

УДК 577.112.017

# PEDF – неингибиторный серпин с нейропротекторной и антиангиогенной активностями

Н. И. Минкевич, В. М. Липкин, И. А. Костанян\*

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: iakost@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 29.06.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Фактор дифференцировки из пигментного эпителия PEDF (Pigment epithelium-derived factor), гликопротеин с молекулярной массой 50 кДа принадлежит к семейству неингибиторных серпинов. PEDF регулирует большое число физиологических процессов: стимулирует дифференцировку клеток ретинобластомы в нейроны, потенцирует рост и жизнеспособность фоторецепторных клеток и нейронов центральной нервной системы. Более того, этот фактор защищает нейрональные клетки от апоптоза. PEDF является не только нейротрофным фактором, но и природным ингибитором ангиогенеза. Точные молекулярные механизмы действия PEDF в настоящее время еще не полностью ясны. Тем не менее, учитывая огромный нейропротекторный, нейротрофный и антиангиогенный потенциал PEDF, а также его биологически активных фрагментов, к этому белку проявляется огромный интерес исследователей как к перспективному препарату для терапии широкого спектра нейродегенеративных, офтальмологических и онкологических заболеваний. В обзоре суммированы современные данные о структурных особенностях, биохимических свойствах PEDF, его многомодалных функциях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** PEDF (pigment epithelium-derived factor, фактор дифференцировки из пигментного эпителия), серпин, нейротрофный фактор, ангиогенез.

## ВВЕДЕНИЕ

Фактор PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor – фактор дифференцировки из пигментного эпителия) был впервые идентифицирован в 1989 г. группой американских исследователей под руководством L.V. Johnson в культуральной среде клеток пигментного эпителия сетчатки глаза, выделенных из плода человека [1, 2]. При изучении действия данной среды на клетки ретинобластомы линии Y-79 было обнаружено, что она вызывает остановку неограниченного роста и деления клеток. При этом более 90% клеток приобретают морфологические и биохимические характеристики зрелых нейронов [1]. С помощью электрофоретических и хроматографических методов из культуральной среды был выделен белок с молекулярной массой около 50 кДа, обладающий указанным действием на клетки Y-79. Как было установлено позднее, PEDF человека состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 418 а.о. (рис. 1) [3].

Практически одновременно PEDF был выделен из культуры легочных фибробластоподобных клеток человека линии WI-38 [4]. Был также обнаружен и его

мышинный аналог, каспин [5]. Степень гомологии кДНК человеческого PEDF и каспина составляет 82.7%, а их аминокислотных последовательностей – 85.6%.

К настоящему времени известно, что PEDF экспрессируется почти во всех тканях млекопитающих и птиц и выполняет множество функций. К их числу относятся: дифференцирующее действие на эмбриональные и опухолевые клетки; протекторное действие на зрелые нейроны и другие клетки, входящие в состав нервной ткани; антиангиогенная активность – способность ингибировать образование новых сосудов. Поэтому данный белок представляет большой интерес как регуляторный фактор развития клеток и тканей.

## ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ PEDF И КОДИРУЮЩЕГО ЕГО ГЕНА

### Ген PEDF человека и кодируемый им белок

Ген *pedf* человека локализован в коротком плече хромосомы 17 на его дистальном участке – 17p13.3 [6, 7]. Он имеет длину около 16 т.п.н. и включает в себя 8 эк-



**Рис. 1.** Аминокислотная последовательность фактора PEDF. Жирным красным шрифтом выделена связь Leu382–Thr383. Желтым фоном – серпиновая петля, голубым – сайт N-гликозилирования. Зеленым – пептид, ответственный за антиангиогенную функцию; сиреневым – пептид, ответственный за нейротрофную функцию. Серым – сайты фосфорилирования. Синим – кластер отрицательно заряженных аминокислот, коричневым – положительно заряженных аминокислот.

зонов, разделенных 7 интронами. Экзон-интронные контакты подчиняются консенсусному правилу GC/AG. Длина экзонов варьирует от 92 до 377 п.н. Промоторный регион гена расположен в 5'-фланкирующей области; при этом СААТ-блок находится в позиции -43 относительно точки инициации транскрипции. В 5'-концевой области гена *pedf*, вплоть до -5 т.п.н., находится кластер Alu-повторов, включающий 8 полных и 3 частичных Alu-элемента [8].

Ген *pedf* кодирует последовательность из 418 а.о. [3]. В N-концевой части PEDF, сразу после инициаторного метионина, находится 17-членный гидрофобный участок с последовательностью, характерной для сигнального фрагмента, обеспечивающего секрецию белка из клетки [3, 9]. Однако, по некоторым данным, последовательность зрелого PEDF, секретируемого из клеток-продуцентов, начинается с позиции Asn21; в соответствии с этим, зрелая полипептидная цепь содержит 398 а.о. [10, 11]. Посттрансляционные модификации PEDF плазмы крови включают N-концевой остаток пироглутаминовой кислоты, образующийся в результате дезаминирования остатка Gln2, и канонический сайт N-гликозилирования -Asn-Leu-Thr- в положениях 285–287. Присоединяемые полисахаридные структуры гетерогенны и имеют молекулярный вес около 4 кДа; их наличие объясняет разницу между расчетной и реальной массами фактора [12]. По данным двумерного электрофореза, секретируемый клетками пигментного эпителия человека PEDF существует в четырех изоформах, изоэлектрические точки которых равны 6.0; 6.2; 6.4 и 6.6 [13].

**PEDF – член семейства неингибиторных серпинов**

На основании анализа первичной структуры белка и соответствующей ему кДНК, PEDF был отнесен к семейству серпинов – ингибиторов сериновых протеиназ [14]. Гомология аминокислотной последовательности фактора с  $\alpha_1$ -антитрипсином составляет 27% (с учетом равноценных замен – 42%), с  $\alpha_1$ -антихимотрипсином и  $\alpha_2$ -плазминовым ингибитором – 27 и 26% (с учетом равноценных замен – 44 и 43% соответственно) (рис. 2) [3]. Идентичность 51 а.о., необходимых для формирования пространственной структуры серпинового типа [15], в PEDF и других серпинах составляет более 76% [16]. Несмотря на высокую гомологию первичных и третичных

довательности фактора с  $\alpha_1$ -антитрипсином составляет 27% (с учетом равноценных замен – 42%), с  $\alpha_1$ -антихимотрипсином и  $\alpha_2$ -плазминовым ингибитором – 27 и 26% (с учетом равноценных замен – 44 и 43% соответственно) (рис. 2) [3]. Идентичность 51 а.о., необходимых для формирования пространственной структуры серпинового типа [15], в PEDF и других серпинах составляет более 76% [16]. Несмотря на высокую гомологию первичных и третичных

HUMA1AT	MPSSVSWGILLAGLCLVPVSLAEDPQDAAQKTDTSHHQD--HP
PEDF	MQALVLLLCIGALLGHSSCQNPASPPPEEGSPDPDSTGALVEEEDPFFKV
HUMA1AT	TFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFSPVSIATAFAMLSLGTKA
PEDF	PVNKLAARVSNFGYDLYRVRSSMSPPTNVLLSPLSVATALSALSGLADE
HUMA1AT	DTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRTLNQDPSQLQLTGNGLF
PEDF	RTESI IHRALYYDL--ISSPDIGHGTYKELLDVTAPQKNK-SASRIVE
HUMA1AT	LSEGLKLVDFLEVDKVLHSEAFVNFVGDHEEAKKQINDYVEKGTQGK
PEDF	-EKKLRIKSSSFVAPLEKSYGTRPVLVLT-GNPRLDLQEIINNWWQAQMKGG
HUMA1AT	IVDLVKELDRDVFVAVNVIFFKQKWERPFVVKDTEDEDFHVDQVTTVK
PEDF	LARSTKEIPDEISILLGVAHFRGQVMTKFDNRKTSLEDFYLDEERTVR
HUMA1AT	VPMMKRLG-MFNIQHCCKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDE--GKLQHL
PEDF	VPMMSDPKAVLRYGLSDSLSCIKI AQLPLTGSMSI IFFLPLKVTQNLTI
HUMA1AT	ENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTVDLKSVLGQLGITKVF
PEDF	EESLTSEF IHDIDRELKTVQAVLTVPKLKSIEYEVTKSLQEMKLSL
HUMA1AT	SNGADLSGVTEEAPLKLKSAVHKAVLTIDKRGTEAAGAMFLEAIPMSIP
PEDF	-DSPDFSKITGK-PIKLTVQVEHRAGFEWNEEDGAGTTPSPGLQPAHLTFP
HUMA1AT	PEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPFLMGKVVNPTQK
PEDF	LDYHLNQPFIFVLRDRTDTGALLFIGKILDPRGP

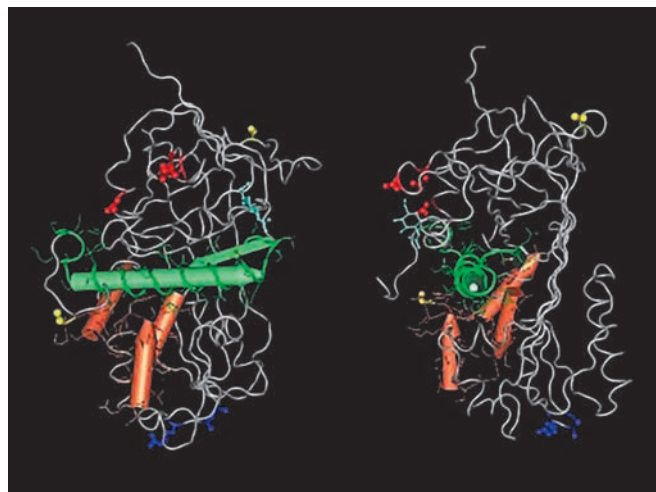
**Рис. 2.** Сравнение аминокислотных последовательностей PEDF человека и  $\alpha_1$ -антитрипсина человека (HUMA1AT). Двоеточием отмечены одинаковые аминокислоты, точками – консервативные замены [3].

структур с ингибиторами сериновых протеиназ, сам фактор не является ингибитором этих ферментов [17]. Возможно, это объясняется структурными особенностями экспонированной реакционной петли фактора. Хотя она имеет равную с другими серпинами длину (17 а.о., Glu366-Leu382) [18, 19], в ее составе отсутствуют характерные для ингибиторных серпинов элементы – Ala-обогащенная последовательность (положения в петле с 9 по 12) и Thr в положениях 8 и 14, но присутствуют нехарактерные для них остатки пролина [16].

В структуре PEDF, как и в структурах прочих серпинов, имеется наиболее подверженная протеолизу связь, расположенная в экспонированной в цитоплазму петле [14]. При ограниченном протеолизе PEDF многими сериновыми протеиназами (химотрипсином, эластазой, субтилизином и др.) его молекулярная масса уменьшается примерно на 4 кДа. Установлено, что данные протеиназы гидролизуют связь Leu382–Thr383, что приводит к отделению от молекулы 36-членного фрагмента с С-конца. В отличие от ингибиторных серпинов, ковалентная связь между молекулой PEDF и активным центром протеиназы не образуется. PEDF с отщепленным С-концевым фрагментом в полной мере сохраняет свою способность вызывать дифференцировку клеток линии Y-79 в зрелые нейроны [20].

После отделения 36-членного фрагмента (в результате протеолиза связи Leu382–Thr383) наблюдается уменьшение общей эллиптичности молекулы, что свидетельствует об уменьшении ее  $\alpha$ -спиральности. При этом в противоположность ингибиторным серпинам устойчивость молекулы к термической денатурации снижается. Конформационные изменения, однако, не носят глобального характера и затрагивают лишь С-концевую часть молекулы, приближенную к экспонированной петле. Функциональная роль последней, а также отделяемого при ее расщеплении С-концевого фрагмента молекулы PEDF изучены недостаточно. По некоторым данным, остатки, расположенные в этой части молекулы, наряду с N-концевым сигнальным пептидом необходимы для секреции PEDF из клеток.

Удаление фрагментов Pro415–Pro418 и Pro373–Ala380, а также точечные замены какого-либо из остатков Gly376, Leu377, Pro393, Phe394 или Phe396 (первые два расположены в экспонированной петле) приводят к изменению пространственной структуры молекулы или изменению ее взаимодействия с другими белками, предположительно, переносчиками. Нарушается транспорт PEDF из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи, вследствие чего он не секретируется [16, 21].



**Рис. 3.** Трехмерная кристаллическая структура PEDF. Показаны две проекции молекулы по вертикальной оси со сдвигом в  $90^\circ$ . Ответственный за антиангиогенную функцию пептид выделен зеленым, ответственный за нейротрофную функцию – оранжевым. Красным цветом показаны отрицательно заряженные аминокислоты, образующие коллагенсвязывающий кластер, фиолетовым – положительно заряженные, формирующие «ядро» гликозаминогликансвязывающего кластера. Сайты фосфорилирования (Ser114 и Ser227) показаны желтым, сайт гликозилирования Asn285 с присоединенными остатками сахаров – голубым [23].

### Пространственная структура PEDF. Асимметричное расположение положительных и отрицательных зарядов в молекуле PEDF

Зрелая молекула фактора представляет собой глобулу с радиусом  $<3.05$  нм. Около 60% а.о. PEDF участвуют в образовании десяти  $\alpha$ -спиралей и трех  $\beta$ -слоев [22]. В положениях Ser24, Ser114 и Ser227 находятся сайты фосфорилирования. Фактор содержит две аминокислотные последовательности, 34-членную (Asp34–Asn77) и 44-членную (Val78–Thr121), ответственные за антиангиогенные и нейротрофные взаимодействия соответственно (рис. 3) [23].

Характерной структурной особенностью молекулы PEDF является наличие кластеров положительно и отрицательно заряженных аминокислот, расположенных на разных сторонах глобулы. Они обуславливают способность фактора к электростатическому связыванию с элементами внеклеточного матрикса – гликозаминогликанами и коллагеном [24–25].

Кластер отрицательно заряженных остатков Asp и Glu локализован в двух областях полипептидной цепи, расположенных на поверхности глобулы и пространственно сближенных: Glu41–Asp64 (остатки Glu41, Glu42, Glu43, Asp44, Asp64) и Asp256–Glu304

(остатки Asp256, Asp258, Glu290, Glu291, Glu296, Asp300, Glu304). Наличие этого кластера обуславливает сродство PEDF к коллагенам типов I, II и III [25]. Связывание PEDF как с коллагенами, так и с гликозаминогликанами, имея электростатическую природу, ослабляется при повышении ионной силы окружающей среды. Пептидные фрагменты Val40-Arg67 и Phe277-Phe301, участвующие в образовании кластера, эволюционно чрезвычайно консервативны от млекопитающих до рыб [16].

Кластер положительно заряженных аминокислот, включающий 12 остатков Arg, Lys и His, расположен в области Lys134-Lys214. Остатки Lys134, Lys137, Lys189, Lys191, His212 и Lys214 формируют «ядро» кластера, остатки Arg141, Lys146, Lys147, Arg149, Arg165, Arg167 расположены по его краям. За счет локального положительного заряда молекула PEDF способна связываться с полианионными матрицами, богатыми отрицательно заряженными сульфогруппами – гепарином, хондроитинсульфатом и др. Данный кластер принимает участие во взаимодействии PEDF с гликозаминогликанами интерфоторецепторного матрикса сетчатки [24].

Помимо цитоплазмы, PEDF был обнаружен во внутриядерном пространстве. По всей вероятности, положительно заряженный фрагмент фактора Lys146-Arg149 может представлять собой сигнал внутриядерной локализации. Следует отметить, что только 10 из 6000 изученных белков, подобно PEDF, имеют С-концевой сайт гликозилирования; при этом все они – ядерные белки [16]. Возможно, PEDF в качестве ядерного белка принимает участие в регулировании клеточного цикла.

Заряды расположены на поверхности молекулы PEDF асимметрично – кластеры кислых и основных аминокислот находятся на противоположных сторонах глобулы. Это обеспечивает PEDF возможность взаимодействовать с гликозаминогликанами и коллагеном одновременно. Взаимодействие с гликозаминогликанами усиливает сродство PEDF к коллагену и наоборот [25]. Таким образом, PEDF способен к модуляции процессов клеточной адгезии, включающих в себя интегрин-коллагеновое взаимодействие. Поскольку клеточная адгезия является одной из ключевых стадий ангиогенеза, этим может объясняться антиангиогенное действие фактора [25].

### **Степень фосфорилирования молекулы PEDF влияет на его антиангиогенную и нейротрофную активности**

На поверхности молекулы PEDF расположены три сайта фосфорилирования (Ser24, Ser114 и Ser227). Выделяемый из плазмы крови человека фактор является фосфопротеином. Фосфорилирование осуществ-

ляется в процессе циркуляции фактора в крови ферментами казеинкиназой 2 и протеинкиназой А [26]. Казеинкиназа 2 фосфорилирует фактор по остаткам Ser24 и Ser114, протеинкиназа А – по единственному остатку Ser227. Показано, что фосфорилирование PEDF обеими киназами существенно влияет на его физиологические функции. Фосфорилированный только по сайтам казеинкиназы 2 фактор имеет сниженную нейротрофную активность; при этом его антиангиогенная активность значительно повышена. Фосфорилированный только протеинкиназой А фактор имеет сниженную антиангиогенную и практически не измененную нейротрофную активности. Полностью фосфорилированный фактор имеет высокие и антиангиогенную, и нейротрофную активности. При добавлении к отрицательному заряду, образовавшемуся в результате фосфорилирования фактора казеинкиназой 2, отрицательного заряда в сайте фосфорилирования протеинкиназой А усиливается способность фактора ингибировать клеточную пролиферацию. Следует отметить, что в составе PEDF имеются и другие потенциальные сайты фосфорилирования, однако при нормальном фолдинге молекулы они остаются недоступными для киназ.

Фосфорилирование по сайтам казеинкиназы 2 предотвращает возможное модифицирование третьего сайта протеинкиназой А, в то время как фосфорилирование по Ser227 никак не влияет на взаимодействие PEDF с казеинкиназой 2. Потеря протеинкиназой А способности взаимодействовать с фактором при уже фосфорилированных Ser24 и Ser114 объясняется конформационной маскировкой Ser227 при фосфорилировании сайтов казеинкиназы 2, несмотря на то, что эти два сайта расположены в разных областях молекулы [27].

### **Распространенность и эволюционная консервативность фактора PEDF**

Ген *pedf* эволюционно консервативен – он присутствует в геномах различных видов от человека до рыб (рис. 4, 5) [16].

Методом ДНК-РНК-гибридизации установлено наличие мРНК PEDF почти во всех из 44 исследованных тканей взрослого человека и человеческого эмбриона. Предположительно, PEDF экспрессируется главным образом теми типами клеток, которые не утратили способность к делению *in vivo* [28]. В различных отделах глаза и слоях сетчатки взрослого человека и эмбриона антитела к полипептиду PEDF взаимодействовали с цитоплазмой развивающихся фоторецепторов, глиальным слоем, отдельными клетками слоя нейробластов и пигментными гранулами клеток пигментного эпителия с 8-й недели эмбрионального развития. У взрослого организма они

**Рис. 4.** Сравнение аминокислотных последовательностей фактора PEDF. Четырнадцать последовательностей фактора разных биологических видов (человек, *Homo sapiens*; шимпанзе, *Pan troglodytes*; бык, *Bos taurus*; свинья, *Sus scrofa*; собака, *Canis canis*; мышь, *Mus musculus*; крыса, *Rattus norvegicus*; курица, *Gallus gallus*; тропическая лягушка, *Xenopus tropicalis*; шпорцевая лягушка, *Xenopus laevis*; японская рисовая рыбка, *Oryzias latipes*; рыба фуру, *Takifugu rubripes*; радужная форель, *Micropterus salmoides*; микисси, *Danio rerio*) проанализированы с помощью программы ClustalW. Звездочкой отмечены позиции, занимаемые полностью консервативным остатком. Двоеточие – консервативна одна из «сильных» функциональных групп; точка – консервативна одна из «слабых» групп. Синей линией обозначена лидерная последовательность PEDF. Двойной красной линией выделены области высокой консервативности между всеми последовательностями PEDF. Проверки использованы для максимального выравнивания последовательностей [16].



	Hs	Chimp	Bt	Pig	Dog	Mm	Rt	Chick	Xt	Xl	Fugu	Trout	Zebra
Hs	100												
Chimp	99	100											
Bt	87	88	100										
Pig	88	88	90	100									
Dog	90	90	87	88	100								
Mm	86	85	84	84	87	100							
Rt	83	83	82	82	87	93	100						
Chick	63	63	63	63	62	63	63	100					
Xt	55	55	55	56	56	56	56	55	100				
Xl	56	57	57	58	57	57	56	53	89	100			
Fugu	34	35	36	36	36	36	35	35	34	35	100		
Trout	37	37	39	38	36	37	37	39	38	38	64	100	
Zebra	40	40	41	41	41	40	39	42	41	40	56	65	100

Рис. 5. Межвидовая гомология аминокислотных последовательностей фактора PEDF в процентах. Таблица получена с помощью программы PSI-Blast [16].

взаимодействовали с ядрами палочек (но не колбочек), цитоплазмой некоторых клеток во внутреннем ядерном и глиальном слоях, с клетками пигментного эпителия, хориокапиллярным слоем роговицы, зрачком, а также цилиарным эпителием [29].

Наибольшей видовой консервативностью среди пептидных фрагментов фактора обладают следующие последовательности [16]. Эволюционно консервативен лидерный N-концевой участок фактора, ответственный за секрецию PEDF из клетки [30]. Высоко консервативна последовательность Asn285-X-Thr287, являющаяся сайтом N-гликозирования. Также консервативными участками являются четыре пептидных фрагмента, два из которых уникальны для PEDF и образуют кластер отрицательно заряженных аминокислот, а два других (в положениях Val78-Gly95 и Phe384-Pro415) имеют высокую гомологию с другими серпинами. Видимо, присущие им функции фундаментальны для всех серпинов.

### ЭФФЕКТЫ, ОКАЗЫВАЕМЫЕ PEDF НА КЛЕТКИ И ТКАНИ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

#### Дифференцирующее действие PEDF и его влияние на метаболизм

Дифференцирующее действие нейротрофного фактора PEDF было показано и изучено на тканях нейрального происхождения – как на эмбриональных (незрелые нейроны, развивающиеся фоторецепто-

ры) [31, 32], так и на опухолевых (нейробластома, ретинобластома, карцинома) [3, 33, 34]. Человеческий и бычий PEDF оказывают дифференцирующее действие *in vitro* на клетки культуры незрелых двигательных нейронов спинного мозга, выделенных из эмбрионов цыплят в возрасте 5.5 сут [35]. PEDF – основной фактор, обеспечивающий нормальный морфогенез и метаболизм фоторецепторных и глиальных клеток при эмбриональном развитии сетчатки глаза [32, 36, 37].

PEDF оказывает дифференцирующее и антипролиферативное воздействие на клетки ретинобластомы линии Y-79 [1, 3]. Противоопухолевое действие фактора распространяется и на нейробластома. При этом заболевании клинический прогноз бывает тем лучше, чем больше в популяции дифференцированных нейронов и Шванновских клеток, культуральная среда которых обладает противоопухолевыми свойствами [38]. Именно PEDF, являющийся секреторным продуктом Шванновских клеток, определяет противоопухолевые свойства их культуральной среды [33].

PEDF оказывает противоопухолевое действие на карциному эпителия яичников, являющуюся наиболее летальной из гинекологических раковых опухолей. Уровень экспрессии PEDF в раковых опухолях яичников и их клеточных линиях значительно снижен по сравнению с нормальным эпителием яичников. Экзогенный PEDF ингибирует рост клеток

линий нормального и ракового эпителия яичников, в то время как снижение активности эндогенного PEDF путем введения ингибиторов усиливает рост этих клеток.

Действие PEDF в клетках эпителия яичников в значительной степени регулируется эстрогенами. Обработка культивируемых клеток  $17\beta$ -эстрадиолом снижает экспрессию фактора и его мРНК, угнетая транскрипцию гена *pedf*. В регуляции принимает участие рецептор эстрогена.  $17\beta$ -Эстрадиол способствует росту нормальных и раковых клеточных линий эпителия яичников, в то время как совместная обработка  $17\beta$ -эстрадиолом и PEDF отменяет ростовое стимулирование [34].

В некоторых линиях клеток карциномы яичника делетирован участок 17-й хромосомы 17p13.3, имеющий длину 15 т.п.н. и включающий в себя почти весь ген *pedf* [39]. На эти клеточные линии  $17\beta$ -эстрадиол не оказывает пролиферативного воздействия, что позволяет предположить делецию участка его воздействия, расположенного в 5'-фланкирующей области гена фактора. Эпигенетические изменения, такие, как гиперметилирование промотора, могут служить альтернативным механизмом регуляции уровня экспрессии фактора [34].

PEDF в клетках пигментного эпителия стимулирует синтез и накопление меланина [40], о важности которого в развитии нейронов сетчатки свидетельствует тот факт, что все млекопитающие альбиносы независимо от причин альбинизма имеют те или иные нарушения передачи зрительного сигнала [41]. Фактор также повышает активность промотора гена тирозиназы – фермента, ответственного за синтез меланина [42].

### Нейропротекторное действие PEDF

Показана способность PEDF предотвращать апоптотическую гибель клеток культуры сетчаточных нейронов под действием  $H_2O_2$  [43]. Предварительная обработка фактором защищает пигментный эпителий от вызываемых  $H_2O_2$  нарушений его барьерных функций. Он также предохраняет клетки от вызываемых перекисью водорода перераспределения синаптических белков окклюдина и N-кадгерина в составе клеточных мембран пигментного эпителия, от реорганизации актина и активации сигнального каскада белка теплового шока p38/27-кДа, который ее опосредует [44].

Фактор оказывает протекторное действие на культуру первичных гранулярных клеток мозжечка, выделенных из 8-дневных крысят, значительно замедляя апоптоз клеток этой культуры, происходящий спонтанно или же вызванный депривацией сыворотки [45, 46]. Также PEDF предохраняет грануляр-

ные клетки мозжечка [47], нейроны гиппокампа [48] и двигательные нейроны спинного мозга [49] от токсического действия глутамата. По некоторым данным, основой механизма антиапоптотического действия PEDF на гранулярные клетки является активация транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [50].

### Антиангиогенное действие PEDF

PEDF является одним из наиболее мощных антиангиогенных факторов. Он ингибирует рост сосудов в роговице крысы, стимулированный сильнейшим ангиогенным фактором – bFGF. Действующая концентрация PEDF меньше, чем для наиболее мощных из известных антиангиогенных агентов – ангиостатина, эндостатина и тромбоспондина [51]. Фактор участвует в комплексном сбалансированном контроле ангиогенеза, противодействуя эффекту ангиогенных факторов, прежде всего VEGF (vascular endothelial growth factor) и bFGF (basic fibroblast growth factor) [52–55].

Насыщение тканей кислородом влияет на концентрацию PEDF. При гипероксигенации у животных формируется сетчатка с пониженным количеством сосудов, при этом уровень экспрессии PEDF оказывается повышенным [56]. Гипероксигенация стимулирует выработку фактора; гипоксия, напротив, угнетает ее.

В настоящее время выясняется механизм антиангиогенного эффекта PEDF. Эндотелиальные клетки обладают положительным хемотаксисом в отношении ангиогенных факторов. Соответственно один из предположительных механизмов такого действия PEDF заключается в ингибировании хемотаксиса эндотелиальных клеток, образующих стенки кровеносных сосудов, по отношению ко всем исследованным ангиогенным факторам – VEGF, PDGF, IL-8 и др. [51].

По другим данным, причиной антиангиогенного эффекта PEDF является апоптоз эндотелиальных клеток [57]. Характерной особенностью фактора является селективное влияние только на развивающиеся сосуды, повреждения уже существующих он не вызывает [58]. Причиной такого избирательного действия служит инициация апоптоза, опосредованная Fas-лигандом [59]. Ангиогенные агенты стимулируют экспрессию эндотелиальными клетками ряда антиапоптотических молекул, повышающих их жизнеспособность [60], а также экспрессию Fas-рецепторов. Показано, что PEDF индуцирует выработку эндотелиальными клетками Fas-лигандов, что при наличии достаточной плотности Fas-рецепторов ведет к Fas-индуцированному апоптозу клеток развивающихся сосудов [59]. В сформированных же сосудах клетки эндотелия находятся в состоянии «ростового запрета» и в плотном контакте друг с другом; экспрессия

Fas-рецепторов в них снижена [61], что делает их защищенными от апоптотического действия PEDF.

Однако, помимо того что PEDF может вызывать апоптоз путем увеличения экспрессии Fas/FasL, должны быть дополнительные способы его воздействия на клетки, так как оно сохраняется у нокаутных по Fas и FasL мышей [57, 62, 63]. Показано, что PEDF способен активировать p38 MAPK в культуре эпителиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC), способствуя их фосфорилированию. Активация p38 приводит к дальнейшей активации каспаз 3, 8 и 9 и апоптотической гибели клетки [64].

Следует отметить, что фактор VEGF тоже способствует фосфорилированию p38, причем при совместной обработке с PEDF происходит потенцирование эффекта. Одной из важнейших функций VEGF является защита эндотелиальных клеток от апоптоза, в том числе и в условиях обеднения среды. Активация киназы p38 VEGF связана с регуляцией ее транскрипции [65, 66], реорганизацией цитоскелета и миграцией клеток [67]. Представляется вероятным, что пороговая концентрация фосфорилированной p38 MAPK, необходимая для проявления проангиогенных эффектов, ниже концентрации, требуемой для активизации клеточной гибели. Опосредованное PEDF повышение уровня содержания активированной p38 может приводить к превышению апоптотической пороговой концентрации белка и гибели клетки [64].

Стимулируя апоптоз эндотелиальных клеток, PEDF в то же время предотвращает апоптоз различных клеток нейрального происхождения. На эндотелиальные клетки разных фенотипов PEDF может оказывать и противоположное по характеру воздействие [68]. Вероятно, в таких случаях действие фактора реализуется по разным, не связанным между собой механизмам.

### РЕЦЕПТОР PEDF

Разнообразные функции PEDF, очевидно, реализуются по разным механизмам. Однако представляется вероятным, что в большинстве случаев взаимодействие PEDF с клеткой идет по лиганд-рецепторному типу; эффекты фактора блокируются антителами-антагонистами связывания с клеточной поверхностью [47, 69, 70].

Недавно в клетках сетчатки глаза методом двухгибридной системы был идентифицирован ген [72], белковый продукт которого представляет собой рецептор PEDF, названный PEDF-R. Ген локализован на участке 11p15.5 11 хромосомы и содержит 10 экзонов и 9 интронов. мРНК транскрипты *pedf-r* содержат 2122 основания. Они кодируют белковую последовательность из 504 аминокислот (масса

55.315 кДа), содержащую четыре консенсусных сайта N-гликозилирования. Экспрессируемый в эукариотических системах рецептор имеет массу около 81 кДа, близкую к массе ранее идентифицированных в клетках линии ретинобластомы человека Y-79, а также в гранулярных нейронах мозжечка крысы и в сетчатке быка, PEDF-связывающих белков клеточной поверхности [70, 71].

Рецептор встречается главным образом в клетках ретинального пигментного эпителия, на внутренних сегментах фоторецепторов и нейрональных клетках сетчатки, хотя во внешних сегментах палочек он не обнаружен. Помимо нормального ретинального пигментного эпителия, PEDF-R присутствует также в ряде других тканей и органов – в оптическом нерве, сосудистой оболочке глаза, в клетках ретинобластомы и раковых опухолей различного происхождения, а также в клетках мозга животных в условиях истощения серотонина и катехоламинов. Ген рецептора у млекопитающих эволюционно консервативен. Наибольшая его консервативность показана для PEDF-R человека и мыши (89%) и для PEDF-R человека и крысы (также 89%). Гомологичные гену PEDF-R последовательности обнаружены в геномах нематод (*Caenorhabditis elegans*) и комаров (*Anopheles gambiae*).

PEDF-R представляет собой трансмембранный белок, имеющий четыре трансмембранных, два внеклеточных и три внутриклеточных домена; N- и C-концы молекулы экспонированы во внутриклеточное пространство (рис. 6) [72].

PEDF-R способен связываться с PEDF с  $K_d \sim 3.03 \pm 0.716$  нМ как в растворе, так и в условиях иммобилизации одного из белков, не теряя эту способность даже после денатурации и рефолдинга. Посттрансляционные модификации, в частности N-гликозилирование, не являются необходимым условием для связывания фактора с ре-

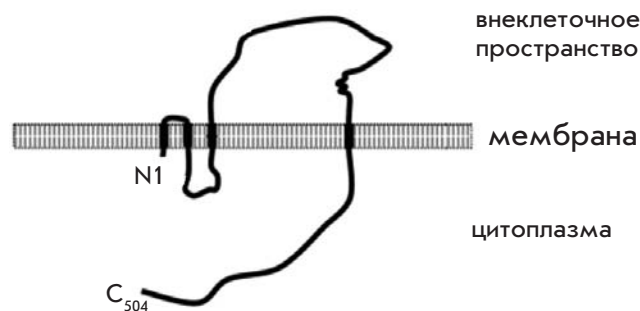


Рис. 6. Прогнозируемая по аминокислотной последовательности топология PEDF-R. Жирными линиями показаны трансмембранные участки [72].



цептором – экспрессированный в бактериальных системах PEDF-R взаимодействует с PEDF с практически неизменной константой диссоциации. Идентифицирован ответственный за связывание фактора фрагмент PEDF-R – 12c (Gln250-Arg383). Показано, что этот фрагмент высокоомологичен коллагену I крысы. Вероятно, однако, что не только этот фрагмент отвечает за связывание PEDF, поскольку фактор взаимодействует с полноразмерным рецептором с более высокой аффинностью, константа диссоциации последнего почти на 2 порядка выше, чем у фрагмента 12c ( $K_{d,12c} \sim 134$  нМ).

Во взаимодействии фактора с рецептором принимает участие фрагмент молекулы PEDF Val78-Thr121. Его синтетический 44-членный пептидный аналог сохраняет способность связываться с рецептором [70].

Помимо способности связывать PEDF, PEDF-R проявляет фосфолипазную активность и классифицирован как член семейства кальций-независимых фосфолипаз  $A_2$ . В последовательности PEDF-R идентифицировано 2 пространственно сближенных пататин-подобных фрагмента (Asn39-Ala54 и Ser158-Tyr177), образующих каталитическую диаду Ser47/Asp166, присутствующую в активных центрах пататина  $B_2$  и цитозольных фосфолипаз  $A_2$  человека [73].

Фосфолипазы  $A_2$  высвобождают лизофосфолипиды, участвующие в клеточной сигнализации и влияющие на развитие и функционирование всех систем органов млекопитающих [74]. Также фосфолипазы  $A_2$  высвобождают из клеточной мембраны биологически активные жирные кислоты, служащие вторичными мессенджерами или предшественниками эйкозаноидов, опосредующих передачу сигналов [75]. Наиболее часто встречающиеся в мембранах клеток сетчатки и центральной нервной системы арахидоновая и докозагексаеновая кислоты способны влиять на выживаемость клеток сетчатки и нервных клеток [76, 77] и подобно PEDF обладают противоопухолевой и антиангиогенной активностями [78, 79].

PEDF-R способен расщеплять арахидоноил-*sn*-глицерин-3-фосфохолин, высвобождая арахидоновую кислоту [80]; и, хотя в настоящий момент нет эмпирических данных о высвобождении PEDF-R докозагексаеновой кислоты, показано, что PEDF в субнаномолярных концентрациях способен активировать синтез и высвобождение ее производных в клетках линии ARPE-19 человека [81, 82]. Эти данные говорят о том, что PEDF может способствовать выживанию клеток сетчатки посредством влияния на липидные сигнальные пути, связанные с PEDF-R. При взаимодействии PEDF со своим рецептором PEDF-R происходит высвобождение из клеточных мембран жирных кислот и лизофосфолипидов, дей-

ствующих как пара-, так и аутокринно, с одной стороны повышая выживаемость и способность к дифференцировке нейрональных клеток, а с другой вызывая необратимую гибель опухолевых и эндотелиальных клеток [72].

### PEDF КАК СУБСТРАТ MMP-2 И MMP-9

Как уже упоминалось выше, регуляция ангиогенеза тесно связана с количественным соотношением между факторами дифференцировки VEGF и PEDF. Показано, что при возрастании концентрации экзогенного PEDF в модели хориоидальной неоваскуляризации стимулируется продукция VEGF эндотелиальными клетками. Увеличение концентрации VEGF, в свою очередь, может индуцировать продукцию матриксных металлопротеиназ MMP-2 и -9 (или соответственно желатиназ А и В). Активированные протеиназы расщепляют компоненты внеклеточного матрикса, а также связанный с ними PEDF, не воздействуя при этом на VEGF. Таким образом, в ответ на повышение концентрации PEDF усиливается его инактивация MMP, возрастает соотношение факторов VEGF/PEDF и стимулируется ангиогенез.

Наиболее доступным для протеолиза MMP-2 и -9 сайтом в составе PEDF является участок экспонированной петли, содержащий в своем составе связь Leu382-Thr383. Однако, помимо этой связи, последовательность PEDF содержит ряд частично или полностью “скрытых” третичной структурой сайтов протеолиза MMP-2 и -9, в меньшей степени доступных для атаки матриксными металлопротеиназами. Вероятно, в результате действия MMP-2 и/или -9 происходит постепенная потеря третичной структуры молекулы PEDF, что делает доступными для металлопротеиназ дополнительные внутренние связи. При полном протеолизе образуется множество пептидных продуктов, которые не проявляют антиангиогенной и нейротрофной активностей, хотя сохраняют способность связываться с внеклеточным матриксом. Таким образом, матриксные металлопротеиназы могут инактивировать PEDF тем же путем, что и в случае ингибиторных серпинов (например, антитрипсина и антитромбина III), действуя на реакционный центр петли и, предположительно, образуя с молекулой фактора устойчивый неактивный комплекс (хотя существование такого комплекса пока не обнаружено). Однако нельзя исключить возможность, что потеря PEDF его биологических активностей достигается путем постепенного полного протеолиза белка [83].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белок PEDF интенсивно изучается в течение ряда лет, причем с каждым годом число этих исследований возрастает. Выявлено, что этот белок является

регулятором широкого спектра процессов, происходящих в клетках и тканях различных эукариотических организмов, в том числе человека. PEDF находится в центре внутриклеточных взаимодействий высокого уровня, и, возможно, еще не все узлы метаболических путей клетки, в которых он участвует, выявлены. Антипролиферативная, антиангиогенная, протекторная, дифференцирующая и другие активности PEDF представляют чрезвычайный интерес

не только с точки зрения фундаментальной науки, но и в свете возможного терапевтического использования этого белка при лечении различных заболеваний, в том числе нейродегенеративных поражений зрительной и нервной систем, а также опухолевых процессов. ●

*Работа финансировалась Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tombran-Tink J, Johnson L.V. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1989. V. 30. P. 1700–1707.
- Tombran-Tink J, Chader G.J., Johnson L.V. // Exp. Eye Res. 1991. V. 53. P. 411–414.
- Steele F., Chader G.J., Johnson L.V., Tombran-Tink J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 1526–1530.
- Pignolo R.J., Cristofalo V.J., Rotenberg M.O. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 8949–8957.
- Kozaki K., Miyaishi O., Koiwai O., et al. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 15125–15130.
- Tombran-Tink J., Pawar H., Swaroop A., et al. // Genomics. 1994. V. 19. P. 266–272.
- Goliath R., Tombran-Tink J., Rodriguez I.R., et al. // Mol. Vis. 1996. V. 2. P. 5.
- Tombran-Tink J., Mazuruk K., Rodriguez I., et al. // Mol. Vis. 1996. V. 2. P. 11.
- von Heijne G. // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14. P. 4683–4690.
- Stratikos E., Alberdi E., Gettins P.G., Becerra S.P. // Protein Sci. 1996. V. 5. P. 2575–2582.
- Ortego J., Escribano J., Becerra S.P., et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1996. V. 37. P. 2759–2767.
- Petersen S.V., Valnickova Z., Enghild J.J. // Biochem. J. 2003. V. 374. P. 199–206.
- Tombran-Tink J., Shivaram S.M., Chader G.J., et al. // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 4992–5003.
- Carrell R.W., Pemberton P.A., Boswell D.R. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1987. V. 52. P. 527–535.
- Irving J.A., Pike R.N., Lesk A.M., Whisstock J.C. // Genome Res. 2000. V. 10. P. 1845–1864.
- Tombran-Tink J., Aparicio S., Xu X., et al. // J. Struct. Biol. 2005. V. 151. P. 130–150.
- Becerra S.P., Palmer I., Kumar A., et al. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 23148–23156.
- Huber R., Carrell R.W. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 8951–8966.
- Zhou A., Carrell R.W., Huntington J.A. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 27541–27547.
- Becerra S.P., Sagasti A., Spinella P., Notario V. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 25992–25999.
- Shao H., Schwartz I., Shaltiel S. // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. P. 822–831.
- Simonovic M., Gettins P.G.W., Volz K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 11131–11135.
- Becerra S.P. // Exp. Eye Res. 2006. V. 82. P. 739–740.
- Alberdi E., Hyde C.C., Becerra S.P. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 10643–10652.
- Meyer C., Notari L., Becerra S.P. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 45400–45407.
- Maik-Rachline G., Shaltiel S., Seger R. // Blood. 2005. V. 105. P. 670–678.
- Gettins P.G., Simonovic M., Volz K. // Biol. Chem. 2002. V. 383. P. 1677–1682.
- Pignolo R.J., Rotenberg M.O., Cristofalo V.J. // J. Cell. Physiol. 1995. V. 162. P. 110–118.
- Karakousis P., John C., Behling K., et al. // Mol. Vis. 2001. V. 7. P. 154–163.
- Tombran-Tink J., Shivaram S.M., Chader G.J., et al. // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 4992–5003.
- Isobe M., Emanuel B.S., Givol D., et al. // Nature. 1986. V. 320. P. 84–86.
- Jablonski M.M., Tombran-Tink J., Mrazek D.A., Iannaccone A. // J. Neurosci. 2000. V. 20. P. 7149–7157.
- Crawford S.E., Stellmach V., Huang X., et al. // Cell Sci. 2001. V. 114. P. 4421–4428.
- Cheung L.W.T., Au S.C.L., Cheung A.N.Y., et al. // Endocrinology. 2006. V. 147. P. 4179–4191.
- Houenou L.J., D'Costa A.P., Linxi L., et al. // J. Comp. Neurol. 1999. V. 412. P. 506–514.
- Jablonski M.M., Tombran-Tink J., Mrazek D.A., Iannaccone A. // Glia. 2001. V. 35. P. 14–25.
- Sugita Y., Becerra S.P., Chader G.J., Schwartz J.P. // J. Neurosci. Res. 1997. V. 49. P. 710–718.
- Brodeur G.M. // New Engl. J. Med. 1996. V. 334. P. 1537–1539.
- Phillips N.J., Ziegler M., Radford D.M., et al. // Cancer Res. 1996. V. 56. P. 606–611.
- Malchiodi-Albedi F., Feher J., Caiazza S., et al. // Int. J. Dev. Neurosci. 1998. V. 16. P. 423–432.
- Guillery R.W. // Trends Neurosci. 1986. V. 9. P. 364–367.
- Abul-Hassan K., Walmsley R., Tombran-Tink J., Boulton M. // Pigment Cell Res. 2000. V. 13. P. 436–441.
- Cao W., Tombran-Tink J., Chen W., et al. // J. Neurosci. Res. 1999. V. 57. P. 789–800.
- Ho T.C., Yang Y.C., Cheng H.C., et al. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 2006. V. 342. P. 372–378.
- Taniwaki T., Becerra S.P., Chader G.J., Schwartz J.P. // J. Neurochem. 1995. V. 64. P. 2509–2517.
- Araki T., Taniwaki T., Becerra S.P., et al. // J. Neurosci. Res. 1998. V. 53. P. 7–15.
- Taniwaki T., Hirashima N., Becerra S.P., et al. // J. Neurochem. 1997. V. 68. P. 26–32.
- DeCoster M.A., Schabelman E., Tombran-Tink J., Bazan N.G. // J. Neurosci. Res. 1999. V. 56. P. 604–610.
- Bilak M.M., Corse A.M., Bilak S.R., et al. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1999. V. 58. P. 719–728.
- Yabe T., Wilson D., Schwartz J.P. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 43313–43319.
- Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., et al. // Science. 1999. V. 285. P. 245–248.
- Ferrara N., Davis-Smyth T. // Endocr Rev. 1997. V. 18. P. 4–25.
- Klagsbrun M., Vlodavsky I. // Prog. Clin. and Biol. Res. 1988. V. 266. P. 55–61.

54. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., et al. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1994. V. 59. P. 471–482.
55. DiPietro L.A., Nebgen D.R., Polverini P.J. // *J. Vasc. Res.* 1994. V. 31. P. 178–185.
56. Smith L.E., Wesolowski E., McLellan A., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994. V. 35. P. 101–111.
57. Stellmach V., Crawford S., Zhou W., Bouck N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 2593–2597.
58. Bouck N. // *Trends Mol. Med.* 2002. V. 8. P. 330–334.
59. Volpert O.V., Zaichuk T., Zhou W., et al. // *Nat. Med.* 2002. V. 8. P. 349–357.
60. Gerber H.P., Dixit V., Ferrara N. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 13313–13316.
61. Aoudjit F., Vuori K. // *J. Cell. Biol.* 2001. V. 152. P. 633–644.
62. Barreiro R., Schadlu R., Herndon J., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003. V. 44. P. 1282–1286.
63. Mori K., Duh E., Gehlbach P., et al. // *J. Cell Physiol.* 2001. V. 188. P. 253–263.
64. Chen L., Zhang S., Barnstable C.J., Tombran-Tink J. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 348. P. 1288–1295.
65. Mayo L.D., Kessler K.M., Pincheira R., et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 25184–25189.
66. Read M.A., Whitley M.Z., Gupta S., et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 2753–2761.
67. Rousseau S., Houle F., Landry J., Huot J. // *Oncogene.* 1997. V. 15. P. 2169–2177.
68. Hutchings H., Maitre-Boube M., Tombran-Tink J., Plouët J. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 294. P. 764–769.
69. Wu Y.Q., Notario V., Chader G.J., Becerra S.P. // *Protein Expr. Purif.* 1995. V. 6. P. 447–456.
70. Alberdi E., Aymerich M.S., Becerra S.P. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 31605–31612.
71. Aymerich M.S., Alberdi E.M., Martinez A., Becerra S.P. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001. V. 42. P. 3287–3293.
72. Notari L., Baladron V., Aroca-Aguilar J.D., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 38022–38037.
73. Gettins P.G., Simonovic M., Volz K. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383. P. 1677–1682.
74. Goetzl E.J., Tigyi G. J. // *Cell. Biochem.* 2004. V. 92. P. 867–868.
75. Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A. // *FEBS Lett.* 2002. V. 531. P. 2–6.
76. SanGiovanni J.P., Chew E.Y. // *Prog. Retin. Eye Res.* 2005. V. 24. P. 87–138.
77. Kim H.Y., Akbar M., Kim K.Y. // *J. Mol. Neurosci.* 2001. V. 16. P. 279–284.
78. Rose D.P., Connolly J.M. // *Pharmacol. Ther.* 1999. V. 83. P. 217–244.
79. Rose D.P., Connolly J.M. // *Int. J. Oncol.* 1999. V. 15. P. 1011–1015.
80. Jenkins C.M., Mancuso D.J., Yan W., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 48968–48975.
81. Bazan N.G., Marcheselli V.L., Hu J., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005. V. 46. P. 167.
82. Marcheselli V.L., Bazan N.G., Hu J., et al. Program 148.9. Washington, D.C.: Society for Neuroscience, 2005.
83. Notari L., Miller A., Martinez A., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005. V. 46. P. 2736–2747.