

УДК 577.218

# Молекулярно-физиологические механизмы функционирования мембранных рецепторных систем

Е. С. Северин<sup>1\*</sup>, М. В. Савватеева<sup>2</sup><sup>1</sup>Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, 117149, Москва, Симферопольский б-р, 8<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: e.severin@mail.ru

Поступила в редакцию 16.11.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Молекулярная физиология представляет собой новую междисциплинарную область фундаментальных знаний о работе сложных биологических систем. Живая клетка – самая простая и одновременно сверхсложная биологическая система. После расшифровки генома человека молекулярная физиология на новом уровне исследует сложные системы клеточных взаимодействий на основе знаний о пространственной организации и функций рецепторов, их лигандов и белок-белковых взаимодействий. Достижения молекулярной физиологии последних лет связаны с изучением механизмов сенсорной рецепции и межклеточной передачи информации, молекулярной физиологии иммунной системы и других процессов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** молекулярная физиология, рецепторный портрет, вторичные мессенджеры, таргетные препараты, эпигенетическая диагностика, рак предстательной железы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия ткани предстательной железы; ПИН – простатическая интраэпителиальная неоплазия; ПСА – простатспецифический антиген; РПЖ – рак предстательной железы; AMACR (Alpha-methylacyl-coenzyme A Racemase) – метилацил-CoA-рацемеза; CGI – CpG-островок; DAG (Diacylglycerol) – диацилглицерин; DD3 (Differential Display Code 3) – высокоспецифичный для РПЖ ген *DD3*; EPCA (Early Prostate Cancer Antigen) – ранний антиген рака предстательной железы; *ERG4* – ген фактора транскрипции семейства ETC; *ETC* – ген фактора транскрипции, семейство факторов транскрипции; *ETV1* – ген фактора транскрипции семейства ETC; EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) – рецептор эпидермального фактора роста; GSTπ1 (Glutathione-S-Transferase π1) – глутатион-S-трансфераза класса π1; IP3 (Inositol Trisphosphate) – инозиттрифосфат; *RARβ2* (Retinoic Acid Receptor Beta 2) – ген рецептора β2 ретиноевой кислоты; *RASSF1A* (RAS Association Domain Family Protein 1A) – ген белка семейства доменов, ассоциированных с RAS; *TMPRSS2* (Transmembrane Serine Protease 2) – ген трансмембранной сериновой протеазы 2.

Рассматривая механизмы функционирования мембранных рецепторных систем, в первую очередь необходимо отметить успехи молекулярной физиологии в области регуляции процессов, протекающих в клетке, а также внутриклеточной передачи гормональных сигналов. В настоящее время концепция вторичных мессенджеров (вторичных посредников) по праву считается основополагающей в клеточной и физико-химической биологии, а также в молекулярной медицине. Однако в конце пятидесятых годов открытие первого биологически активного соединения с сигнальными функциями – сАМР – перевернуло представления о регуляции биохимических процессов в клетке и о механизмах работы внутриклеточных

систем передачи сигнала. Оказалось, что сигнальные молекулы, не способные проходить через клеточную мембрану, взаимодействуют с расположенными на ее внешней стороне специфическими рецепторами и ферментными системами. Таким образом, при взаимодействии с мембранными рецепторными системами биологически активные соединения определяют образование в клетке одного или нескольких вторичных мессенджеров – низкомолекулярных биологически активных соединений, передающих сигнал на внутриклеточные эффекторные структуры. К настоящему времени описано более 10 подобных соединений – это циклические нуклеотиды сАМР и сGMP, продукты инозитидного обмена – инозиттрифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG), а также ионы Ca<sup>2+</sup>,

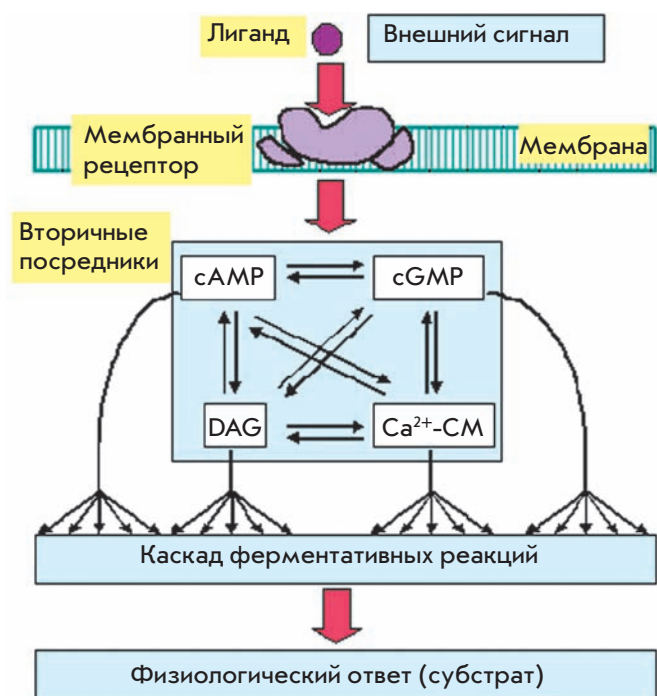


Рис. 1. Основные этапы передачи сигнала, опосредуемого вторичными посредниками, внутрь клетки.

полинуклеотид олигоА, монооксид азота (NO), продукты обмена арахидоновой кислоты и ряд других соединений липидной природы (рис. 1).

Оказалось, что ключевые этапы передачи сигнала, опосредуемого вторичными посредниками, общие для регуляторных систем: *агонист – рецептор – эффекторный белок – вторичный посредник – модулируемый белковый компонент – физиологический ответ*. Главные особенности вторичных посредников – их универсальность и триггерные свойства. При этом в роли эффекторов и их систем регуляции могут выступать как разнообразные молекулярные структуры (например, ионные каналы), так и многоступенчатые каскады ферментативных реакций.

За выдающиеся успехи в изучении данной группы биологически активных соединений во второй половине 20 века была присуждена не одна нобелевская премия. В разные годы ее лауреатами становились Э. Сазерленд, Е. Фишер и Э. Кребс, Ф. Гилман и М. Родбелл, П. Грингард, Л. Ингарро, Р. Фурчготт, Ф. Мурад и другие ученые. Необходимо отметить, что все основные достижения молекулярной физиологии так или иначе связаны с изучением рецепторов клеточной поверхности. Значительный вклад в понимание физиологии клетки был внесен благодаря изучению на молекулярном уровне нейронов голов-

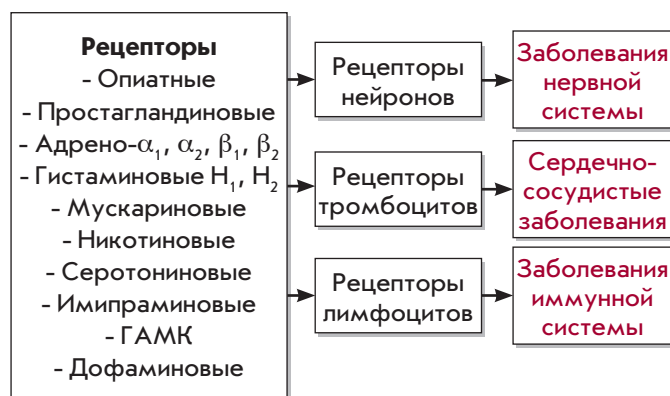
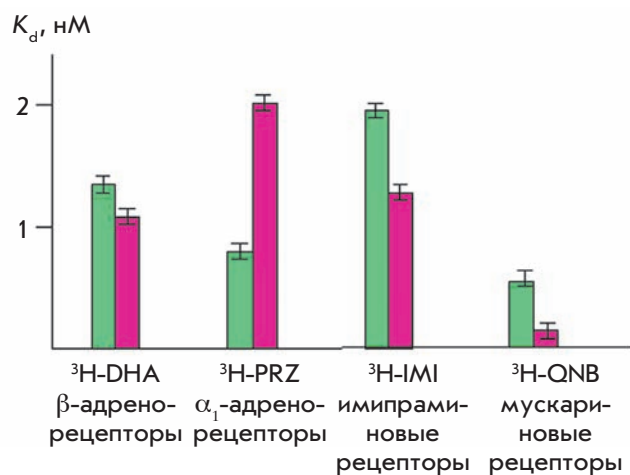


Рис. 2. Влияние рецепторного портрета клеток на особенности системных патологий (ГАМК –  $\gamma$ -аминомасляная кислота).

ного мозга, нейронных сетей и механизмов распространения нервного импульса.

Рецепторы клеточной мембраны подразделяют на два основных класса – ионотропные и метаболитропные. Ионотропные рецепторы представляют собой мембранные каналы, открываемые или закрываемые при связывании с лигандом. Возникающие при этом ионные токи модулируют внутриклеточные концентрации ионов, что может повторно приводить к активации систем внутриклеточных посредников. Метаболитропные рецепторы могут быть прямо связаны с системами вторичных посредников. Изменение конформации рецепторов данной группы при связывании с лигандом приводит к запуску каскада биохимических реакций и в конечном счете к изменению функционального состояния клетки. Рецепторы плазмалеммы играют важную роль в межклеточных коммуникациях, трансдукции сигнала внутрь клетки, проведении нервного импульса и во многих других клеточных функциях. Все многообразие рецепторов к лигандам различного типа, представленное на мембране конкретной клетки, составляет ее рецепторный портрет, детерминирующий виды физиологической активности этой клетки (рис. 2).

Следует отметить, что изучение функционирования комплекса рецепторов не только позволяет понять как «живет» нормальная клетка, но и проливает свет на молекулярные причины различных заболеваний. На уровне функционирования клеточных рецепторных систем прослеживается неразрывная связь между молекулярной физиологией и молекулярной медициной. Именно постулат П. Эрлиха об избирательном действии лекарственных препаратов на селективные мишени (1905 г.) послужил отправной точкой для развития фармакологической науки, в частности фармакодинамики, одна из основных за-



**Рис. 3.** Параметры связывания рецепторов альвеолярных макрофагов легких человека с лигандами в норме и при хроническом воспалении легких ( $^3\text{H}$  – тритий, DHA, PRZ, IMI, QNB – лиганды). Зеленым показаны значения  $K_d$  для лигандов в норме, малиновым – при хроническом воспалении легких.

дач которой состоит в изучении рецепторных механизмов действия лекарственных средств. Рецепторный портрет определяет не только функциональную активность нормальной клетки, но также и особенности патологических состояний самих клеток и целых органов. В последние годы подробно изучается как рецепторный портрет человека, так и его зависимость от течения патологического процесса в определенных органах-мишенях. Ранее нами были определены параметры главных рецепторных систем альвеолярных макрофагов человека в норме и при патологиях [1]. На примере величин констант диссоциации лигандов было показано, что профили физиологических параметров рецепторов существенно различаются в норме и при патологии (рис. 3).

Мы сравнили также активность ферментов системы фосфорилирования в нормальных клетках и в клетках злокачественных опухолей человека. Оказалось, что в нормальных и опухолевых клетках уровни активности ферментов значительно различаются, но при этом обнаружены общие для опухолевых клеток разного типа тенденции изменения активности исследованных киназ [2].

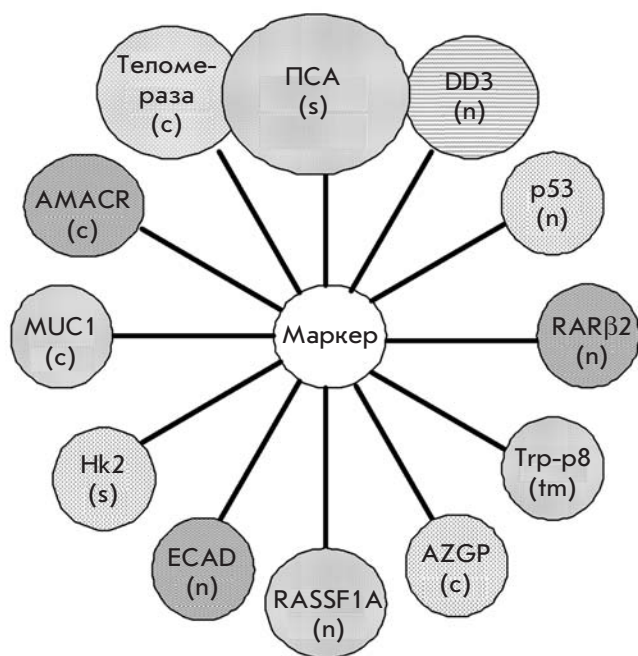
В целом, в настоящее время происходит лавинообразное накопление экспериментальных данных о внутриклеточной «машинерии», тонкостях молекулярных механизмов синаптической передачи, а также знаний о структуре и функциях нормальных и дефектных генов и белков.

Важность функций мембранных рецепторов и их пространственная локализация делают эти молеку-

лы главными мишенями при создании лекарственных средств против широкого круга заболеваний, включая онкологические. Одним из ярких достижений молекулярной физиологии последних лет стало создание препаратов направленного действия на основе «терапевтических» моноклональных антител. Так, например, трастузумаб, созданный на основе гуманизированных моноклональных антител к рецептору ErbB2 (HER2, HER2/neu) из семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) широко используется при таких злокачественных заболеваниях, как, например, рак молочной железы. Гуманизированные моноклональные антитела, специфично связывающиеся с внеклеточной частью молекулы рецептора HER2/neu, препятствуют неконтролируемой пролиферации клеток, вызывая остановку клеточного цикла и подавляя ангиогенез. Кроме того, при связывании моноклонального антитела с клеткой-мишенью наблюдаются активация клеточного иммунитета и выраженная антителозависимая цитотоксичность.

Применение молекулярного подхода, в данном случае использование таргетных препаратов на основе моноклональных антител, способно значительно улучшить клиническую картину, а также повысить качество жизни больного и увеличить ее продолжительность. Разработка терапевтических средств направленного действия, способных избирательно взаимодействовать с мишенями внутри или на поверхности клетки, составляет одно из приоритетных направлений молекулярной медицины вследствие уникальности рецепторного портрета каждого типа клеток. Перспективность этого направления обусловлена тем, что нарушения активности различных ферментов или их регуляции лежат в основе многих метаболических расстройств и заболеваний, поскольку ферменты участвуют практически во всех биохимических реакциях и зачастую определяют течение патологических процессов.

Мембраносвязанные ферменты обладают широким спектром биологической активности, принимают участие в важнейших процессах – процессинге биологически активных молекул, деградации компонентов внеклеточного матрикса, расщеплении или активации растворимых или поверхностных белков, адгезии клеток, передаче сигналов внутрь клетки. Так, с активностью различных протеаз, особенно локализованных на мембране, связывают события, происходящие на ранних стадиях опухолевого процесса вследствие нарушения регуляции экспрессии и активности ферментов этого класса [3–6]. Нами получены веские доказательства важности такого подхода при исследовании маркеров рака предстательной железы (РПЖ).



**Рис. 4.** Некоторые маркеры рака предстательной железы и их локализация в клетке (ПСА – простатспецифический антиген, DD3 – differential display code 3, p53 – protein 53, RAR $\beta$ 2 – retinoic acid receptor beta 2, Trp-p8 – transient receptor potential-p8, AZGP – цинк- $\alpha$ -2-гликопротеин 1, RASSF1A – RAS association domain family protein 1A, ECAD – E-cadherin, Hk2 – human prostate specific glandular kallikrein, MUC1 – муцин 1, AMACR –  $\alpha$ -methylacyl-coenzyme A racemase, n – ядерные, c – цитоплазматические, s – растворимые, tm – трансмембранные).

Рак предстательной железы – одно из наиболее широко распространенных у мужчин злокачественных новообразований, которое характеризуется быстрым метастазированием [7]. Ежегодно в странах Евросоюза выявляют 200 000 новых случаев РПЖ и около 40 000 мужчин от него умирают [8]. Здесь мы вплотную приближаемся к еще одному аспекту взаимодействия молекулярной физиологии и медицины – молекулярной диагностике заболеваний.

На сегодняшний день выявлено большое число генов и их продуктов, потенциально вовлеченных в развитие РПЖ и способных в той или иной степени считаться маркерами этого заболевания [9–14]. Изменения ткани предстательной железы в процессе малигнизации затрагивают все основные клеточные функции и находят отражение на различных уровнях структур и процессов, таких, как цитоморфологические изменения, изменения в уровне экспрессии генов и их продуктов, эпигенетические изменения и другие. Основные молекулярные маркеры, свиде-

тельствующие о малигнизации ткани предстательной железы, представлены на рис. 4.

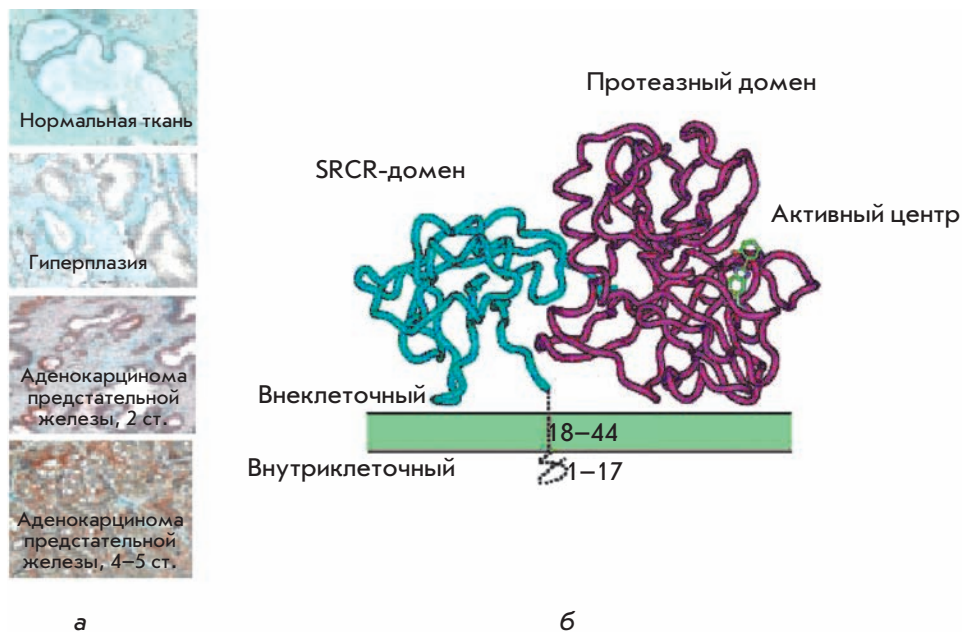
При злокачественных новообразованиях предстательной железы, включая РПЖ, одно из наиболее значимых событий – изменение генетического материала, в частности изменение профиля метилирования ДНК [15–24]. Наблюдается гиперметилирование 5'-регуляторных областей ряда генов, приводящее к их инактивации. Эти изменения генетического материала можно использовать для диагностики разных патологических состояний ткани предстательной железы.

К хорошо известным эпигенетическим аномалиям относится изменение профиля метилирования промоторной области гена *GST $\pi$ 1* в опухолевых клетках. Этот ген кодирует цитоплазматическую глутатион-S-трансферазу класса  $\pi$ 1 (*GST $\pi$ 1*), участвующую в регуляции апоптоза и утилизации ксенобиотиков. Так, в нормальных клетках предстательной железы промоторная область гена *GST $\pi$ 1* неметилирована, при пролиферативной воспалительной атрофии частота метилирования этой области *GST $\pi$ 1* составляет 6.4%, при высокоактивной интраэпителиальной неоплазии (ПИН) – 70%, а при аденокарциноме предстательной железы – 90% [25].

Изменения статуса метилирования 5'-регуляторных областей затрагивают не только ген *GST $\pi$ 1*, но и гены, продукты которых участвуют в подавлении опухолевого роста [26–32]. Метилирование CGI в промоторных областях таких генов приводит к инактивации этих генов, что связано с повышением риска возникновения злокачественных заболеваний. Ген *RAR $\beta$ 2* (retinoic acid receptor beta 2) кодирует белок, отвечающий за рецептор-опосредованную супрессию опухолевого роста (как известно, ретиноиды являются ингибиторами роста и развития опухолей). Метилирование CpG-островков в промоторной области гена *RAR $\beta$ 2* свидетельствует о малигнизации ткани предстательной железы. В здоровой ткани поджелудочной железы метилирование CpG-островков не обнаруживается [33]. Ген *RASSF1A* (RAS association domain family protein 1A) также является супрессором опухолевого роста. Метилирование CpG-островков в промоторной области этого гена отмечено при малигнизации различных типов тканей [34, 35]. Частота и степень метилирования *RASSF1A* коррелируют с агрессивностью опухоли, что позволяет прогнозировать течение заболевания [36].

Целый ряд проведенных ранее исследований свидетельствует о ключевой роли повреждений молекул ДНК в развитии опухолевого процесса. Среди этих повреждений одним из наиболее значимых считается возникновение большого числа хромосомных перестроек и мутаций в тканях опухоли. Нестабиль-

**Рис. 5. а** – Гистохимическое окрашивание срезов ткани предстательной железы моноклональными антителами к хепсину (интенсивность окраски коррелирует с уровнем экспрессии хепсина на поверхности клеток). Образцы тканей получены от больных с заболеваниями предстательной железы различной степени тяжести. **б** – Доменная структура хепсина и расположение белка относительно клеточной мембраны (зеленым показаны плазмалемма и активный центр, голубым – SRCR-домен, фиолетовым – протеазный домен).



ность генома – это общее свойство опухолевых клеток, которое проявляется на уровне как хромосом, так и отдельных генов. При этом каждый тип опухоли характеризуется определенным набором наиболее распространенных нарушений. В ткани опухоли обнаруживается большое число структурных перестроек, прежде всего транслокаций и делеций, количество которых значительно возрастает по мере прогрессии опухоли.

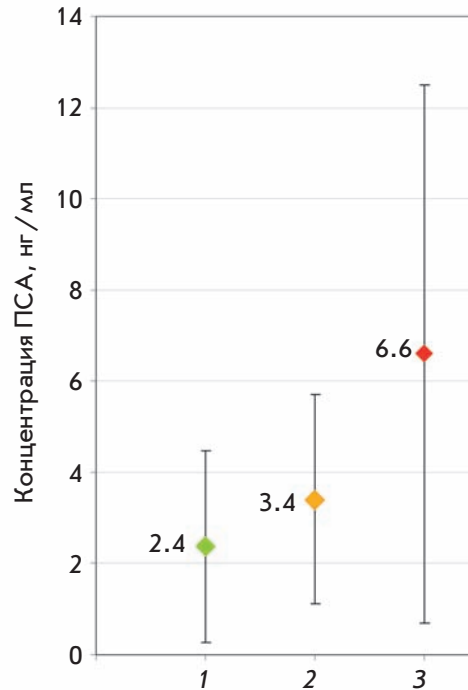
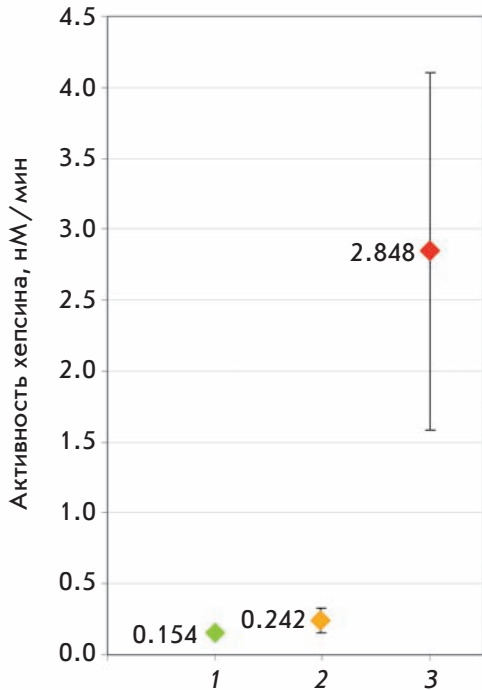
В опухолевых клетках сильно повышено содержание транскриптов, состоящих из участков 5'-нетранслируемой области андроген-регулируемого гена *TMPRSS2* и экзонов генов семейства *ETC* (*ERG4* или *ETV1*) [37]. В клетках опухолей предстательной железы происходят перестройки, затрагивающие ген *TMPRSS2* и гены факторов транскрипции *ETC* (*ERG4*, *ETV1*, *ETV4* и др.). В результате этих перестроек образуются химерные онкогены [38, 39]. Андроген-зависимые промоторные элементы обеспечивают высокий уровень экспрессии таких химерных онкогенов [38, 39].

Необходимо отметить положительную корреляцию между наличием транскрипта химерного гена *TMPRSS2-ETC* и агрессивностью заболевания. Высокой частотой встречаемости при аденокарциноме предстательной железы – (от 50 до 60%) характеризуется также мРНК этого химерного гена, в то время как при ПИН эта величина составляет 16%, а в нормальной ткани – 4%.

На ранних стадиях заболевания (при локализованном опухолевом процессе) РПЖ относительно хорошо поддается лечению, однако в силу недостатков

методов диагностики опухоли зачастую обнаруживают уже на терминальных стадиях. Применяемые методы недостаточно информативны или же травматичны. Последние научные публикации указывают на определенную потерю прогностической значимости основного используемого в настоящее время биохимического теста на РПЖ – ПСА (определение концентрации простатспецифического антигена в крови больных). В медицинской практике часты случаи ложноположительных и ложноотрицательных диагнозов, поставленных на основании определения ПСА. Предварительный диагноз подтверждают при помощи биопсии, весьма болезненной процедуры с негативными для общего состояния железы последствиями. Таким образом, основная задача диагностики состоит не в установлении самого факта заболевания, а в обнаружении его на возможно более ранней стадии и в определении стадии опухолевой прогрессии.

В настоящее время описано большое количество биохимических маркеров РПЖ, источником которых служат сыворотка крови, моча, семенная жидкость и ткани предстательной железы. Лишь немногие из этих маркеров потенциально могут применяться в клинической практике, и лишь единицы из них дошли до фазы клинических испытаний. К наиболее перспективным относятся маркеры *GSTP1*, *DD3*, *AMACR*, *EPCA* и хепсин. Как уже сказано, уровень экспрессии хепсина, ограниченный в нормальных клетках, резко возрастает при развитии опухоли. Следует отметить, что специфичность повышенной экспрессии хепсина клетками опухоли предстатель-



**Рис. 6.** Сравнительный анализ методов диагностики заболеваний предстательной железы при помощи определения концентрации ПСА в крови больного и определения активности хепсина при помощи системы «ФОТО-ХЕПСИН». Показаны средние значения показателей в экспериментальных группах и разброс значений. 1 – Группа здоровых доноров; 2 – группа больных ДГПЖ; 3 – группа больных РПЖ. Зеленый – здоровые доноры, желтый – хронический простатит и аденома предстательной железы, красный – рак предстательной железы.

ной железы привлекла внимание на самых ранних этапах изучения этого белка. Экспрессия этого фермента возрастает по мере развития опухолевого процесса, достигая максимума на его терминальных стадиях (рис. 5) [40].

Таким образом, благодаря высокой специфичности экспрессии хепсина в опухолевых клетках появляется возможность ответить на вопрос о доброкачественной или злокачественной природе новообразований в предстательной железе. По ряду параметров хепсин более предпочтителен, чем используемые сегодня в клинической практике молекулярные маркеры. Нами выдвинута гипотеза о том, что повышение протеолитической активности хепсина на поверхности клеток специфично именно для опухолей предстательной железы. Для подтверждения этой гипотезы мы получили штамм-продуцент рекомбинантного хепсина, отработали условия очистки и активации белка, нашли наиболее специфичный для него субстрат [41]. Мы доказали возможность определения протеолитической активности хепсина в образцах биоматериала, полученного от мужчин с различными патологиями предстательной железы, подобрали условия проведения такого анализа и подтвердили его специфичность в случае опухолевого процесса. Полученные данные свидетельствуют, что протеолитическая активность в группе условно здоровых доноров сходна с активностью в группе больных хроническим простатитом и ДГПЖ, однако достоверно

отличается от протеолитической активности в группе больных аденокарциномой предстательной железы (рис. 6).

Это подтверждает высокую специфичность метода – при хроническом простатите и ДГПЖ фоновый уровень протеолитической активности не изменяется и остается таким же, как у условно здоровых доноров, однако при развитии РПЖ уровень протеолитической активности резко возрастает, причем основной вклад в это повышение вносит именно хепсин, поскольку для его определения используется специфический субстрат [42].

На основе проведенных исследований в нашей лаборатории создана тест-система для диагностики РПЖ, основанная на определении активности хепсина в эпителиальных клетках предстательной железы, полученных с мочой после проведения ректального массажа (патент «Тест-система для диагностики рака предстательной железы и способ диагностики рака предстательной железы» [Евразийский патент № 011694], диагностический набор (Reg. № ФСР 2009/05065)). По таким показателям, как чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результатов, диагностическая точность разработанного метода не уступает известным биохимическим тестам на РПЖ, а также разрабатываемым методам, а по некоторым параметрам превосходит их (рис. 7).

Кроме того, новый метод имеет существенные преимущества перед распространенным на сегодняшний день методом определения концентрации ПСА.

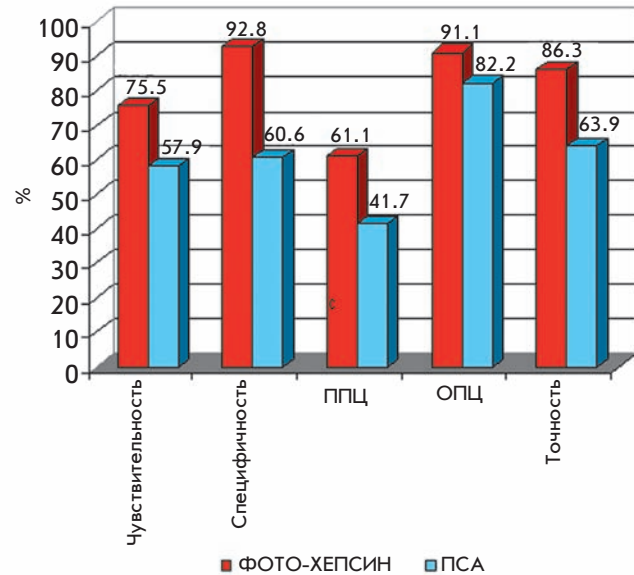
Предложенный нами метод диагностики выгодно отличается от существующих неинвазивным способом забора биоматериала, так как активность фермента определяется в моче. Сделан вывод о том, что применение разработанного нами метода совместно с уже известными поможет избежать случаев постановки ложного диагноза, что положительно отразится на общем состоянии и качестве жизни больных.

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что новый метод диагностики злокачественных новообразований предстательной железы с помощью определения активности хепсина имеет ряд преимуществ перед распространенным на сегодняшний день методом определения концентрации ПСА и может быть рекомендован для проведения скрининговых исследований на РПЖ в условиях клинических лабораторий.

Увеличение размера опухоли в результате усиленной неконтролируемой пролиферации опухолевых клеток приводит к их инвазии в окружающие ткани. Этот процесс сопровождается разрушением контактов как между опухолевыми, так и между нормальными клетками, а в результате действия различных трансмембранных протеаз он затрагивает и окружающий внеклеточный матрикс.

Одним из ферментов, регулирующих процесс локальной инвазии опухолевых клеток, и является сериновая протеаза хепсин [4]. Показано, что на поверхности клеток аденокарциномы предстательной железы значительно увеличивается уровень экспрессии хепсина [43–47]. Показано, что хепсин служит ключевым фактором активации протеолитических процессов в опухоли ткани, которые приводят к распространению опухолевых клеток. Для понимания предполагаемой роли хепсина в этих процессах рассмотрим подробнее участие мембраносвязанных протеолитических ферментов в прогрессии опухоли. В ходе развития патологии активность протеаз, локализованных на внешней стороне клеточной мембраны, приводит к неконтролируемому протеолизу компонентов внеклеточного матрикса и дезорганизации его структуры. Поскольку значительная часть работ, направленных на изучение роли хепсина в развитии онкопатологии, затрагивает опухоли предстательной железы, рассмотрим нарушение структуры базальной мембраны этого органа с позиции молекулярной физиологии и возможной роли хепсина.

Базальная мембрана предстательной железы – это специализированная внеклеточная структура, отделяющая эпителиальные и стромальные клетки друг



**Рис. 7.** Сравнительный анализ основных характеристик методов диагностики заболеваний предстательной железы – определения концентрации ПСА в крови и определения активности хепсина при помощи системы «ФОТО-ХЕПСИН». Красный – значения параметров системы «ФОТО-ХЕПСИН», синий – значения параметров метода определения концентрации ПСА, ОПЦ – отрицательная прогностическая ценность, ППЦ – положительная прогностическая ценность.

от друга и состоящая из матриксных белков, продуцируемых этими двумя типами клеток [48]. Потеря этой структуры необходима для локальной инвазии в ходе раннего метастатического процесса [49]. В настоящее время становятся ясными возможные молекулярные механизмы, вовлекающие хепсин в развитие злокачественных опухолей. Так, обнаружен ряд компонентов внеклеточного матрикса, потенциальных субстратов хепсина [4, 50].

Другой аспект вклада хепсина в развитие патологии – активация неактивных форм ферментов, также вовлеченных в процессы деградации базальной мембраны [51]. Таким образом, при участии хепсина может происходить многократное усиление протеолитических процессов на поверхности опухолевых и стромальных клеток, усугубляющее повреждение базальной мембраны и прогрессию опухоли (рис. 8).

Эту гипотезу подтверждают также данные о подавлении инвазивного роста опухолевых клеток при ингибировании протеолитической активности хепсина [52]. Эта и другие особенности хепсина делают его удобной мишенью для терапевтического воздействия. Поэтому изучение механизмов ингибиро-

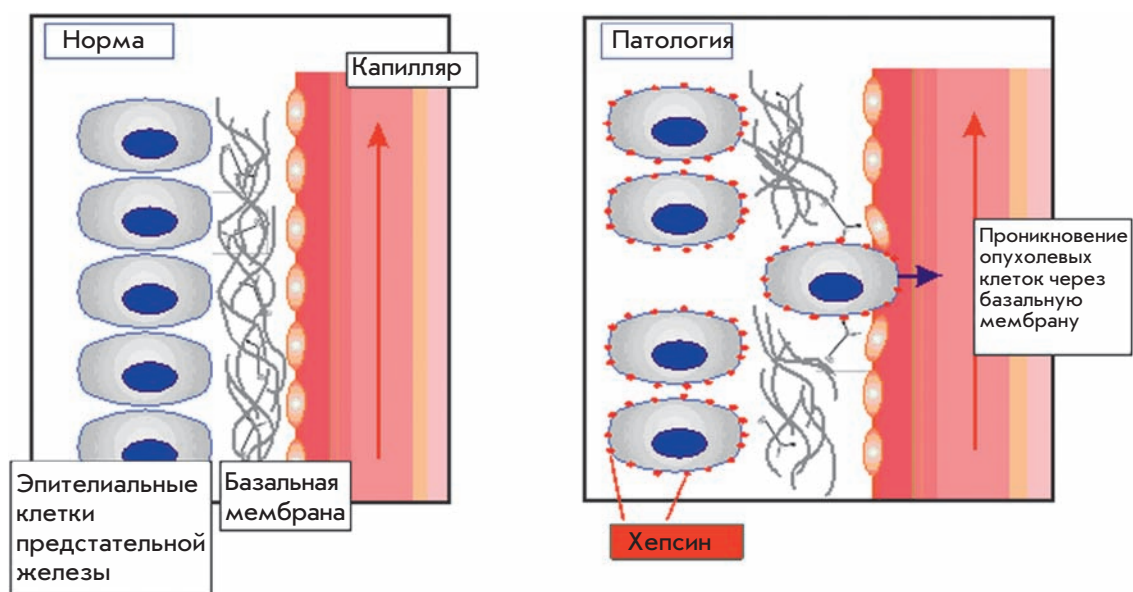


Рис. 8. Инвазия опухолевых клеток через базальную мембрану при участии хепсина.

вания представляется перспективным направлением разработки противоопухолевых препаратов, эффективных в случае опухолей, для которых характерна повышенная экспрессия хепсина. В настоящее время активно ведется поиск специфических ингибиторов хепсина с целью создания препаратов направленного действия и разработки методов терапии РПЖ [53]. Хепсин вовлечен в такие события, как увеличение подвижности клеток, расщепление матричных белков и дезорганизация внеклеточных структур, активация внеклеточных протеаз и их каскадов, лежащих в основе механизмов прогрессии опухоли. Ингибирование активности этого фермента может приводить к подавлению всех этих процессов, что будет положительно сказываться на течении заболевания.

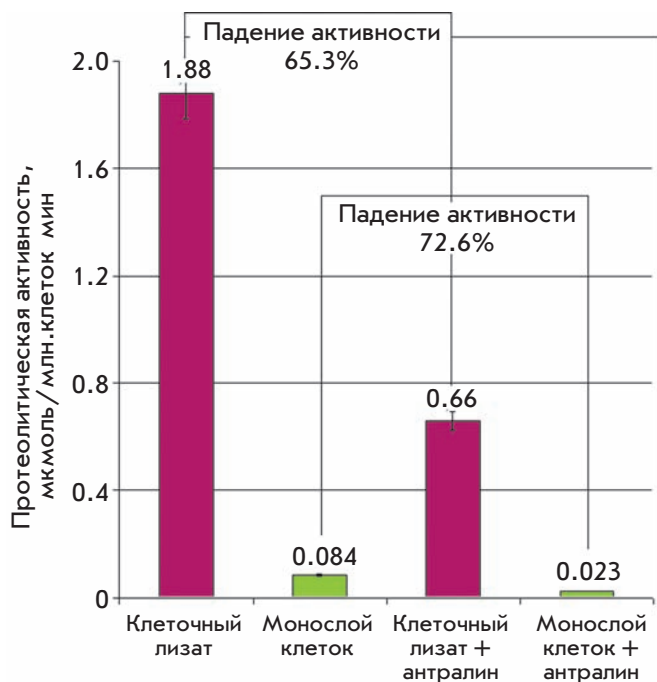
В 2008 г. в результате скрининга библиотек лекарственных препаратов и разнообразных химических соединений, проведенного с целью поиска потенциальных низкомолекулярных ингибиторов хепсина, обнаружили ряд соединений, способных специфически ингибировать его протеолитическую активность. Одним из наиболее эффективных ингибиторов хепсина оказался антралин (1,8,9-антрацентриол). Нами показано, что некоторые соединения дозозависимо подавляют активность рекомбинантного хепсина, не проявляя цитотоксического эффекта в отношении различных клеточных линий, что немаловажно для терапевтического применения. Среди всех соединений наибольшей ингибирующей способностью в отношении хепсина обладал антралин: он ингибировал хепсин в 5,5 раза эффективнее, чем трипсин, и в 85 раз эффективнее, чем тромбин [53].

Ранее в нашей лаборатории мы обнаружили, что антралин ингибирует рекомбинантный хепсин,

поэтому предположили, что подобным же образом антралин влияет и на нативную форму белка [41]. Основной вклад в протеолитическую активность на поверхности клеток аденокарциномы предстательной железы вносит хепсин, поскольку гиперэкспрессируется именно его ген, поэтому можно предположить, что воздействие специфичного ингибитора хепсина значительно снизит общую протеолитическую активность. Добавление антралина к лизированным клеткам аденокарциномы предстательной железы человека приводило к 50–70% падению общей протеолитической активности, что свидетельствует об эффективности ингибирующего действия антралина по отношению к нативному хепсину, локализованному на мембранах опухолевых клеток. На рис. 9 приведены результаты определения протеолитической активности в линии клеток LnCap аденокарциномы предстательной железы человека в отсутствие и в присутствии антралина.

Воздействие на указанные ферментативные системы способно скорректировать наблюдаемые нарушения, а мембранная локализация ряда ферментов чрезвычайно удобна для разработки лекарственных средств направленного действия и их применения. Воздействие на активность ферментов часто лежит в основе подходов, применяемых при различных заболеваниях и создании новых лекарственных средств. Учитывая широкое распространение сериновых протеаз и их участие в развитии патологических состояний, важное значение имеет поиск их ингибиторов. Уже в настоящее время ряд соединений, способных подавлять активность протеаз, применяется в терапии опухолей. Опубликованы данные о повышенной экспрессии некоторых членов семейства трансмем-





**Рис. 9.** Сравнительная протеолитическая активность живых и лизированных клеток линии LpCar в отсутствие и в присутствии антралина (фиолетовый – лизированные клетки, зеленый – монослой живых клеток).

бренных сериновых протеаз при различных онкопатологиях. Ингибирование активности ферментов данного семейства представляется перспективным направлением противоопухолевой терапии.

Трансмембранная локализация хепсина делает его хорошей мишенью для терапевтических агентов, поскольку расположение протеазного домена этого белка на поверхности клеток может облегчить их доставку. Еще одно преимущество хепсина как молекулярной мишени состоит в том, что негативные эффекты от подавления активности хепсина будут, по-видимому, минимальными, а высокая специфичность его экспрессии клетками опухолевой ткани можно использовать для эффективной и специфичной противоопухолевой терапии.

В представленной статье мы попытались обобщить основные черты молекулярной физиологии как новой междисциплинарной области фундаментальных знаний о работе сложных биологических систем. Молекулярная физиология занимает особое место в палитре современных наук о живом. Это обусловлено, во-первых, ее связью с медициной и колоссальными практическими приложениями, а во-вторых, с концептуальной революцией, происходящей в фундаментальной медицине последние 10–15 лет. Эти факторы позволяют говорить о молекулярной физиологии как о общебиологической дисциплине, находящейся на стыке таких наук, как генетика, биохимия, биоорганическая химия, молекулярная и клеточная биология, микробиология, эволюционная биология. ●

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kondratenko T.Y., Zacharova I.V., Kuzina N.V., Katukov V.Yu., Severin E.S., Kornilova Z.Ch., Perelman M.I. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993. V. 29. № 1. P. 123–130.
- Петухов С.П., Чибалин А.В., Коваленко М.В., Буларгина Т.В., Северин Е.С. // *Биохимия.* 1991. Т. 56. № 11. С. 2077–2096.
- Chang C., Werb Z. // *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. P. 37–43.
- Klezovitch O., Chevillet J., Mirosevich J., Roberts R.L., Matusik R.J., Vasioukhin V. // *Cancer Cell.* 2004. V. 6. P. 185–195.
- Andreasen P.A., Kjoller L., Christensen L., Duffy M.J. // *Int. J. Cancer.* 1997. V. 72. P. 1–22.
- Dano K., Behrendt N., Hoyer-Hansen G., Johnsen M., Lund L.R., Ploug M., Romer J. // *Thromb. Haemost.* 2005. V. 93. P. 676–681.
- Давыдов М.И., Аксель Е.М. // *Вест. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.* 2008. Т. 19. № 2. Прил. 1. 154 с.
- Васильева Е.Б., Савватеева М.В., Кузнецова Е.М., Северин С.Е., Фиев Д.Н., Аляев Ю.Г., Винаров А.З. // *Онкоурология.* 2008. № 3. С. 50–53.
- Yu Y.P., Landsittel D., Jing L., Nelson J., Ren B., Liu L., McDonald C., Thomas R., Dhir R., Finkelstein S., Michalopoulos G., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2004. V. 22. № 14. P. 2790–2799.
- Popa I., Fradet Y., Beaudry G., Hovington H., Beaudry G., Tetu B. // *Modern Pathol.* 2007. V. 20. № 11. P. 1121–1127.
- Furusato B., Gao C.L., Ravindranath L., Chen Y., Cullen J., McLeod D.G., Dobi A., Srivastava S., Retrovics G., Sesterhenn I.A. // *Modern Pathol.* 2008. V. 21. № 2. P. 67–75.
- Santinelli A., Mazzucchelli R., Barbisan F., Lopez-Beltran A., Cheng L., Scarpelli M., Montironi R. // *Am. J. Clin. Pathol.* 2007. V. 128. № 4. P. 657–666.
- Ananthanarayanan V., Deaton R.J., Yang X.J., Pins M.R., Gann P.H. // *Prostate.* 2005. V. 63. № 4. P. 341–346.
- Uetsuki H., Tsunemori H., Taoka R., Haba R., Ishikawa M., Kakehi Y. // *J. Urol.* 2005. V. 174. № 2. P. 514–518.
- Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R., Vertino P.M., Issa J.P. // *Adv. Cancer Res.* 1998. V. 72. P. 141–196.
- Bird A. // *Cell.* 1992. V. 70. P. 5–8.
- Merlo A., Herman J.G., Mao L., Lee D.J., Gabrielson E., Burger P.C., Baylin S.B., Sidransky D. // *Nat. Med.* 1995. V. 1. P. 686–692.
- Herman J.G., Umar A., Polyak K., Graff J.R., Ahuja N., Issa J.P., Markowitz S., Willson J.K., Hamilton S.R., Kinzler K.W., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 12. P. 6870–6875.
- Hoque M.O., Topaloglu O., Begum S., Henrique R., Rosenbaum E., van Criekinge W., Westra W.H., Sidransky D. // *J. Clin. Oncol.* 2005. V. 23. № 27. P. 6569–6575.
- Cooper C.S., Foster C.S. // *Br. J. Cancer.* 2009. V. 100. № 2. P. 240–245.
- Nelson W.G., Yegnasubramanian S., Agoston A.T., Bastian

- P.J., Lee B.H., Nakayama M., De Marzo A.M. // *Front. Biosci.* 2007. V. 12. P. 4254–4266.
22. Dobosy J.R., Roberts J.L., Fu V.X., Jarrard D.F. // *J. Urol.* 2007. V. 177. № 3. P. 822–831.
23. Li L.C. // *Front. Biosci.* 2007. V. 12. P. 3377–3397.
24. Esteller M. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 4. P. 286–298.
25. Nakayama M., Bennett C.J., Hicks J.L., Epstein J.I., Platz E.A., Nelson W.G., De Marzo A.M. // *Am. J. Pathol.* 2003. V. 163. № 3. P. 923–933.
26. Henrique R., Costa V.L., Cerveira N., Carvalho A.L., Hoque M.O., Ribeiro F.R., Oliveira J., Teixeira M.R., Sidransky D., Jeronimo C. // *J. Mol. Med.* 2006. V. 84. № 11. P. 911–918.
27. Henrique R., Jeronimo C., Hoque M.O., Carvalho A.L., Oliveira J., Teixeira M.R., Lopes C., Sidransky D. // *DNA Cell Biol.* 2005. V. 24. № 4. P. 264–269.
28. Henrique R., Jeronimo C., Hoque M.O., Nomoto S., Carvalho A.L., Costa V.L., Oliveira J., Teixeira M.R., Lopes C., Sidransky D. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005. V. 14. № 5. P. 1274–1278.
29. Henrique R., Jeronimo C., Teixeira M.R., Hoque M.O., Carvalho A.L., Pais I., Ribeiro F.R., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D. // *Mol. Cancer Res.* 2006. V. 4. № 1. P. 1–8.
30. Henrique R., Ribeiro F.R., Fonseca D., Hoque M.O., Carvalho A.L., Costa V.L., Pinto M., Oliveira J., Teixeira M.R., Sidransky D., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. № 20. P. 6122–6129.
31. Henrique R., Ribeiro F.R., Fonseca D., Hoque M.O., Carvalho A.L., Costa V.L., Pinto M., Oliveira J., Teixeira M.R., Sidransky D., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 10. P. 8472–8478.
32. Jeronimo C., Usadel H., Henrique R., Silva C., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D. // *Urology.* 2002. V. 60. № 6. P. 1131–1135.
33. Meyer H.A., Ahrens-Fath I., Sommer A., Haendler B. // *Biomed. Pharmacother.* 2004. V. 58. P. 10–16.
34. Aitchison A., Warren A., Neal D., Rabbitts P. // *Prostate.* 2007. V. 67. № 6. P. 638–644.
35. Krop I., Player A., Tablante A., Taylor-Parker M., Lahti-Domenici J., Fukuoka J., Batra S.K., Papadopoulos N., Richards W.G., Sugarbaker D.J., et al. // *Mol. Cancer Res.* 2004. V. 2. № 9. P. 489–494.
36. Liu L., Yoon J.H., Dammann R., Pfeifer G.P. // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 44. P. 6835–6840.
37. Tomlins S.A., Rhodes D.R., Perner S., Dhanasekaran S.M., Mehra R., Sun X.W., Varambally S., Cao X., Tchinda J., Kuefer R., et al. // *Science.* 2005. V. 310. P. 644–648.
38. Tomlins S.A., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M. // *Annu. Rev. Pathol.* 2006. V. 1. P. 243–271.
39. Perner S., Mosquera J.M., Demichelis F., Hofer M.D., Paris P.L., Simko J., Collons C., Bismar T.A., Chinnaiyan A.M., De Marzo A.M., et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* 2007. V. 31. P. 882–888.
40. Xuan J.A., Schneider D., Toy P., Newton A., Zhu Y., Finster S., Vogel D., Mintzer B., Dinter H., et al. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 3611–3619.
41. Raevskaya A.A., Kuznetsova E.M., Savvateeva M.V., Severin S.E. // *Biochemistry (Mosc).* 2010. V. 75. P. 866–872.
42. Васильева Е.Б., Савватеева М.В., Кузнецова Е.М., Северин С.Е., Северин Е.С., Фиев Д.Н., Алясов Ю.Г., Винаров А.З. // *Андрология и генитальная хирургия.* 2008. № 3. С. 46–49.
43. Dhanasekaran S.M., Barrette T.R., Ghosh D., Shah R., Varambally S., Kurachi K., Pienta K.J., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M. // *Nature.* 2001. V. 412. P. 822–826.
44. Luo J., Duggan D.J., Chen Y., Sauvageot J., Ewing C.M., Bittner M.L., Trent J.M., Isaacs W.B. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 4683–4688.
45. Magee J.A., Araki T., Patil S., Ehrig T., True L., Humphtey P.A., Catalona W.J., Watson M.A., Milbrandt J. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 5692–5696.
46. Chen Z., Fan Z., McNeal J.E., Nolley R., Caldwell M.C., Mahadevappa M., Zhang Z., Warrington J.A., Stamey T.A. // *J. Urol.* 2003. V. 169. P. 1316–1319.
47. Yamaguchi N., Okui A., Yamada T., Nakazato H., Mitsui S. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 6806–6812.
48. Nagle R.B., Hao J., Knox J.D., Dalkin B.L., Clark V., Cress A.E. // *Am. J. Pathol.* 1995. V. 146. P. 1498–1507.
49. Robinson V.L., Kauffman E.C., Sokoloff M.H., Rinker-Schaeffer C.W. // *Cancer Treat. Res.* 2004. V. 118. P. 1–21.
50. Tripathi M., Nandana S., Yamashita H., Ganasan R., Kirchofer D., Quaranta V. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 30576–30584.
51. Moran P., Li W., Fan B., Vij R., Eigenbrot C., Kirchofer D. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 30439–30446.
52. Miyata S., Fukushima T., Kohama K., Tanaka H., Takeshima H., Kataoka H. // *Hum. Cell.* 2007. V. 20. P. 100–106.
53. Chevillet J.R., Park G.J., Bedalov A., Simon J.A., Vasioukhin V.I. // *Mol. Cancer Ther.* 2008. V. 7. P. 3343–3351.