

# Научные обзоры



© КУВАЧЕВА Н. В., МОРГУН А. В., ХИЛАЖЕВА Е. Д., МАЛИНОВСКАЯ Н. А., ГОРИНА Я. В., ПОЖИЛЕНКОВА Е. А., ФРОЛОВА О. В., ТРУФАНОВА Л. В., МАРТЫНОВА Г. П., САЛМИНА А. Б.

УДК 612.822

## ФОРМИРОВАНИЕ ИНФЛАММАСОМ: НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И СЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК

Н. В. Кувачева, А. В. Моргун, Е. Д. Хилажева, Н. А. Малиновская, Я. В. Горина,

Е. А. Пожиленкова, О. В. Фролова, Л. В. Труфанова, Г. П. Мартынова, А. Б. Салмина

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

Министерства здравоохранения РФ, ректор — д. м. н., проф. И. П. Артюхов; кафедра биохимии с курсами

медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, зав. — д. м. н., проф. А. Б. Салмина;

НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, руководитель — д. м. н., проф. А. Б. Салмина;

кафедра детских инфекционных болезней, зав. — д. м. н., проф. Г. П. Мартынова.

**Резюме.** В обзоре приведены основные сведения о структуре мультимерных комплексов (инфламмасом), отвечающих за воспалительные реакции в организме, связанные с активацией клеток и секрецией цитокинов. Механизмы формирования и регуляции активности инфламмасом дают представление о влиянии внешних и внутренних медиаторов воспаления на ответную реакцию организма как со стороны иммунной, так и со стороны центральной нервной системы. Особый акцент в обзоре сделан на особенностях экспрессии инфламмасом в клетках нейроваскулярной единицы головного мозга.

**Ключевые слов :** инфламмасома, провоспалительные цитокины, процессинг и секреция, головной мозг.

Изучение молекулярных механизмов воспаления в последние годы привело к открытию удивительного феномена, регулирующего функциональную активность эффекторных клеток в очаге воспаления — инфламмасомы (inflammasome). Благодаря этому открытию [45], претерпели существенное изменение не только наши представления о молекулярном патогенезе воспаления, но и о регуляции межклеточных взаимодействий в (пато)физиологических условиях.

Специфические аспекты развития нейровоспаления при повреждении клеток головного мозга ишемического или токсического генеза, при нейродегенерации и нарушениях развития головного мозга, как было выяснено сравнительно недавно, в значительной мере обусловлены особенностями формирования инфламмасом в клетках нейрональной и глиальной (астроциты, микроглия) природы. Кроме того, широкий спектр эндогенных индукторов инфламмасом позволяет предполагать, что этим белковым комплексам может принадлежать особая роль в регуляции межклеточных взаимодействий в нейроваскулярной единице головного мозга.

### *Общие представления о формировании и регуляции активности инфламмасом*

Инфламмасома — мультимерный цитозольный белковый комплекс, имеющий сенсорные молекулы, связанные с каспазой 1 через ASC (адапторный белок PYCARD). ASC состоит из двух доменов: пиринового (pyrin domain) и активирующего и усиливающего каспазного (caspase activation and recruitment domain — CARD). Пириновым доменом ASC связан с основанием инфламмасомы,

а посредством CARD белок способствует активации каспазы 1, которая в свою очередь активирует проинтерлейкин 1 $\beta$  и проинтерлейкин 18, участвующие в локальном и системном клеточном ответе [40]. Большинство из описанных инфламмасом, кроме белка ASC, содержат NOD-подобные рецепторы, названные NLRP (NOD-like receptor protein) [18]. Белки этого семейства имеют консервативное строение, и в их составе присутствует несколько функционально различающихся доменов.

Активация каспазы 1 посредством NLRP3 (NACHT-LRR-PYD-containing protein-3) инфламмасомы может быть вызвана стимуляцией бактериальными токсинами, микрокристаллами, такими, как кремний, асбест, моноурат натрия и пирофосфат кальция, и опосредована изменениями в ионном составе и pH цитоплазмы [32, 38, 46]. Показано, что активация NLRP3 инфламмасомы играет важную роль в защите организма против вирусов гриппа [3] и в индукции противоопухолевого иммунитета, особенно в случае гибели опухолевых клеток вследствие химиотерапии [20]. Кроме того, активация инфламмасомы вызывает быструю провоспалительную форму клеточной гибели, называемую пироптозом [48]. В целом, все агенты, способные индуцировать формирование инфламмасом, относятся к патогенетически ассоциированным молекулярным структурам (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) и молекулярным структурам, связанным с повреждением (damage-associated molecular patterns, DAMPs). В качестве PAMPs могут выступать бактериальные липополисахариды или вирусная двухцепочечная РНК, примером DAMPs

может служить мочева кислота, АТФ и секретируемые белки теплового шока [36].

Инфламмосомы формируются в разных видах клеток: макрофагах, нейтрофилах, моноцитах и микроглии (миелоидных клетках) [17], кроме того белки семейства NLR, входящие в состав инфламмосомных комплексов, экспрессируются в астроцитах, олигодендроцитах и нейронах [53, 60].

Формированию инфламмосомы предшествует активация специализированных клеточных механизмов, прежде всего, рецепторов семейства TLR (табл. 1) [7, 8, 9, 37].

Также существуют инфламмосомоподобные комплексы, т.н. нестандартные (неканонические) инфламмосомы, содержащие NLRP3, каспазу 1 и 11, а также мало изученные инфламмосомы, содержащие дектин 1, MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1), ASC и каспазу 8 [40]. В отдельную группу выделяют AIM2 (absent in melanoma 2) инфламмосомы, не содержащие белков семейства NLR и, следовательно, имеющие отличные от остальных инфламмосом пути регуляции их активности [52].

Посредством активации инфламмосом реализуется секреция клетками интерлейкина (IL) 1, IL-18, IL-33. Прежде всего, инфламмосомы регулируют активность каспазы 1, которая участвует в процессинге и высвобождении IL-1 $\beta$ , входящего, наряду с IL-1 $\alpha$  и IL-1Ra, в систему интерлейкина

1 – основного провоспалительного цитокина. IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , в основном, продуцируются стимулированными моноцитами и макрофагами и, в меньшей степени, некоторыми другими типами клеток, включая нейтрофилы, кератиноциты, эпителиальные и эндотелиальные клетки, лимфоциты, гладкомышечные клетки и фибробласты [14].

Для высвобождения IL-1 $\beta$  из макрофагов необходимы два сигнала: во-первых, активация TLR, приводящая к транскрипции и трансляции про IL-1 $\beta$ , а во-вторых, NLR-индуцирующие процессинг и высвобождение IL-1 $\beta$  через каспазу 1-зависимый механизм [5]. Однако, например, изолированные первичные человеческие моноциты высвобождают IL-1 $\beta$  после однократной стимуляции TLR4- или TLR2-лигандами. Это позволяет предположить, что секреция IL-1 $\beta$  по-разному регулируется в моноцитах и макрофагах [50]. Расщепление IL-1 $\alpha$  не опосредовано каспазой 1, однако его секреция регулируется активностью этого фермента [35]. Про IL-1 $\beta$  также может быть расщеплен во внеклеточной среде различными воспалительными протеазами для получения активного IL-1 $\beta$  [16]. Активирующее влияние на высвобождение IL-1 $\beta$  макрофагами и нейтрофилами оказывает активация транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B влияет на каспазу 1-зависимый процессинг IL-1 $\beta$  в макрофагах путем повышения экспрессии антиапоптотических генов, тогда как в нейтрофилах секреция IL-1 $\beta$

Таблица 1

### Активаторы процесс формирования инфламмосом

| Вид рецептора                 | Экспрессирующие клетки                              | Активаторы  |   |
|-------------------------------|---|---|---|
| Toll-like receptors (TLR)     | TLR1  | Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты                       | Триациллипептиды  |
|                               | TLR2  | Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки                     | Гликопептиды, липопротеины, липопептиды, липотейхоевая кислота, пептидогликан, зимозан                |
|                               | TLR3  | Дендритные клетки, В-лимфоциты  | Двухцепочечная РНК, поли I:C  |
|                               | TLR4  | Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки, эпителий кишечника | Липополисахариды, белки теплового шока, фибриноген, гепарансульфатные фрагменты, гиалуроновая кислота |
|                               | TLR5  | Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, эпителий кишечника                | Флагеллин   |
|                               | TLR6  | Моноциты, макрофаги, тучные клетки, В-лимфоциты                           | Диациллипептиды   |
|                               | TLR7  | Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты                       | Имидазохинолин, локсорибин (аналог гуанозина), бропиримин, одноцепочечная РНК                         |
|                               | TLR8  | Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки                     | Одноцепочечная РНК  |
|                               | TLR9  | Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты                       | Неметилированные участки CpG ДНК  |
|                               | TLR11   | Моноциты, макрофаги, клетки печени, почки, эпителий мочевого пузыря       | Профилин  |
|                               | TLR12   | Нейроны, дендритные клетки, макрофаги                                     | Профилин  |
|                               | TLR13   | Моноциты, макрофаги, дендритные клетки                                    | Бактериальная рибосомальная РНК с последовательностью CGGAAAGACC                                      |
|                               | Retinoic acid-inducible gene I-like receptors (RLR) | RIG-1   | Макрофаги, эпителиальные клетки легких, дендритные клетки   |
| MDA-5                         |   |   |   |
| LGP2                          |   |   |   |
| C-type lectin receptors (CLR) | Макрофаги, дендритные клетки                        | Гликопептиды, липополисахариды  |   |
| Nod-like receptors (NLR)      | NOD1, NOD2  | Макрофаги, дендритные клетки, моноциты                                    | Гликопептиды  |

не зависит от каспазы 1, а зависит от сериновых протеаз, чья активность подавляется NF- $\kappa$ B-индуцированными генными продуктами [22]. Сериновые протеазы нейтрофилов, такие как протеиназа 3 и эластаза, а также тучных клеток, такие как химаза, играют важную роль в каспаза 1-независимом процессинге про IL-1 $\beta$  в экспериментальных моделях артрита и перитонита [25, 33].

IL-1Ra является мономерным гликозилированным белком, который продуцируется моноцитами и другими клетками. Он связывается с рецепторами IL-1 с той же аффинностью, что IL-1, но не вызывает дальнейшего проведения внутриклеточного сигнала [4, 6]. Таким образом, IL-1Ra выступает в качестве ингибитора и, по-видимому, является важным физиологическим регулятором экспрессии IL-1 [1]. Роль IL-1Ra в регулировании эффектов IL-1 была четко продемонстрирована у мышей, лишенных IL-1Ra, у которых наблюдалась чрезмерная воспалительная реакция и развивались спонтанное воспаление суставов и васкулит. Возникновение аутоиммунных проявлений у детей с недостаточностью системы IL-1Ra также подтверждает ключевую регулируемую роль этого антагониста [19].

Регуляция (увеличение или подавление) активности инфламмасом осуществляется через внеклеточные и внутриклеточные механизмы (табл. 2) Внеклеточная положительная регуляция активности может осуществляться через цитокиновые рецепторы, которые запускают

транскрипцию NLRP3 и таким образом влияют на восприимчивость иммунных клеток к триггерам инфламмасом. Кроме того, транскрипция NLRP3 может запускаться деубиквитинированием NLRP3, которое возникает только в ответ на стимуляцию PRR (pattern-recognition receptor), возможно, с привлечением продукции активных форм кислорода [34].

Некоторые молекулы, такие как  $\beta$ -амилоид, могут индуцировать NLRP3 через активацию TLR и NLRP3 инфламмасомную активацию, при этом ответная реакция на индукцию может быть значительно увеличена активацией рецепторов цитокинов и дополнительными стимуляторами. Эти механизмы могут иметь большое значение в определении величины воспалительной реакции на сигналы опасности. С другой стороны, генетические различия, которые влияют на порог активации инфламмасом, могут способствовать развитию хронических воспалительных или аутоиммунных заболеваний [26].

Подавление активности инфламмасом может осуществляться по типу отрицательной обратной связи, например, при действии лиганда CD40, экспрессированного на Т-клетках-эффекторах и клетках памяти, имеющих на поверхности CD4<sup>+</sup> [24]. Кроме того, активность NLRP3 снижает интерферон Т-клеток через активацию индуцибельной синтазы оксида азота (оксид азота нитрозирует NLRP3 и тем самым ингибирует его активность). Также на подавление активности инфламмасом влияет интерферон, который может уменьшить уровень IL-1 $\beta$  и IL-18 на двух уровнях. Во-первых, интерферон ингибирует продукцию про-IL 1 $\beta$  и про-IL-18 и, во-вторых, подавляет расщепление проформ этих цитокинов [23].

К внутриклеточным регуляторам активности инфламмасом относятся механизмы, связанные, в первую очередь, с уровнем ионов калия и кальция. Эти механизмы могут активироваться при проникновении стрессующих агентов, таких как бактериальные токсины, внутрь клетки при повреждении или недостаточной активности фагоцитоза. Активация NLRP1B и NLRP3 инфламмасом зависит от низкой концентрации калия внутри клетки, которая способствует сборке субъединиц ASC. Кроме того, высокий уровень внеклеточного калия может блокировать высвобождение IL-1 $\beta$  после образования NLRC4 и AIM2 инфламмасом, что свидетельствует о низком внутриклеточном уровне ионов калия, который также может потребоваться для активации этих инфламмасом. При этом для блокировки образования NLRC4 и AIM2 инфламмасом требуется большая концентрация калия, чем для блокирования образования NLRP3 инфламмасом [40]. Агонистом NLRP3 инфламмасом выступает внеклеточный АТФ, который связывается с рецептором P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>, что вызывает

Таблица 2

### Основные регуляторы активности инфламмасом [13 с модификациями]

| № п/п      |                              | Регуляторы активности   |
|------------|------------------------------|---|
| Активаторы |                              |   |
| 1          | Внутренние                   | АТФ<br>Холестерин<br>Глюкоза<br>$\beta$ -амилоид<br>Урат натрия<br>Гиалуронат                             |
| 2          | Внешние                      | Алюминий<br>Асбест<br>Кремний<br>Частицы сплавов<br>УФ-лучи<br>Кожные раздражители                        |
| 3          | Патогенные                   | Бактериальные<br>Вирусные<br>Грибковые<br>Протозойные   |
| 4          | Фармакологические модуляторы | Изостеариновая кислота [57]<br>Пальмитиновая кислота [12]   |
| Ингибиторы |                              |   |
| 5          | Эндогенные                   | Аутокринные (POP1, каспаза-12, септин B2, NLRP10, пирин)<br>Паракринные (CD4 эффектор и Т-клетки памяти)  |
| 6          | Экзогенные                   | Паракринные (Yops, ESX-1, Zmp1, ExoU, mviN, ripA)<br>Вирусные (Serp2, CtmA, B13R, M013, gp013L, p35, NS1) |
| 7          | Фармакологические модуляторы | Fc11a-2 [44]<br>Эпигаллокатехин-3-галлат [15]<br>Глибенкламид [39]  |

отток калия и образование паннексиновых каналов, через которые возможно проникновение в клетку внеклеточных регуляторов активности инфламмасом [43].

Также на активацию NLRP3 инфламмасом оказывает влияние осмотическое давление. В клетках со сниженной концентрацией калия и хлора возникает дегидратация, в ответ на которую происходит мобилизация ионов кальция, имеющих среди прочих мишеней и TGF- $\beta$ -активированную киназу 1, которая ведет к деубиквитинированию NLRP3 [10]. Кроме того, изменение концентрации внеклеточного кальция приводит к снижению уровня циклического АМФ (цАМФ) через ингибирование аденилатциклазы и увеличению цитоплазматической концентрации  $Ca^{2+}$  через активацию фосфолипазы C и продукцию кальций-мобилизующих вторичных посредников. Роль цАМФ в активации инфламмасом остается неясной: так в одном исследовании показано, что цАМФ может непосредственно ингибировать NLRP3, в то время как другие исследователи сообщили, что уровень цАМФ не имел прямого влияния на активацию инфламмасом [41, 51].

Окислительно-восстановительное состояние является еще одним важным показателем жизнеспособности клеток, и многие сигнальные пути находятся под влиянием изменений окислительно-восстановительных процессов. Активные формы кислорода участвуют в нескольких путях активации NLRP3 инфламмасом, при этом сопутствующие изменения в процессе аутофагии могут стимулировать либо подавлять апоптоз [21]. В целом, сама аутофагия является негативным регулятором активности инфламмасом и высвобождения IL-1 $\beta$ : мыши, с дефицитом белка autophagy-related protein 16-1 (ATG16L1) – важнейшего компонента аутофагии – имеют более высокий уровень IL-1 $\beta$  в ответ на стимуляцию, что означает ограничение аутофагии активацией или высвобождением IL-1 $\beta$ . Одна из гипотез регулирования активности инфламмасом предполагает, что аутофагия участвует в удалении убиквитирующих инфламмасом или про-IL-1 $\beta$  [29, 54]. Дополнительный механизм регуляции может быть связан с удалением поврежденных митохондрий и предотвращением выброса митохондриальных активных форм кислорода и мтДНК в цитоплазму, что ограничивает формирование NLRP3 инфламмасом [59].

Формирование инфламмасом достаточно хорошо изучено при воспалительных процессах, реализации иммунного ответа, инсулинорезистентности [30, 42]. Вместе с тем, особого внимания заслуживает роль этого феномена в реализации (пато)физиологических процессов в центральной нервной системе.

#### *Инфламмасомы в клетках нейроваскулярной единицы головного мозга*

Нейроваскулярная единица головного мозга представляет собой систему взаимодействующих и регулирующих активность друг друга клеток (нейроны, астроциты, эндотелиоциты, перициты, и, по представлениям ряда

авторов – микроглия), чье функционирование определяет такие основополагающие процессы, как нейрон-глиальное метаболическое сопряжение, глиоваскулярный контроль, формирование нейрогенного микроокружения, регуляция проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Вместе с тем, именно нейроваскулярная единица является «плацдармом», в пределах которого реализуются основные события, определяющие повреждение клеток при ишемии, нарушениях развития мозга, хронической нейродегенерации, нейровоспалении. В связи с этим логично предполагать, что экспрессия белков-компонентов инфламмасом и их сборка в активный ансамбль может лежать в основе патогенеза широкого круга заболеваний центральной нервной системы.

Изучение белков-компонентов инфламмасом показало, что в мозге обнаружена экспрессия белков семейства NLP (NOD1, 3 и 4, NLRP1, 2, 3, 11, 14, а также NAIP), ASC. Кроме того, клетками мозга экспрессируются, преимущественно, три вида каспаз (CAS1, CAS4, CAS5). Наиболее выраженной активностью обладают NLRP1 и NLRP3 инфламмасомы, а IPAF тип инфламмасом требует присутствия дополнительных активаторов, таких как наличие TLRs [58]. Исследование инфламмасом, проведенное в отдельных популяциях клеток нейроваскулярной единицы, выявило, что в астроцитах экспрессируются NLRP1,2,3, в нейронах – NLRP1,3, в микроглии NLRP3 [60]. NLRP2 инфламмасомы астроцитов ассоциированы с рецепторами P2X7 и паннексином-1, следовательно, на регуляцию их активности в первую очередь оказывают влияние концентрации внеклеточной АТФ и ионов калия [49].

Активность инфламмасом ЦНС может варьировать при различных нейродегенеративных заболеваниях, как правило сопряженных с воспалительными процессами. Например, при нейровоспалении, вызванном интоксикацией этанолом, происходит нарушение нейрогенеза. Исследования активности инфламмасом и IL-1 $\beta$  показали, что гиппокампальные нейроны и астроциты экспрессируют значительные количества NLRP1 и NLRP3 при хронической алкоголизации. Применение этанола при культивировании слайс-культур вызывает увеличение количества про- и IL-1 $\beta$ , что и способствует нарушению нейрогенеза. При этом установлено увеличение уровня IL-1 $\beta$  при одновременном увеличении экспрессии белков NLRP1 в астроцитах и нейронах и NLRP3 в астроцитах в слайс-культуре *in vitro* посредством активации NF- $\kappa$ B. Увеличение экспрессии NLRP1 в астроцитах и нейронах, а также NLRP3 в нейронах и микроглии, обнаружено при посмертном исследовании человеческого мозга с алкогольной нейродегенерацией [60]. Активность NLRP1 инфламмасом повышена и у крыс при физиологическом старении, причем эти данные коррелируют с и повышенным содержанием в мозге IL-1 $\beta$  и IL-18 [27].

Необходимо отметить, что регуляция инфламмасомами секреции IL-1 и IL-18 играет важную роль в определении

секреторного фенотипа клеток нейроваскулярной единицы. Известно, что локальная тканевая гиперсекреция IL-1 $\beta$  и IL-18 является компонентом патогенеза нейродегенеративных заболеваний, таких как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, а также нейроинфекций, ВИЧ-ассоциированной деменции [27].

Увеличение количества провоспалительных цитокинов при активации иммунной системы беременной женщины ведет к нарушению развития головного мозга плода. В частности, под действием IL-1 $\beta$  уменьшается количество пролиферирующих прогениторных клеток и индуцируется их способность к дифференцировке, что стимулирует глиогенез и ингибирует нейрогенез [11].

Исследования патогенеза врожденной цитомегаловирусной инфекции в культуре клеток перидитов, астроцитов и эндотелиоцитов мозговых сосудов показало, что наибольший вклад в распространение нейроинфекции вносят перидиты. При этом в них обнаружен более высокий уровень IL-1 $\beta$  и IL-6. Эти цитокины могут запускать каскадные реакции, привлекающие в очаг нейтрофилы, базофилы и Т-клетки, которые в совокупности способствуют распространению нейровоспаления. Поражение головного мозга цитомегаловирусом происходит на ранних стадиях развития, когда гематоэнцефалический барьер сформирован не полностью, при этом происходит нарушение плотных контактов эндотелиоцитов и, как следствие, их функционального взаимодействия с другими компонентами нейроваскулярной единицы [2].

Цитокины принимают участие не только в реализации своих функций при нейровоспалении, но и влияют на развитие нейронов и глиальных клеток, а также на реализацию интегративных функций мозга (обучение, запоминание, социальное распознавание и взаимодействие). Установлено, что уровни провоспалительных цитокинов (IL-33, IL-18 и IL-1 $\beta$ ) у мышей с аутизмом выше, чем у здоровых, при этом наиболее значимые различия в уровне IL-33 наблюдаются в *Substantia nigra*, содержащей значительные количества микроглии и дофаминергических нейронов. Активность микроглии, являющейся источником этих интерлейкинов в мозге, повышена при аутизме и болезни Паркинсона [31].

Белки инфламмосомного комплекса могут служить мишенями для фармакологических модуляторов, применяемых для купирования нейровоспаления. Одним из путей снижения интенсивности воспаления может служить применение ингибиторов каспазы-1. Так как процессинг IL-1 $\beta$  и IL-18 обеспечивается каспазой-1 при активации инфламмосом, применение ингибиторов каспазы-1 тормозит секрецию интерлейкинов и редуцирует их общий провоспалительный потенциал. Кроме того, ингибиторы каспазы-1 также эффективно снижают пироптопическую гибель клеток, вызванную действием DAMPs [47].

Другой точкой приложения фармакологических средств могут выступать модуляторы активности пуринергического рецептора P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>, через который в клетку поступает АТФ,

являющийся активатором NLRP инфламмосом. При блокировании этого рецептора в микроглии снижается продукция IL-1 $\beta$ , при этом совместное применение блокаторов P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> и каспазы-1 вызывает более выраженный эффект на образование IL-1 $\beta$ , что может свидетельствовать о наличии нескольких путей регуляции активности инфламмосом микроглии [28].

В литературе известно положительное влияние противовоспалительных средств при болезни Альцгеймера. Такие средства могут действовать через ингибирование инфламмосом в клетках глии (микроглия, астроциты, олигодендроциты), что приводит к снижению продукции цитокинов и уменьшению воспалительных процессов при нейродегенеративных заболеваниях [56]. Исследования фармакологических эффектов артемизина при болезни Альцгеймера выявило его свойства подавлять активность NF- $\kappa$ B и, следовательно, NLRP3 инфламмосом, а также ингибировать продукцию  $\beta$ -амилоида через торможение активности VASCE1. Кроме влияния на инфламмосомы, NF- $\kappa$ B оказывает влияние на связывание лигандов с RAGE, за счет которых происходит транспорт  $\beta$ -амилоида из крови в мозг. Таким образом, вещества, влияющие на экспрессию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, могут быть эффективны за счет модуляции активности инфламмосом и сопряженных процессов в клетках нейроваскулярной единицы головного мозга [55].

Регуляция взаимодействий посредством продуцируемых клетками медиаторов – важный компонент межклеточной коммуникации. В настоящее время известно много способов активного высвобождения из клеток гуморальных факторов, оказывающих паракринное и аутокринное влияние в мультиклеточных ансамблях (например, экзоцитоз, секреция в составе мембранных микрочастиц, высвобождение через коннексиновые и паннексиновые каналы), поэтому изучение механизмов внутриклеточного процессинга этих биологически активных молекул с участием инфламмосом – важное направление в современной клеточной биологии, биохимии и фармакологии, достижения которого станут основой для новых терапевтических стратегий.

#### INFLAMMASOMES FORMING: NEW MECHANISMS OF INTERCELLULAR INTERACTIONS REGULATION AND SECRETORY ACTIVITY OF THE CELLS

N. V. Kuvacheva, A. V. Morgun, E. D. Hilazheva,  
N. A. Malinovskaya, Y. V. Gorina, E. A. Pozhilenkova,  
O. V. Frolova, L. V. Trufanova, G. P. Martynova,  
A. B. Salmina

Krasnoyarsk state medical university named  
after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky

**Abstract.** The review provides basic information about the structure of multimeric complexes (inflammasomes) responsible for inflammatory reactions in the body, connected with the activation of the cells and the cytokines secretion. The

mechanisms of forming and regulating of the inflammasomes activity give an idea of the influence of internal and external mediators of inflammation to the response of the organism from both the immune and the central nervous system. A special emphasis in the review is placed to the features of inflammasomes expression in the cells of the brain neurovascular unit.

**Key words:** inflammasome, proinflammatory cytokines, processing and secretion, brain.

### Литература

- Ильина А.Е., Станислав М.Л., Денисов Л.Н. и др. Интерлейкин 1 как медиатор воспаления и терапевтическая мишень // Научно-практическая ревматология. – 2011. – № 3. – С. 62-71.
- Alcendor D.J., Charest A.M., Zhu W.Q. et al. Infection and upregulation of proinflammatory cytokines in human brain vascular pericytes by human cytomegalovirus // *J. Neuroinflammation*. – 2012. – Vol. 18, № 9. – P. 95.
- Allen I.C., Scull M.A., Moore C.B. et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA // *Immunity*. – 2009. – № 30. – P. 556-565.
- Arend W.P., Joslin F.G., Massoni R.J. Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor // *J. Immunol.* – 1985. – № 134. – P. 3868-3875.
- Arend W.P., Palmer G., Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines // *Immunol. Rev.* – 2008. – № 223. – P. 20-38.
- Balavoine J.F., de Rochemonteix B., Williamson K. et al. Prostaglandin e2 and collagenase production by fibroblasts and synovial cells is regulated by urine-derived human interleukin 1 and inhibitor(s) // *J. Clin. Invest.* – 1986. – № 78. – P. 1120-1124.
- Bauernfeind F., Ablasser A., Bartok E. et al. Inflammasomes: current understanding and open questions // *Cell Mol. Life Sci.* – 2011. – Vol. 68, № 5. – P. 765-783.
- Binder M., Eberle F., Seitz S. et al. Molecular mechanism of signal perception and integration by the innate immune sensor retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 31. – P. 27278-27287.
- Chen G., Pedra J.H. The inflammasome in host defense // *Sensors (Basel)*. – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 97-111.
- Compan V., Baroja-Mazo A., López-Castejón G. et al. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation // *Immunity*. – 2012. – № 37. – P. 487-500.
- Crampton S.J., Collins L.M., Toulouse A. et al. Exposure of foetal neural progenitor cells to IL-1 $\beta$  impairs their proliferation and alters their differentiation - a role for maternal inflammation? // *J. Neurochem.* – 2012. – Vol. 120, № 6. – P. 964-973.
- Csak T., Ganz M., Pespisa J. et al. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 54, № 1. – P. 133-144.
- Davis B.K., Wen H., Ting J.P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases // *Ann. Rev. Immunol.* – 2011. – № 29. – P. 707-735.
- Dinarello C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery // *FASEB J.* – 1994. – № 8. – P. 1314-1325.
- Ellis L.Z., Liu W., Luo Y. et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses melanoma growth by inhibiting inflammasome and IL-1 $\beta$  secretion // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 414, № 3. – P. 551-556.
- Fantuzzi G., Dinarello C.A. Interleukin-18 and interleukin-1 $\beta$ : two cytokine substrates for Ice (caspase-1) // *J. Clin. Immunol.* – 1999. – № 19. – P. 1-11.
- Fleshner M. Stress-evoked sterile inflammation, danger associated molecular patterns (DAMPs), microbial associated molecular patterns (MAMPs) and the inflammasome // *Brain Behav. Immun.* – 2013. – Vol. 27, № 1. – P. 1-7.
- Franchi L., Eigenbrod T., Mucoz-Planillo R. et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis // *Nat. Immunol.* – 2009. – № 10. – P. 241-247.
- Gabay C., Palmer G. Mutations in the IL-1RN locus lead to autoinflammation // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2009. – № 9. – P. 480-482.
- Ghiringhelli F., Apetoh L., Tesniere A. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors // *Nat. Med.* – 2009. – № 15. – P. 1170-1178.
- Gordy C., He Y.W. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? // *Protein Cell.* – 2012. – № 3. – P. 17-27.
- Greten F. R., Arkan M.C., Bollrath J. et al. NF- $\kappa$ B is a negative regulator of IL-1 $\beta$  secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKK $\beta$  // *Cell.* – 2007. – № 130. – P. 918-931.
- Guarda G., Braun M., Staehli F. et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation // *Immunity*. – 2011. – № 34. – P. 213-223.
- Guarda G., Dostert C., Staehli F. et al. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes // *Nature*. – 2009. – № 460. – P. 269-273
- Guma M., Ronacher L., Liu-Bryan R. et al. Caspase 1-independent activation of interleukin-1 $\beta$  in neutrophil-predominant inflammation // *Arthr Rheum.* – 2009. – № 60. – P. 3642-3650.
- Halle A., Hornung V., Petzold G.C. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- $\beta$  // *Nature Immunol.* – 2008. – № 9. – P. 857-865.
- Hanamsagar R., Hanke M.L., Kielian T. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system // *Trends Immunol.* – 2012. – Vol. 33, № 7. – P. 333-342.
- Hanamsagar R., Torres V., Kielian T. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$ /IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia // *J. Neurochem.* – 2011. – Vol. 119, № 4. – P. 736-748.

29. Harris J., Hartman M., Roche C. et al. Autophagy controls IL-1 $\beta$  secretion by targeting pro-IL-1 $\beta$  for degradation // *J. Biol. Chem.* – 2011. – № 286. – P. 9587-9597.
30. He J., Yang Y., Peng D.Q. Monosodium urate (MSU) crystals increase gout associated coronary heart disease (CHD) risk through the activation of NLRP3 inflammasome // *Int. J. Cardiol.* – 2012. – Vol. 160, № 1. – P. 72-73.
31. Heo Y., Zhang Y., Gao D. et al. Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 7 – e20912.
32. Horvath G. L., Schrum J. E., De Nardo C. M. et al. Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes // *Immunol. Rev.* – 2011. – № 243. – P. 119-135.
33. Joosten L. A., Netea M. G., Fantuzzi G. et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1 $\beta$  // *Arthr. Rheum.* – 2009. – № 60. – P. 3651-3662.
34. Juliana C., Fernandes-Alnemri T., Kang S. et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation // *J. Biol. Chem.* – 2012. – № 287. – P. 36617-36622.
35. Keller M., Ruegg A., Werner S. et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion // *Cell.* – 2008. – № 132. – P. 818-831.
36. Kepp O., Galluzzi L., Kroemer G. Mitochondrial control of the NLRP3 inflammasome // *Nat. Immunol.* – 2011. – Vol. 12, № 3. – P. 199-200.
37. Kolli D., Velayutham T.S., Casola A. Host-Viral Interactions: Role of Pattern Recognition Receptors (PRRs) in Human Pneumovirus Infections // *Pathogens.* – 2013. – № 2. – P. 232-263.
38. Lamkanfi M., Dixit V.M. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity // *Immunol. Rev.* – 2009. – № 227. – P. 95-105.
39. Lamkanfi M., Mueller J.L., Vitari A.C. et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome // *J. Cell Biol.* – 2009. – № 187. – P. 61-70.
40. Latz E., Xiao T.S., Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13, № 6. – P. 397-411.
41. Lee G.S., Subramanian N., Kim A.I. et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP // *Nature.* – 2012. – № 492. – P. 123-127.
42. Lee H.M., Kim J.J., Kim H.J. et al. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes // *Diabetes.* – 2013. – Vol. 62, № 1. – P. 194-204.
43. Liao Y.H., Lin Y.C., Tsao S.T. et al. HMG-CoA reductase inhibitors activate caspase-1 in human monocytes depending on ATP release and P2X7 activation // *J. Leukoc. Biol.* – 2013. – Vol. 93, № 2. – P. 289-299.
44. Liu W., Guo W., Wu J. et al. A novel benzo[d]imidazole derivate prevents the development of dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis via inhibition of NLRP3 inflammasome // *Biochem. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 85, № 10. – P. 1504-1512.
45. Martinon F., Burns K., Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta // *Mol. Cell.* – 2002. – Vol. 10, № 2. – P. 417-426.
46. Martinon F., Mayor A., Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body // *Annu Rev. Immunol.* – 2009. – № 27. – P. 229-265.
47. Maslanik T., Mahaffey L., Tannura K. et al. The inflammasome and danger associated molecular patterns (DAMPs) are implicated in cytokine and chemokine responses following stressor exposure // *Brain Behav. Immun.* – 2013. – № 28. – P. 54-62.
48. Miao E. A., Rajan J. V., Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death // *Immunol. Rev.* – 2011. – № 243. – P. 206-214.
49. Minkiewicz J., de Rivero Vaccari J. P., Keane R.W. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome // *Glia.* – 2013. – Vol. 61, № 7. – P. 1113-1121.
50. Netea M. G., Nold-Petry C.A., Nold M.F. et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages // *Blood.* – 2009. – № 113. – P. 2324-2335.
51. Rossol M., Pierer M., Raulien N. et al. Extracellular Ca<sup>2+</sup> is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors // *Nature Commun.* – 2012. – № 3. – P. 1329.
52. Sagulenko V., Thygesen S.J., Sester D.P. et al. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC // *Cell Death Differ.* – 2013. – doi: 10.1038/cdd.2013.37.
53. Salminen A., Ojala J., Suuronen T. et al. Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology // *J. Cell Mol. Med.* – 2008. – Vol. 12, № 6A. – P. 2255-2262.
54. Shi C.S., Shenderov K., Huang N.N. et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction // *Nature Immunol.* – 2012. – № 13. – P. 255-263.
55. Shi J.Q., Zhang C.C., Sun X.L. et al. Antimalarial drug artemisinin extenuates amyloidogenesis and neuroinflammation in APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic mice via inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation // *CNS Neurosci Ther.* – 2013. – Vol. 19, № 4. – P. 262-268.
56. Skaper S.D. The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2007. – № 1122. – P. 23-34.
57. Srinivasula S.M., Poyet J.L., Razmara M. et al. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 24. – P. 21119-21122.
58. Yin Y., Yan Y., Jiang X. et al. Inflammasomes are differentially expressed in cardiovascular and other tissues // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 311-322.
59. Zhou R., Yazdi A.S., Menu P. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation // *Nature.* – 2011. – № 469. – P. 221-225.

60. Zou J., Crews F.T. Inflammation-IL-1 $\beta$  Signaling Mediates Ethanol Inhibition of Hippocampal Neurogenesis // *Front Neurosci.* – 2012. – № 6. – P. 77.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ\_ККФПННТД (конкурс региональных проектов «Сибирь», № 13-04-98091).

#### Сведения об авторах

Кувачева Наталья Валерьевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: natalya.kuvacheva@gmail.com.

Моргун Андрей Васильевич – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры педиатрии ИПО ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2433952; e-mail: 441682@mail.ru.

Хилажева Елена Дмитриевна – научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: elena.hilazheva@mail.ru.

Малиновская Наталья Александровна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: konsuelo81@mail.ru.

Горина Яна Валерьевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: pozhilenkova@yandex.ru.

Фролова Ольга Васильевна – научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: frolova\_olga86@mail.ru.

Труфанова Людмила Васильевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: trufanova@mail.ru.

Мартьянова Галина Петровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой детских инфекционных болезней с курсом ПО ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2243295; e-mail: doc-martynova@yandex.ru.

Салмина Алла Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: allasalmina@mail.ru.

© ЗАМАЙ Т. Н., ЗАМАЙ С. С., БОРИСОВ А. Г., САВЧЕНКО А. А., ЗАМАЙ Г. С., КОЛОВСКАЯ О. С., ЗАМАЙ А. С., МЕЗЬКО В. С.

УДК 57.089.2

## МИКРОФЛЮИДНЫЕ УСТРОЙСТВА В ДИАГНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Т. Н. Замай<sup>1</sup>, С. С. Замай<sup>1</sup>, А. Г. Борисов<sup>2</sup>, А. А. Савченко<sup>1</sup>, Г. С. Замай<sup>1</sup>, О. С. Коловская<sup>1</sup>, А. С. Замай<sup>1</sup>, В. С. Мезько<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, ректор – д. м. н., проф. И. П. Артюхов; кафедра биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, зав. – д. м. н., проф. А. Б. Салмина;

<sup>2</sup> ООО «МедБиоТех», директор – к. м. н. А. Г. Борисов.

**Резюме.** В обзоре рассматриваются работы, в которых показаны перспективы диагностики онкологических заболеваний с помощью методов определения уровня циркулирующих опухолевых клеток в крови онкобольных. Указаны основные трудности выявления циркулирующих опухолевых клеток с помощью традиционных методов и преимущества использования микрофлюидных систем. Обсуждаются основные типы микрофлюидных устройств, способных выявлять даже одиночные циркулирующие опухолевые клетки в крови онкобольных. Отмечается, что несмотря на успехи, достигнутые в разработке методов детекции циркулирующих опухолевых клеток, в клиническую практику микрофлюидные устройства для диагностики онкозаболеваний пока не внедрены.

**Ключевые слов :** диэлектрофорез, микрофлюидные устройства, аптамеры, онкологические заболевания, циркулирующие опухолевые клетки, диагностика.

Одним из наиболее важных свойств опухолевых клеток является изменение их морфологии, выражающееся в ухудшении адгезионных взаимодействий клеток друг с другом и внеклеточным матриксом, что приводит к увеличению их подвижности и попаданию в кровоток [2]. Подсчитано, что опухоль массой 1 грамм высвобождает в кровяное русло ежедневно около 1 млн. опухолевых клеток, часть

из которых может давать метастазы [20] (рис.1). Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) появляются в кровяном русле уже на ранних стадиях канцерогенеза, а также при его рецидивах, поэтому их число является важным показателем степени развития опухолевого процесса. Экспериментально установлено, что уровень ЦОК может стать предиктором выживаемости пациентов с метастатическим