

## АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ КЛЕТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ ГЕТЕРОПОЛИКИСЛОТАМИ

© 2023 г. Ф. И. Далидчик<sup>1</sup>, Л. И. Руссу<sup>2</sup>, О. А. Лопатина<sup>2</sup>, И. А. Суетина<sup>2</sup>, О. В. Бакланова<sup>2</sup>,  
Е. М. Балашов<sup>1,\*</sup>, С. А. Ковалевский<sup>1</sup>, М. В. Мезенцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

\*E-mail: embalashov@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.02.2022 г.

После доработки 19.06.2022 г.

Принята к публикации 19.06.2022 г.

Установлены корреляции иммуномодулирующих свойств гетерополикислот (ГПК) с жесткостью клеток-мишеней и количеством мембранного холестерина. Построена молекулярная модель точной активации генов иммуноактивных цитокинов гетерополикислотами. Интерпретированы особенности иммуномодулирующих свойств ГПК в отношении здоровых и раковых клеток (линии ФЭЧ, A549 и L41). Предложен механизм формирования повышенной противовирусной активности ГПК в отношении (+)оцРНК-вирусов. Обоснована возможность повышенной неспецифической противовирусной активности ГПК в отношении пандемических штаммов SARS-CoV-2, в инактивации которых могут принимать участие ГПК-активированные цитокины.

DOI: 10.56304/S1992722323020048

### ВВЕДЕНИЕ

Семейство цитокинов (ЦТ), насчитывающее несколько сотен пептидных и белковых молекул с массами 3–50 кДа, активно изучается с момента открытия наиболее значимых из них – интерферонов (ИФН) [1]. Как регуляторы межклеточных взаимодействий ИФН вместе с другими ЦТ участвуют во всех биохимических процессах жизненного цикла организма, включая процессы, формирующие иммунный ответ. Врожденный клеточный иммунный ответ определяет вероятность заражения, характер течения и исход многих заболеваний, в том числе вирусных, борьба с которыми составляет приоритетную задачу мирового здравоохранения [2].

Глобальные угрозы пандемии COVID-19 связаны прежде всего с мутациями вируса SARS-CoV-2 [3], высокая изменчивость и резистентность которого диктуют необходимость поисков новых противовирусных средств широкого спектра действия. Одно из наиболее перспективных направлений этих поисков предполагает активацию врожденного клеточного иммунитета [4].

В норме клетки имеют хорошо сбалансированную систему механизмов, использующих клеточные ЦТ и формирующих адекватный противовирусный иммунный ответ. Например, в случае гриппа иммунная система после распознавания патогена начинает продуцировать ИФН, активи-

зирующие экспрессию провоспалительных ЦТ, вызывающих адекватный воспалительный ответ. Последующая секреция противовоспалительных ЦТ, среди которых ключевую роль играет интерлейкин ИЛ-10, приводит к торможению репликации вирусных частиц (ВЧ), снижению воспалительного ответа, подавлению иммунопатологических процессов и заживлению возможных повреждений клеточных тканей. Иммунный клеточный ответ на вирус SARS-CoV-2 иной [5]. Синтез ИФН здесь запускается с достаточно большой задержкой и в меньшей степени. Первичный воспалительный ответ при этом может быть чрезмерным. Активности противовирусных агентов может оказаться недостаточно для подавления процессов репликации ВЧ. Как следствие, становятся возможными неконтролируемое продуцирование ЦТ и быстрое развитие гиперцитокинемии, которое приводит к летально опасной полиорганной недостаточности, так называемому “цитокиновому шторму” [6]. По современным представлениям неадекватный клеточный иммунный ответ является ключевой детерминантой патогенеза всех осложненных заболеваний COVID-19 [7, 8]. Поэтому требуются новые молекулярные иммуномодуляторы со свойствами регуляторов и провоспалительных, и противовоспалительных ЦТ. На роль таких модуляторов могут претендовать соединения гетерополикислот (ГПК) – обширной

группы полиоксометаллатов (ПОМ), все свойства которых, в том числе биологические, допускают тонкую целевую подборку [9–11].

Давно известные, во многом уникальные, биологические свойства ПОМ недавно были дополнены примерами повышенной противовирусной активности ГПК в отношении флави- и коронавирусов [12–14] и ГПК-стимулированной экспрессии генов иммуноактивных ЦТ в нормальных фибробластах эмбриона человека (ФЭЧ) и раковых (A549 и L 41) клетках [15–17]. Природа новых, перспективных для борьбы с вирусными инфекциями, биологических свойств ГПК в литературе до сих пор не обсуждалась.

Цель настоящей работы – анализ и систематизация экспериментальных результатов, полученных в [12–17], и построение на этой основе молекулярных моделей биохимических процессов, определяющих повышенные противовирусные свойства ГПК в отношении (+)оцРНК-вирусов и формирующих уникальные иммуномодулирующие свойства ГПК в отношении нормальных и раковых клеток.

Решения этих задач, приведенные ниже, получены с учетом выводов работ [18–20], в которых впервые был обнаружен и интерпретирован новый, фундаментальный для биохимии ПОМ эффект – истощение многозарядными анионами ГПК холестерина в бислойных липидных мембранах, позволивший построить протонно-анионную модель многоэтапного (последовательного) разрушения клеток и ВЧ водными растворами ГПК. Молекулярная модель формирования иммуномодулирующих свойств ГПК, предложенная в настоящей работе, учитывает не замеченные ранее корреляции иммуноактивных ГПК с механическими свойствами клеток-мишеней, их жесткостью.

Новые результаты, полученные в работе, дают простое объяснение природы повышенной противовирусной активности ГПК в отношении флави- и коронавирусов, бислойные липидные мембраны которых формируются из внутриклеточных, т.е. малохолестериновых, липидных мембран. Высокая активность ГПК при этом объясняется совместным действием двух механизмов инактивации ВЧ. Один из них связан с прямым разрушением ВЧ многозарядными анионами ГПК. Такое разрушение описывается протонно-анионной моделью, построенной в [19, 20], где изучались процессы инактивации вирусов гриппа А концентрированными водными растворами ГПК Кеггина (25–250 мкМ). Второй механизм, впервые обозначенный в [15–17], связан с воздействием на ВЧ иммуноактивных (противовирусных) ЦТ, которые при концентрациях 0.5–15 мкМ, представляющих наибольший интерес, продуцируются клетками при разрушении ВЧ гетерополикислотами. Отметим, что во множество ВЧ с малохоле-

стериновыми липидными мембранами помимо флави- и коронавирусов [12, 13] и коронавирусов [14] входят пандемические штаммы SARS-CoV-2 [21, 22]. Возможность инактивации этих вирусов растворами ПОМ продемонстрирована в [23].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

*Материалы.* Использовали водные растворы гетерополикислот Кеггина  $H_3PW_{12}O_{40}$ ,  $H_3PMo_{12}O_{40}$ ,  $H_4SiW_{12}O_{40}$ ,  $H_4SiMo_{12}O_{40}$  (с начальными концентрациями 0.01 мкМ), воздействовавшие на перевиваемые линии клеток ФЭЧ, а также онкоклетки карциномы легкого человека (A549) и клетки костного мозга больного лейкемией (L41), полученные из коллекции культур клеток ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава РФ. Клетки культивировали в средах Игла и Игла МЭМ производства ГУ НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им М.П. Чумакова РАМН. В культуральную среду добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки фирмы “ПанЭко”.

*Методы.* Цитотоксическое действие ГПК Кеггина определяли с помощью метилтетразолиевого теста. Клетки рассеивали на 96-луночную панель фирмы Wink в концентрации  $2 \times 10^5$  кл./мл в каждую лунку в объеме 100 мкл с последующим внесением растворов ГПК в количестве 100 мкл в разведениях от 1/2 до 1/2048. Клетки инкубировали в термостате при 37°C в атмосфере с 5%-ной  $CO_2$  при 98%-ной влажности в течение 72 ч.

Определение активности мРНК цитокинов в клетках после воздействия на них ГПК проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Клетки помещали в шестилуночные панели в концентрации  $2 \times 10^5$  кл./мл, инкубировали 24 ч до образования монослоя. Затем после смены среды в лунки вносили разбавленные водные растворы ГПК (для разведений начальных 1/10, 1/20, 1/100, 1/500). Экспрессию генов интерлейкина ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, фактора некроза опухолей (ФНО) ФНО- $\alpha$ , интерферона ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , ИФН- $\lambda$ 1, ИФН- $\lambda$ 2, ИФН- $\lambda$ 3 оценивали по активности их мРНК. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2.5%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758) (17–19). В качестве положительного контроля использовали  $\beta$ -актин.

Уровень продукции цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИФН- $\alpha$  определяли методом иммуноферментного анализа на коммерческих тест-системах согласно протоколу фирмы-производителя Вектор-Бест (Новосибирск).

**Таблица 1.** ГПК-стимулированное продуцирование цитокинов клетками ФЭЧ

Образец	ИЛ-4, пг/мл	ИЛ-8, пг/мл	ИЛ-2, пг/мл	ИЛ-10, пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	ИФН-α, пг/мл
Контроль клеток ( $M \pm m$ )	1.67 ± 1.53	250.30 ± 4.18	6.87 ± 1.81	1.83 ± 0.25	361.53 ± 5.42	11.87 ± 10.33
H <sub>3</sub> PW <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ( $M \pm m$ )	0.4 ± 0.00	255.63 ± 0.90	4.57 ± 0.15	1.33 ± 0.32	381.53 ± 3.47*	20.57 ± 0.78
H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ( $M \pm m$ )	0.4 ± 0.00	245.33 ± 5.51	4.20 ± 0.40	3.07 ± 0.72	327.27 ± 47.43	5.00 ± 0.00
H <sub>4</sub> SiW <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ( $M \pm m$ )	0.4 ± 0.00	255.67 ± 0.45	1.17 ± 0.32**	1.0 ± 0.00**	401.80 ± 0.56**	5.00 ± 0.00
H <sub>4</sub> SiMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ( $M \pm m$ )	0.4 ± 0.00	249.77 ± 8.62	1.97 ± 0.12*	1.50 ± 0.1**	419.30 ± 1.37**	5.00 ± 0.00

Примечание.  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – стандартная ошибка.

\* Достоверность различий, определяемая по критерию Стьюдента (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ).

**Таблица 2.** Влияние ГПК на экспрессию генов цитокинов в культуре клеток ФЭЧ-Т

ГПК	Наличие (+)/отсутствие (–) мРНК цитокинов в клетках ФЭЧ-Т								
	ИФН-α	ИФН-β	ИФН-γ	ИФН-λ	ИЛ-1β	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-18	ФНО-α
H <sub>3</sub> PW <sub>12</sub> O <sub>40</sub>	+	+	+	+	+	+	–	+	+
H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub>	+	+	+	+	+	+	–	+	+
H <sub>4</sub> SiW <sub>12</sub> O <sub>40</sub>	+	+	+	+	+	+	–	+	+
H <sub>4</sub> SiMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub>	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Контроль клеток без ГПК	–	–	–	–	–	–	+	–	–

### РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Активация экспрессии генов иммуноактивных цитокинов гетерополиокислотами (эксперимент [15–17]). Результаты экспериментов, характеризующие особенности ГПК-активации (и дезактивации) экспрессии генов ЦТ в нормальных и онкоклетках, приведены в табл. 1–3. Основными, установленными в работе, особенностями клеточной активации генов ЦТ гетерополиокислотами отметим ярко выраженные зависимости этих процессов от элементного состава ГПК и выбора клеток-мишеней. Эти особенности, дополненные корреляциями результатов, полученных инструментальными методами анализа, с механическими свойствами клеточных мишеней, будут использованы ниже при формулировке молекулярных моделей образования частиц-паттернов в условиях воздействия ГПК на незараженные клетки, нормальные и раковые (линии ФЭЧ, A549 и L 41) [15–17], а также на клетки почки собаки, HeLa и Vero, зараженные флавивирусами [12, 13] и коронавирусами [14].

Отметим также, пользуясь табл. 1, возможность сосуществования разнонаправленных изменений уровней продуцирования про- и противовоспалительных ЦТ. Это имеет место, например, для H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>. При выраженном (почти двукратном)

увеличении количества интерферона (ИФН-α) здесь может наблюдаться значительное снижение уровня провоспалительных ЦТ, что представляет интерес в связи с отмеченной выше необходимостью коррекции ЦТ-системы на начальном этапе заболевания COVID-19 [5–8]. Особый интерес представляют и случаи активации ИФН на фоне дезактивации ИЛ-10.

Интерфероны, в частности α, β и γ, снижают пролиферацию инфицированных клеток, активно ограничивая общее распространение вирусов. Терапевтический эффект ИФН на ранних этапах различных вирусных заболеваний, в том числе вызванных вирусом SARS-CoV-2, хорошо известен [24, 25]. Однако роль ИЛ-10 в генезисе вирусных заболеваний может быть неоднозначной [26]. Давно известный как мощный противовоспалительный депрессант в тяжелых случаях COVID-19, особенно на ранних этапах этого заболевания, ИЛ-10 может приобретать свойства активного провоспалительного агента, способствующего развитию полиорганной недостаточности (цитокинового шторма). В этой связи можно отметить, что в ряде работ последних лет ставилась сложная поисковая задача, нацеленная на синтез эффективных и селективных ингибиторов ИЛ-10 (например, [28]). Согласно данным табл. 2 такими ингибиторами могут быть ГПК Кеггина.

**Таблица 3.** Особенности ГПК-экспрессии генов цитокинов в раковых клетках

ГПК	Клетки	Наличие (+)/отсутствие (–) мРНК цитокинов в раковых клетках									
		ИФН- $\alpha$	ИФН- $\beta$	ИФН- $\gamma$	ИФН- $\lambda$	ИЛ1- $\beta$	ИЛ-2	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ФНО
$H_3PW_{12}O_{40}$	A549	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	L41	–	+	+	+	–	–	–	+	–	–
$H_4SiW_{12}O_{40}$	A549	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
	L41	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–
$H_4SiMo_{12}O_{40}$	A549	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	L41	+	–	+/-	–	–	–	+/-	–	+/-	+/-
$H_3PMo_{12}O_{40}$	A549	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
	L41	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–
Контроль клеток без ПОМ	A549	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–
	L41	+	–	+/-	–	–	–	+/-	–	+/-	+/-

Современная практика применения ЦТ-профилей в качестве маркеров каких-либо заболеваний или патологий исходит из предположения о зависимости механизмов синтеза различных ЦТ от функционального состояния соответствующих клеток-продуцентов. Для ГПК-стимулированной клеточной активации экспрессии генов ЦТ эту зависимость демонстрируют результаты экспериментов [15–17], собранные в табл. 1–3. Анализ этих результатов приводит к построению молекулярной модели клеточной ГПК-регуляции синтеза ЦТ, что подтверждает выводы [15–17] о возможном участии ЦТ в формировании противовирусной активности ПОМ, действующих на зараженные клетки.

Анализируя табл. 2, 3, можно заметить более высокую активность ГПК в случае клеток ФЭЧ по сравнению с онкоклетками (A549 и L41). Действительно, для клеток ФЭЧ изменения уровней мРНК достоверно наблюдаются для всех ЦТ и всех четырех ГПК. В отношении раковых клеток изменения уровней мРНК цитокинов наблюдались значительно реже. Для клеток A549 такие изменения (снижение мРНК интерлейкина ИЛ-10) были отмечены только для  $H_3PW_{12}O_{40}$ . В случае онкоклеток L41 синтез мРНК всех интерферонов для всех ГПК был большим, но все же вдвое меньше, чем в случае нормальных клеток ФЭЧ. Для клеток L41 примерно в половине экспериментов наблюдалась специфическая ГПК-стимулированная экспрессия генов ИЛ-8, -10 и -18, а также генов ИФН- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  и - $\lambda$ . При этом уровень генов ФНО для всех гетерополиоксидов оставался практически неизменным.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> В норме и ФНО, и ИНФ играют ключевые роли в формировании локального иммунного ответа на вирусные и раковые паттерны. Но в случае раковых клеток, как следует из данных табл. 3, роли ИНФ и ФНО могут различаться. Влияние ИНФ здесь, видимо, преобладает.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несовпадение иммуномодулирующих свойств ГПК для раковых и нормальных клеток, впервые обнаруженное в [15–17], – факт, в целом, ожидаемый, поскольку эти клетки кардинально различаются и по строению, и по своим биологическим (функционально значимым) свойствам [29, 30]. Столь же естественен и факт снижения иммунного ответа на действие ГПК при раковом перерождении клеток. Клетки нередко прибегают к различным адаптациям своих биологических свойств к меняющимся внешним условиям. Итогом адаптаций оказывается снижение активности естественных защитных механизмов, в частности возникновение лекарственной устойчивости.

*Корреляции иммуномодулирующих свойств ГПК с механическими свойствами клеток-мишеней и содержанием в них мембранного холестерина.* Чтобы установить природу адаптаций раковых клеток к воздействию ГПК, рассмотрим корреляции иммунного ответа с механическими свойствами нормальных и онкоклеток. Для этого, учитывая отмеченные выше особенности ГПК-стимулированной экспрессии генов ЦТ в здоровых (ФЭЧ) и в раковых (L41 и A549) клетках, запишем строгие неравенства для иммуномодулирующих активностей (ИА) ГПК, действующих на соответствующие клетки-мишени:

$$\text{ИА (ФЭЧ)} > \text{ИА (L41)} > \text{ИА (M459)}. \quad (1)$$

Принципиально важно, что неравенства (1), как можно убедиться, положительно коррелируют с жесткостями (модулями Юнга,  $E_s$ ) соответствующих клеток-мишеней. Значения  $E_s$  хорошо известны из экспериментов, в которых механические свойства живых клеток, в частности клеток ФЭЧ, M549 и L41, исследовались методами атомно-силовой спектроскопии [31–37]. Согласно

выводам и результатам этих работ имеем совокупность следующих строгих неравенств:

$$E_s (\text{ФЭЧ}) > E_s (\text{L41}) > E_s (\text{A459}). \quad (2)$$

Сопоставляя неравенства (1) и (2), приходим к основному выводу анализа результатов экспериментов, приведенных в [15–17] и [31–37], – иммунный клеточный ответ на действие ГПК оказывается тем выше, чем больше жесткость соответствующих клеток-мишеней. Природу этой корреляции, которая указывает на ключевую роль в ГПК-активации экспрессии генов ЦТ биофизических процессов, зависящих от механических свойств клеток-мишеней, можно понять, если учесть зависимости жесткости живых клеток от липидного состава их плазматических мембран (ПМ).

В последнее десятилетие во многих работах (например, [38–40]) было установлено, что механические свойства живых клеток, такие как жесткость, эластичность, деформируемость, силы сцепления (адгезии), а также текучесть и проницаемость их ПМ, в решающей степени зависят от содержащегося в клетках холестерина (ХОЛ). Его межкомпарментное распределение существенно неоднородно. В норме ХОЛ (до 70–90% от общего количества) в основном содержится в ПМ и только малая его часть (~1–5%) приходится на внутриклеточные компартменты (на мембраны эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи [41]). Ориентируясь на корреляции (1), (2), ограничимся анализом влияния мембранного холестерина (мХОЛ) только на жесткость клетки.

Физические параметры, характеризующие твердость, вязкость и прочность модельных бислойных мембран (мБСМ), обычно положительно коррелируют с содержащимся в них холестерином [42]. То есть значения этих параметров тем больше, чем больше в мБСМ холестерина. Это находит объяснение в рамках физических моделей, адекватно учитывающих особенности строения молекул ХОЛ и фосфолипидов и связанный с этим характер межлипидных взаимодействий в БСМ. Молекулы ХОЛ занимают в бислойных липидных мембранах свободное пространство между гидрофобными хвостами сфинголипидов, не позволяя им изгибаться. Снижение количества пустот в липидном бислое модельных мембран приводит к повышению их механических характеристик, таких как жесткость, плотность, вязкость и прочность. То есть увеличение содержания ХОЛ в бислойных мембранах независимо от его причин всегда сопровождается повышением прочности поверхностных (оболочечных) структур. Снижение количества холестерина в мБСМ сопровождается, соответственно, противоположными изменениями [43]. Характер изменений механических свойств клеточных мембран при вариациях содержащегося в них ХОЛ может оставаться таким же, как в слу-

чае модельных мембран, но корреляции количества мХОЛ с жесткостью клетки (модулем Юнга) оказываются противоположными, они отрицательны [44–46]. То есть снижение ХОЛ в клеточной мембране сопровождается не уменьшением, но повышением жесткости клеток как целого. Этот экспериментальный факт, впервые установленный в [46], на первый взгляд, возможно, неожиданный, находит объяснение в рамках сложившихся представлений о силах сцепления (адгезии) холестеринных рафтов с примыкающими к ним участками актинового цитоскелета. Снижение холестерина в ПМ в рафтах сопровождается накоплением белков адгезии, одновременно в цитоскелетах происходят структурные перестройки, что совокупно повышает прочность и жесткость клеток как целого. Отсюда следует принципиально важный вывод, что корреляции (1) и (2) можно дополнить двумя новыми неравенствами, которые соответствуют содержанию в клетках ФЭЧ, М-549 и L41 мембранного холестерина (мХОЛ)<sup>2</sup>:

$$\text{мХОЛ (ФЭЧ)} < \text{мХОЛ (L41)} < \text{мХОЛ (A549)}. \quad (3)$$

Сопоставляя неравенства (1), (2), (3), приходим к основному выводу анализа имеющихся экспериментальных данных – иммуномодулирующая активность ГПК отрицательно коррелирует с количеством мХОЛ в клетках-мишенях. С учетом результатов [19, 20] сделанный вывод позволяет сформулировать молекулярную модель экспрессии клеточных генов ЦТ гетерополикислотами.

*Обогащение холестерином клеточных мембран как фактор, снижающий иммунный ответ клеток на воздействие ГПК.* Известно, что вне воспалительной реакции и вне иммунного ответа ЦТ в клетках не синтезируются. То есть экспрессия генов клеточных ЦТ, впервые наблюдавшаяся в [15–17], – это существенно индуцибельный процесс. В этой связи возникает вопрос о физической природе частиц-паттернов в экспериментах по клеточной активации ЦТ [15–17] и механизмах молекулярных процессов, лежащих в основе корреляций (1)–(3). Ответ находим в модели многоэтапного (последовательного) разрушения бислойных клеточных мембран, аналогичной протонно-анионной модели, которая использовалась для описания деструкции ВЧ гриппа А многозарядными анионами ГПК [19, 20]. Согласно предлагаемой ниже модели паттернами, распознаваемыми клеточными рецепторами, запускающими последующие каскады процессов синтеза ЦТ, являются фрагменты частично (или полностью) разрушенных клеток.

Процессы нарушения (или разрушения) структуры и/или состава каких-либо клеточных компартментов – это один из многочисленных

<sup>2</sup> Неравенства (3) согласуются с общим выводом о повышении уровня мХОЛ при онкогенезе [47].

возможных механизмов формирования цитотоксических свойств ГПК. Во всех известных случаях высокие значения индекса цитотоксичности,  $CC_{50}$ , препятствуют практическому применению потенциально перспективных ПОМ-препаратов. Снижение цитотоксичности соединений ГПК – приоритетная задача современной биохимии ПОМ, успех решения которой во многом определяется объемом достоверной информации о динамике молекулярных процессов, ответственных за нарушение жизнеспособности соответствующих клеток-мишеней. Такая информация сегодня отсутствует.

Ограничимся анализом динамики первичных процессов взаимодействий ГПК с бислойными липидными мембранами, которые сводятся к актам неупругих отражений многозарядных анионов от бислойных липидных мембран [20]. Согласно [48–51] такие акты осуществляются по механизму образования и последующего распада долгоживущих поверхностных комплексов, в состав которых вместе с анионами ГПК могут входить различные мембранные липиды. В клетках чаще всего это ХОЛ, энергия связи которого с другими липидами мембраны минимальна. Поэтому распад поверхностных комплексов сопровождается заметным уменьшением количества мХОЛ (до 50–60%) [18]. Это снижение приводит к начальному снижению прочности клеточной мембраны, росту поверхностного натяжения, способствующего образованию разрывов, повышению проницаемости ПМ за счет образования нанопор, экспоненциальному росту размеров дефектов со временем и заключительному лизису клеток [20]. Ясно, что лимитирующим процессом, определяющим кинетику и константы скоростей процессов разрушения мембраны, являются первичные акты истощения ХОЛ, которые тем более существенны, чем меньше содержание ХОЛ в клетке-мишени.

*Возможности инактивации коронавируса гетерополикикислотами.* Инактивация вирусов гриппа А концентрированными водными растворами ГПК исследовалась в [19, 20], где было установлено, что при высоких концентрациях (25–250 мкМ) инактивация осуществляется по механизму последовательного многоэтапного разрушения ВЧ, стартового с истощения мХОЛ анионами с последующим подключением процессов закисления матриксных и капсидных белков протонами среды.

Липидные мембраны гриппа А, как и мембраны других (–)оцРНК-вирусов, формируются из поверхностных микродоменов (рафтов) соответствующих клеток-хозяев. Рафты, занимающие 10–15% общей поверхности клетки, существенно обогащены ХОЛ. В среднем они содержат до 50–70% всего клеточного ХОЛ, т.е. в рафтах и, соответственно, вирусных оболочках холестерина может быть в 3–5 раз больше, чем в свободных от

рафтов участках ПМ. Рафты утолщены и малопроницаемы, их жесткости и прочности, зависящие от молярного содержания в них ХОЛ, в сравнении с внерафтовыми участками ПМ повышены. Поэтому повышены и механические свойства вирусных мембран. Как следствие, при высоких концентрациях ГПК, необходимых для эффективной инактивации ВЧ гриппа, воздействие ГПК на зараженные клеточные ткани, стартуя, видимо, с внерафтовых участков, приводит к преимущественному разрушению менее прочных ПМ. Использование концентрированных растворов ГПК в качестве противогриппозных препаратов по этой причине исключено.

Однако можно ожидать, что для обширного семейства (+)оцРНК-вирусов, включающего коронавирусы (в том числе, SARS-CoV-2) и флавивирусы, соотношения между скоростями разрушения клеточных и вирусных мембран во многих случаях будут обратными. Мембраны этих вирусов, как хорошо известно, формируются из внутриклеточных мембран (мембран эндоплазматического ретикула и аппарата Гольджи), в которых содержание ХОЛ не превышает 1–5%. В этих условиях молярное содержание ХОЛ в вирусных мембранах может быть меньше содержания холестерина в ПМ. Процессы разрушения ВЧ анионами ГПК в этих условиях, по-видимому, должны превалировать.

Заметим, что на быстрое разрушение ВЧ в этих случаях косвенно указывают результаты, в которых сообщалось о высокой противовирусной активности ГПК в отношении коронавирусов [14] и некоторых флавивирусов [13]. Характерные значения  $EC_{50}$ , которые здесь наблюдаются, для ГПК часто находятся в диапазоне ~0.5–10 мкМ, что соответствует значениям терапевтических индексов SI ( $CC_{50}/EC$ ) на уровне  $10^2$  и выше (в отдельных случаях до  $10^4$ ).

Причины столь высокой противовирусной активности ГПК в отношении флавивирусов [13] и коронавирусов [14] в литературе до сих пор не обсуждались, хотя деструкция ВЧ как механизм ГПК-инактивации флавивирусов уже была установлена в [14], где наблюдалось образование в ВЧ сквозных отверстий – микроскопических поверхностных дефектов, возникающих в бислойных липидных мембранах на этапе истощения ХОЛ.

Высокая активность ГПК как новых эффективных неспецифических препаратов, инактивирующих (+)оцРНК-вирусы, – это, видимо, следствие совместного влияния двух механизмов – снижения прочности вирусных мембран, сформировавшихся из низкохолестериновых внутриклеточных оргanelл (легко разрушаемых по протонно-анионному механизму [19, 20]), и активации противовирусных ЦТ (возможно, в основном интерферонов), впервые обнаруженной в [15–17] и проанализированной выше. Можно предположить, что надлежа-

шая оптимизация состава и строения соединений ПОМ, нацеленная на ускорение деструкции непрочных (малохолестериновых) липидных оболочек (+)оцРНК-вирусов, может быть новым и перспективным направлением поисков антиковидных терапевтических средств, свободных от недостатков, присущих препаратам, нацеленным на белковые (кодируемые) мишени.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружена корреляция иммуномодулирующих свойств ГПК с механическими свойствами (жесткостью) клеток-мишеней и содержанием в них мембранного холестерина.

Получена молекулярная модель ГПК-активации экспрессии генов иммуноактивных цитокинов в нормальных и раковых клетках.

Определена молекулярная модель формирования повышенной противовирусной активности ГПК в отношении корона- и флавивирусов.

Обоснована перспективность синтеза новых ГПК-препаратов с повышенной неспецифической противовирусной активностью в отношении пандемических штаммов вируса SARS-CoV-2.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках государственного задания ФИЦ ХФ РАН по теме “Наноструктурированные системы нового поколения с уникальными функциональными свойствами” (регистрационный номер № 122040500071-0).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dinarello C.A.* // Eur. J Immunol. 2007. V. 37. P. S34. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772>
2. World Health Organization. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern. [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern)
3. *Mlcochova P., Kemp S.A., Dhar M.S. et al.* // Nature. 2021. V. 599. № 7883. P. 114. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03944-y>
4. *Dogra P., Ruiz-Ramírez J., Sinha K. et al.* // ACS Pharmacol. Transl. Sci. 2020. V. 4. № 1. P. 248. <https://doi.org/10.1021/acspsci.0c00183>
5. *Кордюкова Л.В., Шанько А.В.* // Биохимия. 2021. Т. 86. № 7. С. 964.
6. *Бобкова С.С., Жуков А.А., Проценко Д.Н. и др.* // Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. 2021. Т. 1. С. 57.
7. *Lopez L., Sang P.C., Tian Y. et al.* // Viruses. 2020. V. 12. № 12. P. 1433 (1–12). <https://doi.org/10.3390/v12121433>
8. *Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.-C. et al.* // Cell. 2020. V. 181. P. 1036. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
9. *Yamase T.* // Prog. Mol. Subcell. Biol. 2013. V. 54. P. 65. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-41004-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-41004-8_4)
10. *Bijelic A., Aureliano M., Rompel A.* // Chem. Commun. (Camb.). 2018. V. 54. № 10. P. 1153. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>
11. *Čolović M.B., Lacković M., Lalatović J. et al.* // Curr. Med. Chem. 2020. V. 27. № 3. P. 362. <https://doi.org/10.2174/09298673266661990827153532>
12. *Francesse R., Civra A., Rittà M. et al.* // Antiviral Res. 2019. V. 163. P. 29. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.005>
13. *Qi Y., Han L., Qi Y. et al.* // Antiviral Res. 2020. V. 179. P. 104813. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104813>
14. *Shigeta S., Mori S., Yamase T. et al.* // Biomed. Pharmacother. 2006. V. 60. P. 211. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.023.009>
15. *Лопатина О.А., Исаева Е.И., Суетина И.А. и др.* // Наноматериалы и наноструктуры – XXI век. 2016. Т. 7. № 1. С. 36.
16. *Лопатина О.А., Бакланова О.В., Суетина И.А. и др.* // Биологическая радиоэлектроника. 2015. Т. 3. С. 42.
17. *Суетина И.А., Мезенцева М.В., Гущина Е.А. и др.* // Клеточные культуры (информационный бюллетень). 2015. Т. 31. (Санкт-Петербург). С. 67.
18. *Ковалевский С.А., Гулин А.А., Лопатина О.А. и др.* // Российские нанотехнологии. 2019. Т. 14. № 9–10. С. 77. <https://doi.org/10.1134/S1995078019050082>
19. *Ковалевский С.А., Лопатина О.А., Гущина Е.А. и др.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 11. С. 40. 1 <https://doi.org/10.1134/S1190793121060051>
20. *Далидчик Ф.И., Балашов Е.М., Бакланова О.В. и др.* // Российские нанотехнологии. 2022. Т. 17. № 2. С. 216.
21. *Chin A.W.H., Chu J.T.S., Perera M.R.A. et al.* // Lancet Microb. 2020. V. 1. № 1. P. 10. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30003-3)
22. *Chan K.-H., Sridhar S., Zhang R.R. et al.* // J. Hosp. Infect. 2020. V. 106. № 2. P. 226. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.07.009>
23. *Dan K., Fujinami K., Sumitomo H. et al.* // Appl. Sci. 2020. V. 10. № 22. P. 8246. <https://doi.org/10.3390/app10228246>
24. *Choi H., Shin. E.C.* // Yonsei Med. J. 2021. V. 62 (5). P. 381. <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.5.381>
25. *Chen X., Saccon E., Appelberg K.S. et al.* // Cell Death Discov. 2021. V. 7. № 1. P. 114. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00487-z>
26. *Park A., Iwasaki A.* // Cell Host. Microbe. 2020. V. 27. № 6. P. 870. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>
27. *Zawada K.E., Wrona D., Rawle R.J. et al.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 1. P. 29842. <https://doi.org/10.1038/srep29842>
28. *Lu L., Zhang H., Dauphars D.J. et al.* // Trends Immunol. 2021. V. 42. № 1. P. 3. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.012>

29. *Suresh S.* // *Acta Biomater.* 2007. V. 3. № 4. P. 413.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.002>
30. *Bernardes N., Fialho M.A.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 12. P. 3871.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19123871>
31. *Omidvar R., Tafazzoli-shadpour M., Shokrgozar M.A. et al.* // *J. Biomech.* 2014. V. 47. № 13. P. 3373.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomech.2014.08.002>
32. *Xu W., Mezenzev R., Kim B. et al.* // *PLoS ONE.* 2012. V. 7. № 10. e46609.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046609>
33. *Alibert C., Goud B., Manneville J.-B. et al.* // *Biology Cell.* 2017. V. 109. № 5. P. 167.  
<https://doi.org/10.1111/boc.201600078>
34. *Runel G., Lopez-Ramirez N., Chlasta J. et al.* // *Cells.* 2021. V. 10. № 4. P. 887.  
<https://doi.org/10.3390/cells10040887>
35. *Няпшаев И.А.* Атомно-силовая микроскопия механических свойств различных наносистем. Дис.... канд. физ.-мат. наук. С.-П.: Физ.-тех. ин-т им. А.Ф. Иоффе РАН, 2013.
36. *Чубинский-Надеждин В.И.* Роль мембранного холестерина в регуляции механочувствительных ионных каналов и актинового цитоскелета. Дис. ... канд. биол. наук. С.-П.: Ин-т цитологии РАН, 2012.
37. *Няпшаев И.А., Анкудинов А.В., Стовяга А.В. и др.* // *ЖТФ.* 2012. Т. 82. № 10. С. 109.
38. *Raffy S., Teissie J.* // *Biophys. J.* 1999. V. 76. № 4. P. 2072.  
[https://doi.org/10.1016/s006-3495\(99\)77363-7](https://doi.org/10.1016/s006-3495(99)77363-7)
39. *Vajimaya S., Hayashi T., Frankl T. et al.* // *Virology.* 2017. V. 501. P. 127.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.011>
40. *Sousa I.P., Carvalho C.A.M., Gomes A.M.O.* // *Viruses.* 2020. V. 13. № 1. P. 35.  
<https://doi.org/10.3390/v13010035>
41. *Gibson Wood W., Igbavboa U., Müller W.E. et al.* // *J. Neurochem.* 2011. V. 116. № 5. P. 684.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07017.x>
42. *De Oliveira Andrade L.* // *Biomed. Spectrosc. Imaging.* 2016. V. 5. P. S101.  
<https://doi.org/10.3233/bsi160157>
43. *Needham D., Nunn R.S.* // *Biophys. J.* 1990. V. 58. № 4. P. 997.  
[https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(90\)82444-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(90)82444-9)
44. *Levitan I.* // *Front. Biosci.* 2016. V. 21. № 6. P. 1245.  
<https://doi.org/10.2741/4454>
45. *Hong Z., Staiculescu M.C., Hampel P. et al.* // *Front. Physiol.* 2012. V. 3. P. 426.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00426>
46. *Byfield F.J., Aranda-Espinoza H., Romanenko V.G. et al.* // *Biophys. J.* 2004. V. 87. № 5. P. 3336.  
<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.040634>
47. *Snaebjornsson M.T., Janaki-Raman S., Schulze A.* // *Cell Metabolism.* 2019. V. 31. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.010>
48. *Bijelic A., Aureliano M., Rompel A.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2018. V. 58. № 10. P. 2980.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201803868>
49. *Kobayashi D., Nakahara H., Shibata O. et al.* // *J. Phys. Chem. C.* 2017. V. 121. № 23. P. 12895.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b01774>
50. *Sakamoto A., Unoura K., Nabika H.* // *J. Phys. Chem. C.* 2018. V. 122. № 2. P. 1404.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11251>
51. *Лопатина О.А., Суетина И.А., Мезенцева М.В. и др.* // *Хим. физика.* 2020. Т. 39. № 1. С. 52.  
<https://doi.org/10.1134/S1990793120010078>