значение дискриминационного фактора D , равного отношению биолюминесцентного сигнала от образца к сигналу контрольного негативного образца (К-, набор D-1154, Вектор Бест, Россия). При значении $D \geq 2$ образец считали положительным по ВКЭ (ПС), в остальных

Таблица 2. Результаты биолюминесцентного выявления ВКЭ в природных клещах

Table 2. Bioluminescent detection of TBEV in native ticks

Год	Д, ОС/К	Д, ПС/К	К ⁺ /К
2016	1,15 ± 0,3 n=487	2,77 ± 0,8 n=15	5,2 ± 1,3 n=9
2017	1,1 ± 0,3 n=414	5,3 ± 1,1 n=4	16,6 ± 5,8 n=17

случаях – отрицательным по ВКЭ (ОС). Результаты исследований приведены в табл. 2. Все образцы параллельно были исследованы с помощью набора для колориметрического иммуноанализа, результаты которого принимали как истинные. Всего за этот период нами исследовано 920 образцов экстрактов клещей, из которых положительными оказались 19. Полученное по результатам двух сезонов значение чувствительности биолюминесцентного способа выявления ВКЭ составило 89,5 %, т.е. два образца были ложноотрицательными, с пограничными значениями Д 1,98 и 1,86. Специфичность анализа составила 98,9 %, т.е. ложноположительными оказались 10 образцов. Возможно, этот результат связан с разницей в чувствительности колориметрического и биолюминесцентного способов анализа. К сожалению, ограниченный объем предоставленного материала не позволил провести дополнительный независимый анализ спорных образцов. Необходимо отметить, что значение дискриминационного фактора было выбрано из общих соображений и не исключено, что дополнительные исследования позволят уточнить его значение.

По сравнению с колориметрическим иммуноанализом ВКЭ в клещах предложенный биолюминесцентный способ характеризуется более высокой чувствительностью (о чем свидетельствуют эксперименты с лабораторными клещами (Burakova et al., 2015)) и укороченным временем анализа: в процедуре отсутствуют стадии добавления и инкубирования субстрата фермента, а также добавления стоп-реагента. По сравнению с анализом на основе ОТ-ПЦР метод существенно проще, поскольку не требует специального оборудования, ферментов и особых условий проведения анализа.

В тест-систему необходимым компонентом входит, как правило, инструментальная часть. В наших исследованиях биолюминесцентный сигнал репортера измеряли с использованием планшетного биолюминометра LB 940 Mithras (Berthold, Германия) исследовательского типа, обладающего целым рядом опций, необходимых для проведения научных работ. Это, безусловно, отражается на стоимости такого оборудования. В случае прибора, пригодного для рутинных исследований, такого разнообразия функций не требуется. В рамках данного исследования нами были сформулированы основные технические параметры люцинометра для рутинных лабораторных исследований и разработана модель такого прибора, а также программное обеспечение к нему (Патент РФ, 2017). Отметим, что создание отечественного прибора подобного типа откроет возможность для применения биолюминесцентного анализа других важных для медицинской диагностики мишеней (см., напр., Frank, Krasitskaya, 2014).

Благодарности / Acknowledgements

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 16-44-240648 p_a. Авторы благодарны сотрудникам Центра гигиены и эпидемиологии Красноярского края за предоставленные для исследований экстракты природных клещей.

The study was funded by the Russian Foundation for Basic Research, Government of Krasnoyarsk Territory, Krasnoyarsk Region Science and Technology Support Fund (project No. 16-44-240648) and the state budget allocated to the fundamental research at the Russian Academy of Sciences, project No. 0356-2016-0712. The authors are grateful to the staff of the Center for Hygiene and Epidemiology of Krasnoyarsk Region for providing extracts of the native ticks.

Список литературы / References

Байков И.К., Матвеев Л.Е., Матвеев А.Л., Тикунова Н.В. (2012) Сравнительный анализ вариабельных доменов моноклональных антител против вируса клещевого энцефалита. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*, 111(4): 30–33 [Baykov I.K., Matveev L.E., Matveev A.L., Tikunova N.V. (2012) Comparative analysis of variable domains of monoclonal antibodies against tick-borne encephalitis virus. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)* [Sibirskij Medicinskij Zurnal (Irkutsk)], 111(4): 30–33 (in Russian)]

Патент РФ (2014) № 2513686 [Patent RF (2014) No. 2513686 (in Russian)]

Патент РФ (2017) № 177777 [Patent RF (2017) No. 177777 (in Russian)]

Baykov I.K., Levanov L.N., Matveev L.E., Tikunova N.V. (2009) Development of the single-chain antibodies against tick-borne encephalitis virus. *Proceedings of the conference "Genomics and proteomics in medicine"*. Novosibirsk, p. 98

Burakova L.P., Kudryavtsev A.N., Stepanyuk G.A., Baykov I.K., Morozova V.V., Tikunova N.V., Dubova M.A., Lyapustin V.N., Yakimenko V.V., Frank L.A. (2015) Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(18): 5417–5423

Frank L.A., Krasitskaya V.V. (2014) Application of enzyme bioluminescence for medical diagnostics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 144: 175–197

Kudryavtsev A.N., Burakova L.P., Frank L.A. (2017) Bioluminescent detection of tick-borne encephalitis virus in native ticks. *Analytical Methods*, 9(15): 2252–2255

Lenhard T., Ott D., Jakob N.J., Pham M., Baumer P., Martinez-Torres F., Meyding-Lamade U. (2016) Predictors, neuroimaging characteristics and long-term outcome of severe european tick-borne encephalitis: a prospective cohort study. *PLoS One*, 11(4): e0154143

Stepanyuk G.A., Unch J., Malikova N.P., Markova S.V., Lee J., Vysotski E.S. (2010) Coelenterazine-v ligated to Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of *Renilla muelleri* luciferase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(4): 1809–1817

Stepanyuk G.A., Liu Z.J., Vysotski E.S., Lee J., Rose J.P., Wang B.C. (2009) Structure based mechanism of the Ca²⁺-induced release of coelenterazine from the *Renilla* binding protein. *Proteins*, 74(3): 583–593

Süss J. (2011) Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2(1): 2-15

Titushin M.S., Markova S.V., Frank L.A., Malikova N.P., Stepanyuk G.A., Lee J., Vysotski E.S. (2008) Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(2): 189–196

Tsekhanovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., Karavanov A.S., Pressman E.K. (1993) Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype). *Virus Research*, 30(1): 1–16

DOI 10.17516/1997-1389-0330

УДК 535.37547.415.1546.59-022.532

Ethylene Diamine Functionalized Citrate-Capped Gold Nanoparticles for Metal-Enhanced Bioluminescence

Rajeev Ranjan^{a*},
Maria A. Kirillova^a and Valentina A. Kratasyuk^{a,b}

^a*Siberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

^b*Institute of Biophysics SB RAS
FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 04.01.2019, received in revised form 13.05.2019, accepted 15.07.2019

Abstract. Metal-enhanced bioluminescence (MEB) is a complex photophysical event which manifests itself in manifold luminescence enhancement and depends on many parameters. The parameters include the distance between the luminescent source and the nanomaterial surface, the size and shape of nanoparticles, localized surface plasmon resonance (LSPR) peaks of the nanomaterial and the dielectric constant of the surrounding medium. Studying distance-dependent MEB in the presence of linkers of specified length may provide new insights into luminescence enhancement. In this regard, the present investigation is aimed to understand the role of ethylene diamine as a potential linker in model systems for distance-dependent metal-enhanced bioluminescence (MEB) with gold nanoparticles (AuNPs). Four different types of AuNPs (AuNP1, AuNP2, AuNP3, AuNP4) were synthesized by varying the trisodium citrate (TC) and silver nitrate (AgNO_3) concentrations with maximum absorbance values of 0.99, 1.24, 1.21 and 1.38 respectively and the corresponding LSPR peaks (λ_{max}) of 520 nm, 535 nm, 525 nm, and 525 nm. Luminescence enhancement up to 1.44-fold was observed when ethylene diamine (ED) was used as a linker in the presence of 1-N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), ATP and AuNP1. The sample consisting of FMN, EDC and AuNP1 showed 1.3-fold luminescence enhancement. It was noted that AuNPs synthesized using AgNO_3 as an additional component did not enhance luminescence in all the investigations. The suggested technique of using linkers of predetermined lengths may also prove fairly effective for studying other parameters which can influence MEB and cause sensitivity enhancement of luminescence-based biosensors.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: rrandzhan@sfu-kras.ru

ORCID: 0000-0003-4692-9504 (Ranjan R.); 0000-0003-1789-0591 (Kirillova M.); 0000-0001-6764-5231 (Kratasyuk V.)

Keywords: metal-enhanced bioluminescence, ethylene diamine, carbodiimides, adenosine 5'-triphosphate, flavin mononucleotide.

Citation: Ranjan R., Kirillova M.A., Kratasyuk V.A. Ethylene diamine functionalized citrate-capped gold nanoparticles for metal-enhanced bioluminescence. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(3), 322-330. DOI: 10.17516/1997-1389-0330

Покрытые цитратной оболочкой и функционализированные этилендиамином наночастицы золота для усиления биоломинесценции металлом

Р. Ранджан^а, М.А. Кириллова^а, В.А. Кратасюк^{а,б}

*^аСибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск*

*^бИнститут биофизики СО РАН
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск*

Аннотация. Металл – усиленная биоломинесценция (МЕВ) представляет собой сложное фотофизическое событие, проявляющееся в виде многократного усиления люминесценции и зависящее от множества параметров. К этим параметрам относится расстояние между источником люминесценции и поверхностью наноматериала, размер и форма наночастиц, а также пики плазмонного резонанса локализованной поверхности (LSPR) наноматериала и диэлектрическая проницаемость окружающей среды. Изучение расстояния между источником люминесценции и поверхностью наноматериала с использованием связующих агентов (линкеров) заданной длины может дать новое понимание эффекта усиления люминесценции. Поэтому целью настоящего исследования была проверка возможности использования этилендиамина в качестве потенциального линкера для дистанционно-зависимой МЕВ с наночастицами золота (AuNPs). Путем варьирования концентраций тринатрийцитрата (ТС) и нитрата серебра (AgNO₃) были синтезированы четыре типа наночастиц золота (AuNP1, AuNP2, AuNP3, AuNP4) с максимумами поглощений 0,99; 1,24; 1,21 и 1,38 при λ_{\max} 520, 535, 525 и 525 нм. Усиление люминесценции в 1,44 раза наблюдалось при использовании этилендиамина (ED) в качестве линкера в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC), АТФ и AuNP1. В образце, состоящем из флавиномононуклеотида (FMN), EDC и AuNP1, было зафиксировано усиление люминесценции в 1,3 раза. Использование AgNO₃ в качестве дополнительного компонента при синтезе AuNPs не приводит к усилению уровня люминесценции. Предложенный подход с применением линкеров заданной длины может быть полезным для изучения других параметров, влияющих на МЕВ и приводящих к увеличению чувствительности люминесцентных биосенсоров.

Ключевые слова: усиление биолюминесценции металлом, этилендиамин, карбодиимиды, аденозин 5'-трифосфат, флавиномононуклеотид.

Цитирование: Ранджан, Р. Покрытые цитратной оболочкой и функционализированные этилендиамином наночастицы золота для усиления биолюминесценции металлом / Р. Ранджан, М.А. Кириллова, В.А. Кратасюк // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(3). С. 322-330. DOI: 10.17516/1997-1389-0330

Introduction

Metal-enhanced bioluminescence (MEB) is an intriguing photophysical effect that takes place on a nanometal surface and depends upon multiple parameters (Geddes, Geddes, 2012; Geddes, 2014; Ranjan et al., 2017). These parameters include the distance between the source of light and plasmon-induced metallic surface (generally ≤ 10 nm), the wavelength and intensity of the incident light, the nature of nanomaterial (shape, size, metal type) and the dielectric constant of the surrounding medium. For this reason, determining the optimal conditions for observing luminescence enhancement is a highly complex task. Nevertheless, there are a few scientific reports which discuss MEB. The paper by Golberg et al. (2014) describes bioluminescence enhancement (up to 2-fold) by silver nanoparticles on a polystyrene microtiter plate surface placed in vicinity to a whole-cell bioreporter. The distance (d_{L-NP}) between the nano-metal surface and the light source (viable bioluminescent bacteria) was presumed to be less than 10 nm. Another similar MEB study was carried out using gold-silver colloids in association with bioluminescent sources viz. *Photobacterium leiognathi*, firefly luciferase (FLuc) and bacterial luciferase (BLuc). The achieved enhancement of bioluminescence was 250% for bacterial cells, 95% for BLuc and 52% for FLuc (Abhijith et al., 2014). This study was carried out without considering d_{L-NP} . Use of silver island films in bioluminescence enhancement has also been previously reported (Eltzov et al., 2009) and

d_{L-NP} was intentionally less than 10 nm. In this case, the excited states of the bioluminescent intermediates can non-radiatively induce mirror dipoles on the metallic surface thus inducing the surface plasmons to radiate coupled quanta. According to Du et al. (2014) bioluminescent protein nanocapsules (BPN) in close proximity to gold nanocrystals (GNC) can result in ca. 10-fold enhancement of bioluminescence intensity. In this research, BPN was constructed using chemically modified horse-radish peroxidase (HRP) and GNC.

These methods for bioluminescence enhancement provide ample opportunity to increase the sensitivity of bioassay systems. However, an appropriate linker of a uniform size has not been previously used for observing MEB. In the present research, ethylene diamine (ED) was studied as a potential linker between a bioluminescent source and gold nanoparticles (AuNPs) in MEB. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) and flavin mononucleotide (FMN) were used as prime substrates for bioluminescent emission in this study.

Materials and methods

Materials

A vial of the lyophilized preparation contained 0.5 mg bacterial luciferase (EC 1.14.14.3) from the recombinant strain, *Escherichia coli* and 0.15 U of NADH:FMN-oxidoreductase (EC 1.5.1.29, *Vibrio fischeri*) obtained from the Laboratory of Nanobiotechnology and Bioluminescence, Institute of Biophysics, Krasnoyarsk. Mutant

firefly luciferase (FLuc: EC 1.13.12.7) from *Luciola mingrelica* (FLuc) and D-luciferin were the products of Lumtek, Moscow, Russia. Adenosine 5'-triphosphate (ATP), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and ethylene diamine (ED) were obtained from Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), tetradecanal and flavin mononucleotide (FMN) were the products of Serva, Germany. Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) was obtained from Alfa Aesar (ThermoFisher Inc., Karlsruhe, Germany); trisodium citrate was purchased from PanReac AppliChem GmbH, Germany. Silver nitrate (AgNO_3) was obtained from JSC Ural Chemical Reagents Plant, Sverdlovsk Region, Russia. Nitric acid (HNO_3) and hydrochloric acid (HCl) were purchased from Giredmet, Moscow, Russia. Glycerol and magnetic beads were purchased locally. Disodium hydrogen phosphate and monosodium dihydrogen phosphate were purchased from Medigen, Novosibirsk, Russia. Glacial acetic acid was obtained from Chemicalsnab, Ufa, Russia.

Synthesis of gold nanoparticles and basic characterization

Glassware viz. a three-neck round bottom flask, glass stoppers, beakers, pipettes and a reflux condenser were washed thoroughly and immersed in aqua regia (mixture of HNO_3 and HCl in the molar ratio 1:3) to eliminate any traces of impurities followed by rinsing with double distilled water. The glassware was dried using a hot air oven until further use. The stock solution of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M) was prepared by dissolving 0.393 g of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in ultrapure water to obtain 10 mL of aqueous solution and kept at 4 °C in the dark; 0.1% AgNO_3 aqueous stock solution was prepared by dissolving 2 mg

of AgNO_3 in 2 mL of ultrapure water and used immediately.

Four different types of AuNPs (AuNP1, AuNP2, AuNP3 and AuNP4) were prepared using the method described previously (Abhijith et al., 2014; Ranjan et al., 2018) with minor modifications. In brief, 145 μL $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M) and 20 mg trisodium citrate (TC) were used to synthesize all AuNPs types. AuNP2, AuNP3 and AuNP4 contained 45 μL , 90 μL and 135 μL of AgNO_3 (0.1%) respectively. The reaction mixture was made up to the volume of 10 mL using ultrapure water and incubated for 10 minutes in the dark. Meanwhile, 40 mL of ultrapure water was allowed to boil in a 3-neck round bottom flask under reflux using a magnetic stirrer with a heating facility (RH basic 2, IKA, Germany). The flask was partially immersed in a glycerol filled glass jar, where glycerol served as a heat transfer medium.

Then the reaction mixture was transferred to the 3-neck round bottom flask under continuous stirring using a magnetic bead and allowed to react for 15 minutes. The final concentrations of the reactants were: 1.54 mM TC and 0.29 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in AuNP1; 1.54 mM TC, 0.29 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and 5.3 μM AgNO_3 in AuNP2; 1.54 mM TC, 0.29 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and 10.6 μM AgNO_3 in AuNP3; 1.54 mM TC, 0.29 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and 15.9 μM AgNO_3 in AuNP4. After 15 minutes, the solution was allowed to cool at room temperature. The synthesized AuNPs were transferred to glass vials and an aliquot of each AuNPs was analyzed for its spectrophotometric parameters (absorbance, λ_{max}) using UV-Vis spectrophotometer (Cary 60, Agilent technologies, USA).

Optimization of EDC and ED concentrations

Optimization of EDC and ED concentrations was performed to prevent AuNPs aggregation.

20 μL EDC at concentration $\geq 10 \mu\text{M}$ were added to 280 μL of synthesized AuNPs and the color change from red to purple-blue was observed as an indicator of AuNP aggregation. Similarly, ED ($\geq 10 \mu\text{M}$) was incubated with 280 μL of AuNPs to determine the optimal concentration that prevented aggregation.

Co-incubation of ED, ATP and AuNPs in the presence of EDC

Four incubation schemes were designed in which the first experiment set-up contained 470 μL deionized water and 30 μL ATP solution; the second experiment set-up involved incubation of individually synthesized AuNPs (410 μL) with 30 μL of ATP solution. The final volume was made up to 500 μL with water. The third experiment set-up included 410 μL AuNPs, 30 μL ATP, 30 μL EDC and 30 μL H_2O ; the fourth experiment included 410 μL AuNPs, 30 μL ATP, 30 μL EDC and 30 μL ED. The final concentrations of reagents in the solutions were 100 μM ATP, 100 μM EDC and 10 μM ED. The samples were incubated at 30°C for 60 minutes followed by performing the firefly luciferase bioluminescence assay. The pre-reaction mixture for the bioluminescent assay contained 300 μL tris-acetate buffer (pH, 7.8; 100 mM), 10 μL firefly luciferase (ca. 2 ng FLuc) and 10 μL luciferin (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Bioluminescent reaction was initiated by addition of incubated samples (10 μL) to the pre-reaction mixture. Luminescence measurements ($n=3$) were performed for 60 seconds using a luminometer (Glomax 20/20, Promega, USA) and values were reported as mean \pm SD.

Co-incubation of ED, FMN and AuNP1 in presence of EDC

Co-incubation of FMN and AuNP1 was carried out in the presence of ED and EDC. Four types of samples were prepared viz. 470 μL H_2O , 30 μL FMN; 410 μL AuNP1, 30 μL

FMN, 60 μL H_2O ; 410 μL AuNP1, 30 μL FMN, 30 μL EDC, 30 μL H_2O ; and 410 μL AuNP1, 30 μL FMN, 30 μL EDC, 30 μL ED. The final concentrations of reagents in the solutions were 0.1 mM FMN, 10 μM EDC and 10 μM ED. The pre-assay mixture contained 300 μL phosphate buffer (pH: 7.0, 100 mM); 10 μL BLuc and NADH:FMN oxidoreductase; 50 μL 0.0025% tetradecanal solution and 50 μL 0.5 mM NADH. Bioluminescent reaction was initiated by addition of incubated samples (10 μL) to the pre-assay mixture. The luminescence measurements ($n=3$) were performed for 60 seconds using a luminometer (Glomax 20/20, Promega, USA) and values were reported as mean \pm SD.

Results and discussion

Basic properties of synthesized gold nanoparticles

The synthesized gold nanoparticles (AuNP1-AuNP4) were faceted nanocrystals with localized surface plasmon resonance (LSPR) peak in the range of 520-535 nm (Fig. 1). The absorption maximum (Abs_{max}) and LSPR peak for AuNP1 was 0.99 and 520 nm respectively. AuNP2 had Abs_{max} of 1.24 and LSPR peak of 535 nm. Abs_{max} for AuNP3 and AuNP4 were 1.21 and 1.38 respectively and the LSPR peaks for AuNP3 and AuNP4 were 525 nm. The shift of the LSPR peak from blue towards red indicates that AuNP2, AuNP3 and AuNP4 exhibit a higher absorption in the red region than AuNP1 resulting in blue to purple colored AuNPs. Moreover, the shift tells about the size of AuNPs. The shift of LSPR peak towards the red region suggests increment in AuNPs size. Furthermore, higher visible absorbance of AuNPs indicates the higher concentration of nanoparticles. As the size increases, they tend to agglomerate and gradually settle to the bottom resulting in lower absorbance. However, it must be noted that a precise determination of AuNP concentration using this

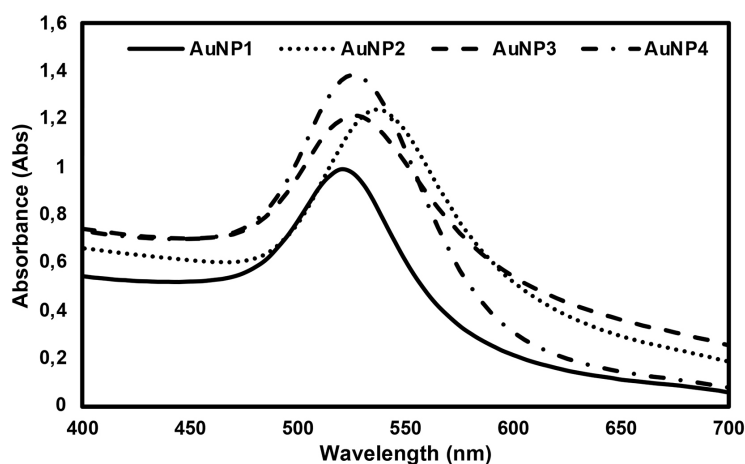


Fig. 1. Absorbance spectra of synthesized gold nanoparticles, AuNP1 (Abs_{max} : 0.99, λ_{max} : 520 nm); AuNP2 (Abs_{max} : 1.24, λ_{max} : 535 nm); AuNP3 (Abs_{max} : 1.21, λ_{max} : 525 nm); and AuNP4 (Abs_{max} : 1.38, λ_{max} : 525 nm)

method is rather difficult since the particles are not uniform in size. The yield of AuNPs followed the trend $AuNP4 > AuNP2 > AuNP3 > AuNP1$.

Effect of EDC and ED on AuNPs stability

AuNPs aggregation can be visually observed. It takes less than a minute to observe color change from red to blue or purple in case the agglomeration of AuNPs occurs (Ranjan et al., 2018). The stability of AuNPs depends upon the capping agent. In citrate-capped AuNPs, the anionic shielding imparted by the negatively charged citrate ions prevents aggregation due to anionic repulsion. However, in case positively charged species come in the vicinity of AuNPs, the anionic shielding disrupts via charge neutralization, ultimately leading to aggregation. It was noted that molar strengths greater than $10 \mu\text{M}$ for both EDC and ED led to partial or complete aggregation depending upon the method used for synthesizing AuNP.

Effect of ED and EDC on luminescence response in AuNPs based FLuc assay

Luminescence enhancement up to 1.44-fold compared to the control (ATP) was observed

predominantly in samples containing AuNP1 (Fig. 2, 1A, 1B, 1C). Ethylene diamine molecule has an amine group at its both ends and can form covalent bonds with the phosphate group of ATP and carboxylic group of AuNPs via coupling reactions. EDC is a water-soluble zero-length cross-linking agent which rapidly reacts with carboxylates or phosphates to form an active complex which allows coupling with amine-containing compounds (Hermanson, 2013). In the sample, containing ATP and AuNP1, a 1.32-fold luminescence enhancement was observed in post FLuc assay in comparison to control (Fig. 2, 1A). This increase in luminescence may be attributed to non-covalent weak interactions between positively charged adenine moieties of ATP and negatively charged citrate groups of AuNP1, which allowed optimal d_{L-NP} to promote MEB. When EDC was introduced, a partial drop of 8.6% in luminescence was observed in comparison to the sample containing ATP and AuNP1 (Fig. 2, 1B). Moreover, partial aggregation was clearly visible in this case as the color change occurred. In a reaction with a carboxyl group EDC forms isourea as a by-product. Therefore, it is highly probable that the amine group of adenine present in ATP participates in the coupling reaction with

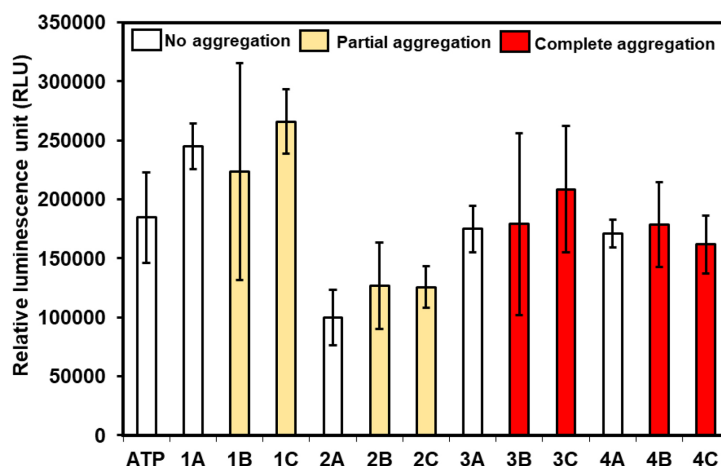


Fig. 2. Effect of ATP, gold nanoparticles (AuNP1 – AuNP4), carbodiimide (EDC), and ethylene diamine (ED) on luminescence response in firefly luciferase assay system. ATP: assay sample containing only ATP (control); 1A: ATP, AuNP1; 1B: ATP, AuNP1, EDC; 1C: ATP, AuNP1, EDC, ED; 2A: ATP, AuNP2; 2B: ATP, AuNP2, EDC; 2C: ATP, AuNP2, EDC, ED; 3A: ATP, AuNP3; 3B: ATP, AuNP3, EDC; 3C: ATP, AuNP3, EDC, ED; 4A: ATP, AuNP4; 4B: ATP, AuNP4, EDC; 4C: ATP, AuNP4, EDC, ED. Error bars show standard deviation for samples ($n=3$)

a carboxylic acid group of citrate-capped AuNP1. Covalent coupling between ATP and AuNP1 accompanied by the formation of a byproduct during the reaction might be responsible for this lowering of luminescence. Interestingly, when ED was introduced, the highest luminescence was observed (Fig. 2, 1C). The parametric conditions were favorable to observe MEB. However, no luminescence enhancement was observed when AuNP2, AuNP3 and AuNP4 were used for MEB. This result justifies the importance of the size, shape and nature of the nanomaterial used in MEB studies. Moreover, a complete aggregation was observed in the samples where ED and EDC were incubated with AuNP3 and AuNP4. The stability of AuNPs containing silver was found to be much lower than that of AuNP1. Hence further studies were carried out using AuNP1.

Effect of ED and EDC on BLuc assay containing AuNP1

The combinations of FMN and AuNP1 and of FMN, AuNP1, ED and EDC did not enhance luminescence response when compared with the

control (Fig. 3). In contrast, in the sample consisting of FMN, EDC and AuNP1 luminescence was 1.3-fold higher. FMN or riboflavin 5'-phosphate has a light sensitive isoalloxazine ring and a terminal phosphate group. When FMN was incubated with AuNP1, weak interactions were the least possible since the conjugated ring has no apparent positive charges to electrostatically interact with citrate ions of AuNP1. The negative charges on the terminal phosphate group would repel AuNP1 and thus rule out such possibilities. MEB was not observed in this case since it is a distance dependent phenomenon. When FMN, AuNP1, ED and EDC were incubated together, the formation of phosphoramidate bond between the amine group of ED and the phosphate group of FMN was possible. The other free amine group of ED might have interacted with a carboxyl group of AuNP1, but the d_{L-NP} could have been unsuitable for obvious bioluminescence enhancement to occur. However, the systems with FMN, EDC and AuNP1 showed MEB, which suggests a close interaction of FMN with AuNP1 (at less than 10 nm).

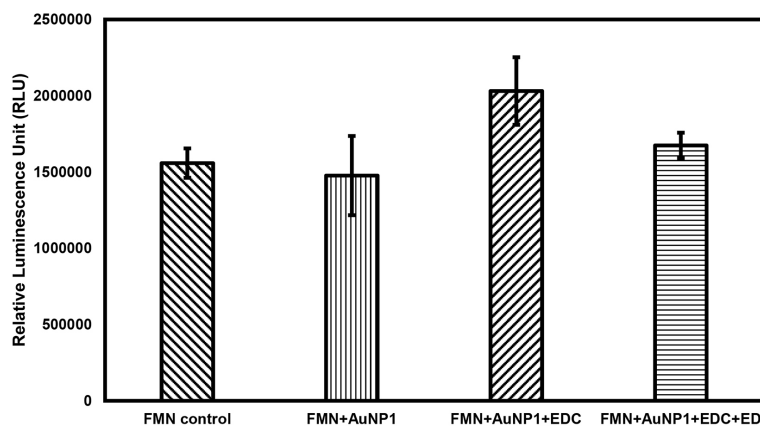


Fig. 3. Effect of flavin mononucleotide (FMN), gold nanoparticles (AuNP1), carbodiimide (EDC), and ethylene diamine (ED) on luminescence response in bacterial luciferase assay system. Error bars show standard deviation for samples ($n = 3$)

Conclusion

The study emphasizes the role of distance (d_{L-NP}) and the size, shape and nature of nanomaterials in observed MEB. Though the luminescence enhancement was below 1.5-fold, the role of ED and EDC in modulating luminescence is highlighted. ED as a linker was found to be a useful tool for understanding the distance-dependent MEB phenomenon. It is worth mentioning that when ED was used to covalently bind with ATP using EDC, luminescence enhancement was observed. On

the contrary, when this method was applied using FMN instead of ATP, no substantial MEB was observed. In AuNP2, AuNP3 and AuNP4 silver ions played a negative role in MEB. It is highly probable that silver ions form a layer around these AuNPs and prevent covalent or ionic interactions between AuNPs, ED and bioluminescent substrates such as ATP or FMN. Luminescence enhancement approach seems to provide auspicious tools to design ultra-sensitive biosensors, therefore extensive research into this area is highly desirable.

Acknowledgements

The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research [Project no. 16-34-60100] and by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (projects No. FSRZ-2020-0006).

References

- Abhijith K.S., Sharma R., Ranjan R., Thakur M.S. (2014) Facile synthesis of gold–silver alloy nanoparticles for application in metal enhanced bioluminescence. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(7): 986-991
- Du J., Jin J., Liu Y., Li J., Tokatlian T., Lu Z., Segura T., Yuan X.B., Yang X., Lu Y. (2014) Gold-nanocrystal-enhanced bioluminescent nanocapsules. *ACS Nano*, 8(10): 9964-9969
- Eltzov E., Prilutsky D., Kushmaro A., Marks R.S., Geddes C.D. (2009) Metal-enhanced bioluminescence: An approach for monitoring biological luminescent processes. *Applied Physics Letters*, 94(8): 083901

Geddes C.D., Geddes C.D. (2012) Metal-enhanced bioluminescence: an approach for monitoring biological bioluminescent processes. United States patent application US 13/201,878

Geddes C.D. (2014) Voltage-gated metal-enhanced fluorescence, chemiluminescence or bioluminescence methods and systems. United States patent US 8,679,855

Golberg K., Elbaz A., McNeil R., Kushmaro A., Geddes C.D., Marks R.S. (2014) Increased bioassay sensitivity of bioactive molecule discovery using metal-enhanced bioluminescence. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(12): 2770

Hermanson G.T. (2013) *Bioconjugate techniques*. Academic Press, 1200 p.

Ranjan R., Esimbekova E.N., Kirillova M.A., Kratasyuk V.A. (2017) Metal-enhanced luminescence: current trend and future perspectives – a review. *Analytica Chimica Acta*, 971: 1-13

Ranjan R., Kirillova M.A., Esimbekova E.N., Zharkov S.M., Kratasyuk V.A. (2018) Agglomeration behavior of lipid-capped gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 20(4): 107

DOI 10.17516/1997-1389-0320

УДК 577

Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* B-10646 from Mixtures of Oleic Acid and 3-Hydroxyvalerate Precursors

**Natalia O. Zhila^{a,b*},
Galina S. Kalacheva^a, Viktoriya V. Fokht^b,
Svetlana S. Bubnova^b and Tatiana G. Volova^{a,b}**

*^aInstitute of Biophysics SB RAS
FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”*

Krasnoyarsk, Russian Federation

^bSiberian Federal University

Krasnoyarsk, Russian Federation

Received 09.12.2019, received in revised form 12.03.2020, accepted 29.03.2020, published online 22.05.2020

Abstract. Polyhydroxyalkanoates have attracted much attention as biodegradable alternative to petroleum-based synthetic plastics. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] copolymer is one of the best characterized PHA copolymers because of its high commercial potential. However, commercial use of PHAs has been limited by their high price. One approach to reducing the cost of PHA production is to use inexpensive carbon sources (fatty acids, plant oils, etc.). The aim of this work was to study synthesis of P(3HB-co-3HV) by the *Cupriavidus necator* B-10646 bacterium grown on oleic acid and different biochemical precursors of 3HV. Bacterial cells were grown for 72 h at 30°C and 200 rpm on an incubator shaker. Salts of propionic or valeric acids were used as precursors of 3HV. The content and the composition of the polymer were determined by gas chromatography of fatty acid methyl esters. Lipids and polymer were extracted from biomass using the method of Folch. The addition of potassium propionate and valerate did not inhibit bacterial growth and polymer synthesis, the cell concentration and polymer content reaching 9.3-9.5 g/L and 80-83%, respectively. The addition of potassium valerate or propionate led to the synthesis of (P(3HB-co-3HV)) copolymer containing 21.2 and 14.3 mol% of 3HV, respectively. The number average molecular weight (M_n) of the polymer synthesized by the bacterium on oleic acid alone was 220 kDa; the polydispersity of the polymer was 3.5. The polymer synthesized in the presence of potassium valerate and propionate was characterized by a lower M_n (156-178 kDa) and a higher polydispersity of the polymer (4.4-4.9). The main fatty acids (FA) of intracellular lipids were oleic (33.26% of the total FA) and palmitic acid (27.48% of the total

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: nzhila@mail.ru

ORCID: 0000-0002-6256-0025 (Zhila N.); 0000-0001-9392-156X (Volova T.)

FA). The addition of potassium propionate or valerate did not cause any significant changes in the composition of the FA of intracellular lipids of the strain studied. This study demonstrates the ability of *C. necator* B-10646 to synthesize P(3HB-co-3HV) from mixtures of oleic acid and 3HV precursors. The data obtained can be used to develop and implement an economically feasible process of the P(3HB-co-3HV) production.

Keywords: *Cupriavidus necator*, 3-hydroxyvalerate, oleic acid, molecular weight, fatty acids.

Citation: Zhila N.O., Kalacheva G.S., Fokht V.V., Bubnova S.S., Volova T.G. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* B-10646 from mixtures of oleic acid and 3-hydroxyvalerate precursors. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2020, 13(3), 331-341. DOI: 10.17516/1997-1389-0320

**Биосинтез поли(3-гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата)
бактериями *Cupriavidus necator* B-10646,
культивируемыми на смеси из олеиновой кислоты
и предшественников 3-гидроксивалерата**

**Н.О. Жила^{а,б}, Г.С. Калачева^а,
В.В. Фохт^б, С.С. Бубнова^б, Т.Г. Волова^{а,б}**

^аИнститут биофизики СО РАН
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск
^бСибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. Полигидроксиалканоаты (ПГА) привлекают большое внимание в качестве биоразлагаемой альтернативы синтетическим пластикам. Сополимер поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат) [П(ЗГБ-со-ЗГВ)] является одним из наиболее охарактеризованных сополимеров ПГА из-за его высокого коммерческого потенциала. Однако применение ПГА, и в частности П(ЗГБ-со-ЗГВ), ограничено их высокой ценой. Одним из подходов к снижению стоимости производства ПГА является использование недорогих источников углерода (жирных кислот, растительных масел и др). Целью этой работы было исследование синтеза сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ) бактериями *Cupriavidus necator* B-10646, культивируемыми на олеиновой кислоте с разными биохимическими предшественниками ЗГВ. Бактерии выращивали в течение 72 ч в термостатируемом шейкере-инкубаторе при 30 °С и 200 об/мин. В качестве предшественников ЗГВ использовали соли пропионовой или валериановой кислоты. Содержание и состав полимера определяли газовой хроматографией метиловых эфиров жирных кислот. Липиды и полимер экстрагировали из биомассы по методу Фолча. Добавление пропионата и валерата калия не ингибировало рост бактерий и синтез полимера. Урожай биомассы и содержание полимера составляло соответственно 9,3-9,5 г/л

и 80-83 % от веса сухой биомассы. Использование валерата или пропионата калия привело к синтезу бактериями сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ) с включением ЗГВ соответственно 21,2 и 14,3 мол. %. Среднечисловая молекулярная масса (M_n) полимера, синтезируемого бактериями при росте исключительно на олеиновой кислоте, составляла 220 кДа, полидисперсность полимера – 3,5. Полимер, синтезируемый в присутствии пропионата или валерата калия, характеризовался более низкой M_n (156-178 кДа) и более высокой полидисперсностью (4,4-4,9). Основными жирными кислотами (ЖК) внутриклеточных липидов бактерий, культивируемых только на олеиновой кислоте, были олеиновая (33,26 % от суммы ЖК) и пальмитиновая кислоты (27,48 % от суммы ЖК). Добавление пропионата или валерата калия не привело к значительным изменениям в составе ЖК внутриклеточных липидов исследуемого штамма. Таким образом, показана способность *C. necator* В-10646 синтезировать П(ЗГБ-со-ЗГВ) при росте на смеси из олеиновой кислоты и предшественников ЗГВ. Полученные данные могут быть использованы для разработки и осуществления экономически обоснованного процесса производства П(ЗГБ-со-ЗГВ).

Ключевые слова: *Cupriavidus necator*, 3-гидроксивалерат, олеиновая кислота, молекулярная масса, жирные кислоты.

Цитирование: Жила, Н.О. Биосинтез поли(3-гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646, культивируемыми на смеси из олеиновой кислоты и предшественников 3-гидроксивалерата / Н.О. Жила, Г.С. Калачева, В.В. Фохт, С.С. Бубнова, Т.Г. Волова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(3). С. 331-341. DOI: 10.17516/1997-1389-0320

Введение

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются запасными полимерами, накапливаемыми в цитоплазме многих микроорганизмов. Биотехнологическая продукция ПГА всесторонне исследуется из-за их термопластических свойств и биоразрушаемости (Steinbüchel, 2001). Поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) – самый распространенный представитель ПГА. Однако в связи с высокой кристалличностью и слабой эластичностью П(ЗГБ) наибольший интерес вызывают сополимеры 3-гидроксибутирата с другими мономерами, например с 3-гидроксивалератом (ЗГВ), характеризующиеся лучшими физическими свойствами (Chen et al., 2006). Первая попытка выпускать сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) под торговой маркой БИОПОЛ (BIOPOL™) была предпринята фирмой «Имперская химическая индустрия»

(ICI) в 1981 г. (Holmes, 1985). В результате периодического культивирования бактерий на глюкозе и пропионовой кислоте получали сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) с включением ЗГВ 20 мол. % (Choi, Lee, 1999). В настоящее время показана возможность получения сополимеров с более высоким включением ЗГВ (до 50-70 мол. %) (Shantini et al., 2013; Berezina, Yada, 2016). Однако следует отметить, что прекрасной прочностью и эластичностьюобладают уже сополимеры с содержанием ЗГВ на уровне 20-25 мол. % (Luzier, 1992), что делает возможным их использование для изготовления нанокompозитов и медицинских изделий (Yu, Qin, 2014).

На сегодняшний день полная стоимость продукции ПГА намного выше по сравнению с пластиками, получаемыми химическим путем. Одним из основных факторов высокой

стоимости ПГА является цена субстратов для роста бактериальных штаммов и синтеза полимера. В связи с этим поиск дешевых источников углерода с целью получения ПГА, а также ПГА сополимеров по более привлекательной цене – важная исследовательская задача. В качестве углеродных субстратов для синтеза ПГА могут быть использованы различные отходы сельскохозяйственных производств, например сыворотка (Ahn et al., 2001), меласса (Solaiman et al., 2006; Oliveira et al., 2007), животные жиры (Riedel et al., 2015), растительные масла (Fukui, Doi, 1998; Lee et al., 2008; Sudesh et al., 2011; López-Cuellar et al., 2011). Кроме того, рядом исследователей показана возможность синтеза ПГА на жирных кислотах: олеиновой, миристиновой, стеариновой, пальмитиновой, лауриновой (Chee et al., 2010; Ramachandran et al., 2011), однако информации о производителе и степени чистоты жирных кислот в этих работах не имеется.

Наиболее подходящими являются липидоподобные субстраты, а именно растительные масла и жирные кислоты, так как их использование приведет к получению более высоких урожаев ПГА и, следовательно, будет сопровождаться снижением стоимости продукции ПГА (Akiyama et al., 2003; Loo, Sudesh, 2007). Показано, что растительные масла могут значительно улучшить биосинтез ПГА по сравнению с сахарами, которые обычно используют для культивирования бактерий, накапливающих ПГА (Kahar et al., 2004). Кроме того, такие субстраты содержат больше углерода по отношению к массе по сравнению с углеводами. Установлено, что при использовании растительного масла экономический коэффициент по субстрату составляет 0,8, тогда как при использовании глюкозы в качестве единственного источника углерода он снижается до 0,3 (Akiyama et al., 2003).

Целью этой работы было исследование возможности *Cupriavidus necator* B-10646 синтезировать сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) при выращивании бактерий на олеиновой кислоте с разными биохимическими предшественниками мономера ЗГВ.

Материалы и методы

Бактерии *C. necator* B-10646 выращивали в периодическом двухстадийном режиме, разработанном ранее для синтеза ПГА. Для выращивания бактерий за основу была принята минеральная среда Шлегеля следующего состава: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -9,1; KH_2PO_4 -1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,025; NH_4Cl -1,0 (г/л) и раствор микроэлементов (H_3BO_3 -0,288; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,030; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,008; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,176; NaMoO_4 -0,050; NiCl_2 -0,008 (г/л).

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 1 л, заполненных культурой на 40 % от объема, на термостатируемом шейкере-инкубаторе Innova® серии 44 (New Brunswick Scientific, США) при 30 °С. В качестве углеродного субстрата использовали олеиновую кислоту (АО «ЭККОС-1», Россия; степень чистоты 98-99 %) в концентрации 10 г/л (контрольная культура). По мере истощения субстрата в течение культивирования делали добавки олеиновой кислоты в концентрации, аналогичной исходной. Для синтеза сополимеров с ЗГВ в культуру, растущую на олеиновой кислоте, на 48 ч культивирования добавляли валерат или пропионат калия в концентрации 1 г/л. Длительность культивирования составляла 72 ч. Все эксперименты проведены в трех повторностях.

Урожай биомассы клеток в ходе развития культуры бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры. Содержание олеиновой кислоты

в среде находили после экстракции ее гексаном на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A/5975C (США). Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A/5975C (США). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием гельпроникающей хроматографии (хроматограф Agilent Technologies 1260 Infinity (США)) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность ($PD = M_w/M_n$).

Липиды и полимер экстрагировали из биомассы смесью хлороформ-метанол (2:1) по методу Фолча, предварительно отмывая биомассу от олеиновой кислоты кратковременной обработкой гексаном. В конечном экстракте полимер отделяли от липидов осаждением при добавлении двойного объема гексана. Далее проводили метанолиз для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) путем добавления смеси метанола и серной кислоты (50:1 по объему) в течение 2 ч при 90 °С. Анализ МЭЖК осуществляли на хромато-масс-спектрометре GC-MS 7890/5975C (Agilent Technologies, США). Условия анализа: газ-носитель – гелий, скорость 1 мл/мин; колонка HP-FFAP – 30 м, 0,25 мм, температура ввода пробы 220 °С; начальная температура хроматографирования 120 °С; подъем температуры до 230 °С со скоростью 5 °С/мин, изотермальный режим 5 мин и последующий подъем температуры до 310 °С со скоростью 10 °С/мин, изотермальный режим 3 мин; температура детектора 230 °С; температура источника ионов 150 °С; электронный удар при 70 eV; определение фрагментов с атомными массами от 30 до 550 amu при

0,5 с/скан. Идентификацию ЖК проводили по масс-спектрам и сравнением их времен удерживания с таковыми имеющихся стандартов (Serva, Германия; Sigma, США).

Результаты и обсуждение

Добавление солей органических кислот в исследуемой концентрации, валерата или пропионата калия (1 г/л), не ингибировало рост бактерий *C. necator* В-10646 и синтез полимера по сравнению с контрольным вариантом без добавления биохимических предшественников. Через 72 ч культивирования урожай биомассы бактерий составлял 9,3-9,5 г/л, содержание полимера – 80-83 % от веса сухой биомассы (табл. 1), что сопоставимо с данными, полученными при культивировании исследуемого штамма на сахарах (Zhila et al., 2015). Marangoni et al. (2000) установили, что использование олеиновой кислоты в качестве дополнительного субстрата (основной субстрат – глюкоза) приводило к увеличению продукции ПГА. Предполагается, что присутствие олеиновой кислоты усиливает работу ферментной системы синтеза ПГА из-за наличия двойной связи при С9 (Ramachandran et al., 2011). В результате β-окисления олеиновой кислоты увеличивается внутриклеточный пул ацетил-СоА и часть этого пула используется в качестве субстрата для биосинтеза ПГА. Кроме того, из-за окисления формируется дополнительный пул НАДФН (Lee, 1996). Увеличение продукции ПГА показано у *Aeromonas hydrophila*, *Cupriavidus necator* и рекомбинантного штамма *Escherichia coli* XY1-BluepSY1105, выращиваемых на олеиновой кислоте (Loo et al., 2005).

В составе полимера, синтезируемого *C. necator* В-10646 при росте на олеиновой кислоте, помимо 3-гидроксипутирата, являющегося доминирующим мономером (97,5 мол. %), идентифицированы в неболь-

Таблица 1. Показатели культуры бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646, культивируемых на олеиновой кислоте в присутствии предшественников синтеза ЗГВTable 1. Culture parameters of the *Cupriavidus necator* B-10646 bacterium grown on oleic acid and 3HV precursors

Субстрат	Урожай биомассы, г/л	Полимер, % от веса сухой биомассы	Состав полимера, мол. %			M _n , кДа	M _w , кДа	ПД
			ЗГВ	ЗГВ	ЗГГ			
Олеиновая кислота	9,4±0,4	83±5	97,5±0,4	2,0±0,1 ^a	0,5±0	220±12 ^a	775±21	3,5±0,1 ^a
Олеиновая кислота + валерат калия	9,3±0,5	80±5	78,3±0,4	21,2±0,2 ^b	0,5±0,1	178±11 ^b	790±31	4,4±0,2 ^b
Олеиновая кислота + пропионат калия	9,5±0,2	80±6	85,2±0,3	14,3±0,2 ^a	0,5±0,1	156±10 ^b	758±19	4,9±0,2 ^b
Достоверность эффекта, α=0,05	F = 0,11	F = 0,16	F = 3662			F = 11,2	F = 0,59	F = 26,3

Примечание: а-в – буквами показаны различия между средними.

ших количествах и другие мономеры, а именно 3-гидроксивалерат (2,0 мол. %) и 3-гидроксигексаноат (0,5 мол. %) (табл. 1). Следует отметить, что при росте на сахарах включение этих мономеров в полимер происходит только при наличии соответствующих прекурсоров (Volova et al., 2014; 2016). Появление 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата также наблюдали в составе полимера, синтезируемого *Alcaligenes* sp. NCIMNo 5085, выращенного на олеиновой кислоте (Srivastava, Tripathi, 2013). Кроме того, интересно отметить, что при росте на олеиновой кислоте – субстрате, содержащем четное количество атомов углерода, в составе полимера идентифицирован мономер с нечетным количеством атомов углерода (ЗГВ). Появление мономеров с нечетным количеством атомов углерода (3-гидроксигептаноата) показано также для *Pseudomonas putida* Bet001, выращенного на олеиновой кислоте (Gumel et al., 2012).

Добавление валерата калия в культуру бактерий *C. necator* B-10646 привело к

увеличению содержания ЗГВ в полимере до 21,2 мол. %. Добавление пропионата калия также привело к включению мономеров 3-гидроксивалерата в полимер, однако содержание ЗГВ было несколько ниже (14,3 мол. %) (табл. 1). Аналогичную ситуацию наблюдали Vhubalan et al. (2008), в работе которых показано более эффективное превращение валерата натрия в ЗГВ по сравнению с пропионатом натрия. Кроме того, в работе Doi et al. (1990) показано, что при использовании валериановой кислоты в качестве единственного источника углерода содержание мономеров ЗГВ было в 2 раза выше, чем при культивировании на пропионовой кислоте.

M_n и M_w полимера, синтезируемого бактериями при росте на олеиновой кислоте, составляли соответственно 220 и 775 кДа, полидисперсность полимера – 3,5 (табл. 1). При добавлении индукторов синтеза ЗГВ произошло достоверное снижение M_n до 156-178 кДа, что сопровождалось увеличением полидисперсности полимера до

4,4-4,9. Снижение M_n сополимеров с ЗГВ также наблюдали Chanprateer, Kulpreecha (2006).

Содержание и процентный состав жирных кислот (ЖК), входящих в состав цитоплазматической мембраны бактерий,

выращенных на олеиновой кислоте без добавления индукторов, а также с добавлением валерата и пропионата калия, приведены в табл. 2. Состав ЖК внутриклеточных липидов был исследован у бактерий в конце культивирования, в условиях максимальной

Таблица 2. Содержание жирных кислот внутриклеточных липидов бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 при росте на олеиновой кислоте в присутствии солей валериановой и пропионовой кислот (% от суммы ЖК, средние \pm стандартные ошибки)

Table 2. The fatty acid content of intracellular lipids of bacterium *Cupriavidus necator* B-10646 grown on oleic acid in the presence of salts of valeric and propionic acids (% of the total FA, average values \pm standard errors)

ЖК	Олеиновая кислота	Олеиновая кислота + валерат калия	Олеиновая кислота + пропионат калия
12:0	0,04 \pm 0,04	0,03 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01
i-14:0	0,10 \pm 0,06	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
14:0	3,50 \pm 0,01	3,66 \pm 0,02	3,43 \pm 0,06
14:1	0,16 \pm 0,06	0,14 \pm 0,14	0,20 \pm 0,04
i-15:0	0,31 \pm 0,03	0,37 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02
ai-15:0	0,60 \pm 0,04	0,61 \pm 0,02	0,60 \pm 0,02
15:0	0,61 \pm 0,003	0,45 \pm 0,01	0,29 \pm 0,04
15:1	0,05 \pm 0,01	0,03 \pm 0,02	0,04 \pm 0,04
i-16:0	0,24 \pm 0,00	0,24 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03
16:1 ω 9	0,99 \pm 0,05	0,86 \pm 0,03	0,72 \pm 0,01
16:1 ω 7	8,05 \pm 0,39	7,90 \pm 0,05	7,82 \pm 0,02
16:1 ω 5	0,08 \pm 0,04	0,13 \pm 0,13	0,13 \pm 0,06
16:0	27,48 \pm 1,11	28,04 \pm 1,05	28,92 \pm 1,06
17:0	0,42 \pm 0,82	0,39 \pm 0,02	0,48 \pm 0,01
i-17:0	0,16 \pm 0,05	0,15 \pm 0,07	0,16 \pm 0,01
ai-17:0	0,76 \pm 0,06	0,76 \pm 0,02	0,76 \pm 0,05
17:1	0,86 \pm 0,01	0,99 \pm 0,01	0,89 \pm 0,01
C-17:0 ^a	6,06 \pm 0,09	5,89 \pm 0,06	5,90 \pm 0,01
18:1 ω 9	33,26 \pm 2,57	31,24 \pm 4,02	33,96 \pm 3,06
18:1 ω 7	10,68 \pm 0,33	10,85 \pm 0,82	10,01 \pm 0,84
18:0	3,80 \pm 0,57	5,11 \pm 0,04	2,71 \pm 0,01
18:1	0,05 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02	0,41 \pm 0,04
C-19:0 ^a	1,48 \pm 0,01	1,49 \pm 0,03	1,45 \pm 0,01
19:1	0,18 \pm 0,06	0,15 \pm 0,02	0,33 \pm 0,04
20:0	0,08 \pm 0,04	0,09 \pm 0,04	0,08 \pm 0,04
Σ циклопропановых	7,54 \pm 0,11	7,38 \pm 0,08	7,35 \pm 0,023
Σ насыщ. ^б / Σ ненасыщ. ^в	0,84 \pm 0,03	0,90 \pm 0,01	0,83 \pm 0,034

Примечание: ^a – циклопропановая кислота; ^бнасыщ. – насыщенные жирные кислоты, включающие циклопропановую кислоту и ОН-кислоты; ^вненасыщ. – ненасыщенные жирные кислоты.

аккумуляции полимера. В составе ЖК внутриклеточных липидов бактерий, выращенных на олеиновой кислоте, идентифицированы насыщенные и моноеновые ЖК с длиной цепи от 12 до 20 атомов углерода. Основными ЖК были олеиновая (33,26 % от суммы ЖК) и пальмитиновая кислоты (27,48 % от суммы ЖК). ЖК, содержание которых превышало 1 % от суммы, представлены как насыщенными (миристиновая, 14:0; стеариновая, 18:0), так и моноеновыми (пальмитолеиновая, 16:1 ω 7 и цис-вакценовая, 18:1 ω 7) кислотами. Содержание циклопропановых кислот C-17:0 и C-19:0 составляло 7,54 % от суммы ЖК, что в несколько раз ниже, чем при культивировании исследуемого штамма на сахарах (Zhila et al., 2015). Кроме того, как было показано нами ранее, уровень циклопропановых кислот в липидах бактерий, выращиваемых на олеиновой кислоте, практически не менялся в ходе культивирования бактерий, тогда как при культивировании на сахарах отмечены значительные изменения уровня циклопропановых кислот (Zhila et al., 2015). Добавление пропионата или валерата калия в культуральную среду не привело к значительным изменениям в составе ЖК внутриклеточных липидов. Как и при выра-

щивании *C. necator* В-10646 только на олеиновой кислоте, основными ЖК внутриклеточных липидов бактерий были олеиновая (31,24-33,96 мол. %) и пальмитиновая (28,04-28,92 мол. %) кислоты.

Заключение

Исследован рост *C. necator* В-10646 и синтез полимера при выращивании бактерий на среде, содержащей олеиновую кислоту и субстраты – предшественники синтеза ЗГВ (пропионат и валерат калия). Бактерии синтезировали сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) с включением ЗГВ в долях 21,2 и 14,3 мол. % при использовании соответственно валерата и пропионата калия. Полимер, синтезируемый в присутствии предшественников синтеза ЗГВ, характеризовался более низкой M_n и высокой полидисперсностью по сравнению с полимером, полученным в отсутствие прекурсоров. Наличие предшественников синтеза ЗГВ не повлияло на состав ЖК экстрагируемых липидов бактерий. В результате выполненных исследований олеиновая кислота может рассматриваться в качестве перспективного основного субстрата для роста бактерий *C. necator* В-10646 и синтеза сополимеров с ЗГВ.

Благодарности / Acknowledgements

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 17-44-240775 и гос. задания № FSRZ-2020-0006.

This study was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Krasnoyarsk Territory, the Krasnoyarsk Regional Fund for the Support of Scientific and Scientific-Technical Activities (Project No. 17-44-240775) and State Assignment № FSRZ-2020-0006.

Список литературы / References

Ahn W.S., Park S.J., Lee S.Y. (2001) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 23(3): 235–240

- Akiyama M., Tsuge T., Doi Y. (2003) Environmental lifecycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability*, 80(1): 183–194
- Berezina N., Yada B. (2016) Improvement of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) production by dual feeding with levulinic acid and sodium propionate in *Cupriavidus necator*. *New Biotechnology*, 33(1): 231-236
- Bhubalan K., Lee W.H., Loo C.Y., Yamamoto T., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K. (2008) Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Polymer Degradation and Stability*, 93(1): 17-23
- Chanprateep S., Kulpreecha S. (2006) Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1): 51–56
- Chee J.-Y., Tan Y., Samian M.-R., Sudesh K. (2010) Isolation and characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) capable of producing polyhydroxyalkanoate (PHA) from triglycerides, fatty acids and glycerols. *Journal of Polymers and the Environment*, 18(4): 584–592
- Chen C.W., Don T.M., Yen H.F. (2006) Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry*, 41(11): 2289–2296
- Choi J.I., Lee S.Y. (1999) High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10): 4363–4368
- Doi Y., Segawa A., Nakamura S., Kunioka M. (1990) Production of biodegradable copolyesters by *Alcaligenes eutrophus*. *Novel biodegradable microbial polymers*. Dawes E.A. (ed.) The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, p. 37-48
- Fukui T., Doi Y. (1998) Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(3): 333–336
- Gumel A.M., Annuar M.S.M., Heidelberg T. (2012) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by *Pseudomonas putida* Bet001 isolated from palm oil mill effluent. *PLOS ONE*, 7(9): e45214
- Holmes P.A. (1985) Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, 16(1): 32–36
- Kahar P., Tsuge T., Taguchi K., Doi Y. (2004) High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*, 83(1): 79-86
- Lee S.Y. (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1): 1-14
- Lee W.-H., Loo C.-Y., Nomura C.T., Sudesh K. (2008) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource Technology*, 99(15): 6844–6851
- Loo C.Y., Sudesh K. (2007) Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, 2(2): 31–57

Loo C.Y., Lee W.H., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K. (2005) Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnology Letters*, 27(18): 1405–1410

López-Cuellar M.R., Alba-Flores J., Rodríguez J.N.G., Pérez-Guevara F. (2011) Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1): 74–80

Luzier W.D. (1992) Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(3): 839–842

Marangoni C., Furigo A., de Aragao G.M.F. (2000) Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. *Biotechnology Letters*, 22(20): 1635–1638

Oliveira F.C., Dias M.L., Castilho L.R., Freire D.M.G. (2007) Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 98(3): 633–638

Ramachandran H., Iqbal N.M., Sipaut C.S., Abdullah A.A. (2011) Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer with various monomer compositions by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(6): 867–877

Riedel S.L., Jahns S., Koenig S., Bock M.C.E., Brigham C.J., Bader J., Stahl U. (2015) Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. *Journal of Biotechnology*, 214: 119–127

Shantini K., Bhubalan K., Yahya A.R.M., Amirul A.A. (2013) Productivity increment of biodegradable and biorenewable copolymer containing 3-hydroxyvalerate monomer initiated by alcohols as precursor substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(7): 1364–1370

Solaiman D.K.Y., Ashby R.D., Foglia T.A., Marmer W.N. (2006) Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6): 783–789

Srivastava S.K., Tripathi A.D. (2013) Effect of saturated and unsaturated fatty acid supplementation on bio-plastic production under submerged fermentation. *3 Biotech*, 3(5): 389–397

Steinbüchel A. (2001) Perspective for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromolecular Bioscience*, 1(1): 1–24

Sudesh K., Bhubalan K., Chuah J.-A., Kek Y.-K., Kamilah H., Sridewi N., Lee Y.-F. (2011) Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5): 1373–1386

Volova T., Kiselev E., Vinogradova O., Nikolaeva E., Chistyakov A., Sukovaty A., Shishatskaya E. (2014) A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs. *PLOS ONE*, 9(2): e87551

Volova T.G., Syrvacheva D.A., Zhila N.O., Sukovaty A.G. (2016) Synthesis of P(3HB-co-3HHx) copolymers containing high molar fraction of 3-hydroxyhexanoate monomer by *Cupriavidus eutrophus* B10646. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(2): 416–425

Yu H.Y., Qin Z.Y. (2014) Surface grafting of cellulose nanocrystals with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Carbohydrate Polymers*, 101: 471-478

Zhila N., Kalacheva G., Volova T. (2015) Fatty acid composition and polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus eutrophus* B-10646 cells grown on different carbon sources. *Process Biochemistry*, 50(1): 69–78