

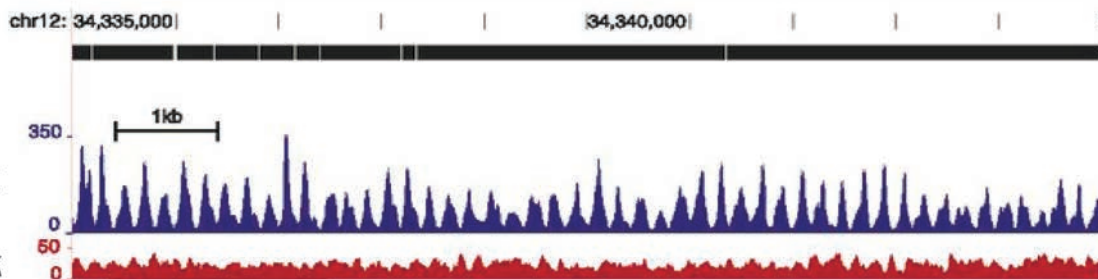
# Acta Naturae



## Эпигенетика древней ДНК



Древняя кость



Древняя ДНК

Современная ДНК

**КЛЕТочные ПОДХОДЫ  
К ЛЕЧЕНИЮ  
ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО  
ДИАБЕТА**  
СТР. 34

**ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА В СОСУДИСТОМ  
И ИММУННОМ ГОМЕОСТАЗЕ  
ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ  
И ПРЕЭКЛАМПСИИ**  
СТР. 66



# Acta Naturae

ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛ

Журнал *Acta Naturae* уделяет особое внимание междисциплинарному характеру исследований и разработок, которые находятся на стыке различных сфер биологических специальностей – молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики и биологической медицины.

*Acta Naturae* издается компанией «Парк-медиа» на русском и английском языках и входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки РФ и реферативную базу данных PubMed.

## ПОДПИСКА В РЕДАКЦИИ:

119234, Москва, Ленинские горы, 1, владение 75Г  
Телефон: +7 (495) 930-87-07, 930-88-51  
Bio-Mail: [podpiska@biof.ru](mailto:podpiska@biof.ru)  
Web site: [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru)

## ПОДПИСКА ПО КАТАЛОГАМ НА ПОЧТЕ И ЧЕРЕЗ ИНТЕРНЕТ:

РОСПЕЧАТЬ  
Индексы: 37283, 59881  
[www.pressa.rosp.ru](http://www.pressa.rosp.ru)

ИНФОРМНАУКА  
Индекс: 59881  
[www.informnauka.com](http://www.informnauka.com)

ИНТЕР-ПОЧТА  
Индекс: 17510  
[www.interpochta.ru](http://www.interpochta.ru)

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

Если Вы хотите опубликовать свою работу в журнале *Acta Naturae*, пишите на [journal@biof.ru](mailto:journal@biof.ru) и звоните по телефону: 8 (495) 930-87-07



# Письмо редакторов

**Д**орогие читатели!  
Представляем вам очередной, 30-й номер *Acta Naturae*.

Журнал уверенно развивается и по итогам 2015 года с импакт-фактором 1.77 стоит на 3-м месте среди российских научных журналов по всем дисциплинам. Это заслуга и высокопрофессиональной работы редколлегии, и редакции и, конечно же, возросший уровень публикаций. Прошли времена, когда редакция прилагала усилия по привлечению в журнал известных авторов – в настоящее время портфель полон, и мы имеем возможность гораздо более кри-

тично и строго подходить к присылаемым статьям. В ближайшее время мы планируем внедрить в работу журнала электронную редакцию, что сделает общение авторов с редакцией, рецензентами и редколлекгией более мобильным, позволит узнавать статус рассмотрения статей, знакомиться с редакторскими замечаниями, редактировать личные данные, введенные при регистрации.

Ждем от вас новых интересных работ, которые мы с удовольствием будем печатать!

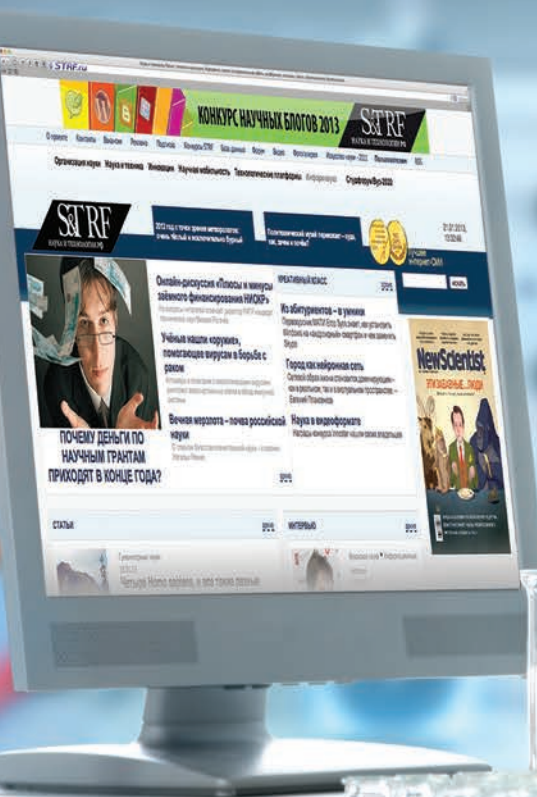
До новых встреч! ●

*Редколлегия*



# России нужна наука, науке нужна реформа, вам нужен STRF.ru

Работает при финансовой  
поддержке Министерства  
образования и науки РФ



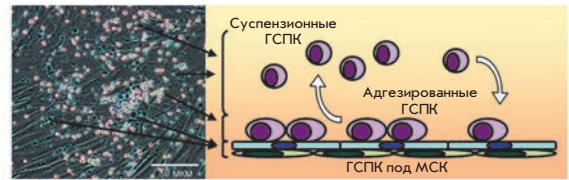
Лучшее российское интернет-СМИ  
о науке, образовании, инновациях

*"На мобильных устройствах с диагональю менее 7"  
загружается облегченная версия сайта*

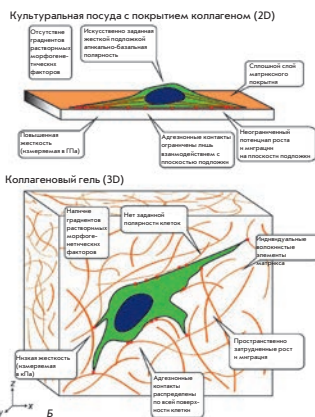
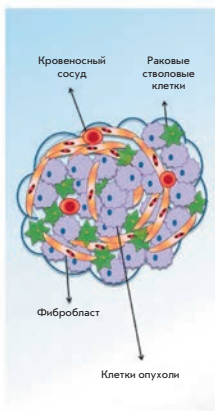
## Экспансия гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови *ex vivo*

Е. В. Сотнезова, Е. Р. Андреева, А. И. Григорьев, Л. Б. Буравкова

Трансплантация клеток пуповинной крови активно применяется в клинической практике. Однако существенным недостатком ее использования является ограниченное количество гемопоэтических стволовых клеток и длительное время восстановления пациентов после трансплантации. Обзор посвящен анализу современных методических подходов, направленных на повышение эффективности применения гемопоэтических клеток пуповинной крови.



Культивирование мононуклеарных клеток пуповинной крови на подслое мезенхимальных стромальных клеток



## Тканевая инженерия опухолей с использованием биореакторных технологий

А. Е. Гуллер, П. Н. Гребенюк, А. Б. Шехтер, А. В. Звягин, С. М. Деев

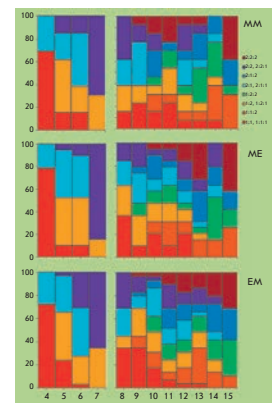
Тканевая инженерия опухолей – новый метод трехмерного (3D) моделирования злокачественных новообразований, основной задачей которого является максимально реалистичное воспроизведение и длительное поддержание свойств моделируемой опухоли *in vitro* с целью изучения биологии рака и разработки новых методов терапии и диагностики неоплазий. Обзор посвящен проблеме моделирования злокачественных опухолей с использованием биореакторных технологий.

Схема строения злокачественной опухоли человека и изменения, происходящие при 2D- и 3D-культивировании клеток *in vitro*

## Варианты и вариабельность дробления эмбрионов человека

Ю. К. Доронин, И. В. Сенечкин, Л. В. Хилькевич, М. А. Курцер

С целью выяснения природы вариабельности дробления проанализированы цейтраферные видеозаписи доимплантационного развития эмбрионов человека, аккумулярованные в рамках стандартного протокола культивирования после процедуры внутриклеточной инъекции сперматозоида. Полученные с помощью неинвазивной методологии сведения о раннем развитии эмбрионов человека дополняют и расширяют представления о событиях эмбриогенеза плацентарных млекопитающих и могут найти применение в практике репродуктивных технологий.



Распределения моментов делений blastomeres 4- и 8-клеточных эмбрионов



## Учредители:

Министерство образования и науки РФ,  
Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова,  
ООО «Парк-медиа»

## Редакционный совет:

Председатель: А.И. Григорьев  
Главные редакторы: А.Г. Габибов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,  
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,  
М.В. Угрюмов

## Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре  
Издатель: К.В. Киселев

К.В. Анохин (Москва, Россия),  
И. Беспрозванный (Даллас, Техас, США),  
И.П. Биленкина (Москва, Россия),  
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),  
Дж. Ву (Шанхай, Китай),  
В.М. Говорун (Москва, Россия),  
С.М. Деев (Москва, Россия),  
О.А. Донцова (Москва, Россия),  
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),  
М. Зуали (Париж, Франция),  
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),  
А.Л. Конов (Москва, Россия),  
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),  
П. Массон (Гренобль, Франция),  
К. Нирхауз (Берлин, Германия),  
В.О. Попов (Москва, Россия),  
И.А. Тихонович (Москва, Россия),  
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),  
А. Фрибуле (Компьень, Франция),  
В.К. Шведас (Москва, Россия),  
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева  
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева  
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин  
Верстка: К.К. Опарин  
Корректурa: Р.С. Шаймарданова  
Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы,  
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.  
Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60.  
E-mail: actanaturae@gmail.com, vera.knorre@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал  
*Acta Naturae* обязательна. Любое воспроизведение опубликованных  
материалов без письменного согласия редакции не допускается.  
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,  
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2016

Номер подписан в печать 27 сентября 2016 г.  
Тираж 300 экз. Цена свободная.  
Отпечатано в типографии «МИГ ПРИНТ»

Включен в базы данных PubMed,  
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал *Acta Naturae* входит  
в Перечень ведущих периодических  
изданий Высшей аттестационной комиссии  
Минобрнауки России.

Смотрите страницу на сайте ВАК:  
[http://vak.ed.gov.ru/ru/help\\_desk](http://vak.ed.gov.ru/ru/help_desk)

Публикация в журнале бесплатная  
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.770

## СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов ..... 1

### ОБЗОРЫ

Е. В. Сотнезова, Е. Р. Андреева, А. И. Григорьев,  
Л. Б. Буравкова

Экспансия гемопоэтических стволовых и прогени-  
торных клеток пуповинной крови *ex vivo* ..... 6

О. В. Марков, Н. Л. Миронова, В. В. Власов,  
М. А. Зенкова

Молекулярные и клеточные механизмы форми-  
рования дендритными клетками противоопухоле-  
вого иммунного ответа. .... 19

М. А. Борисов, О. С. Петракова, И. Г. Гвазава,  
Е. Н. Калистратова, А. В. Васильев

Клеточные подходы к лечению  
инсулинзависимого диабета ..... 34

А. Е. Гуллер, П. Н. Гребенюк, А. Б. Шехтер,  
А. В. Звягин, С. М. Деев

Тканевая инженерия опухолей с использованием  
биореакторных технологий. .... 49

М. М. Зиганшина, С. В. Павлович, Н. В. Бовин,  
Г. Т. Сухих

Гиалуроновая кислота в сосудистом  
и иммунном гомеостазе при физиологической  
беременности и преэклампсии. .... 66

С. В. Женило, А. С. Соколов, Е. Б. Прохорчук  
**Эпигенетика древней ДНК** ..... 80

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. П. Бонарцев, Г. А. Бонарцева, В. Л. Мышкина,  
 В. В. Воинова, Т. К. Махина, И. И. Жаркова,  
 С. Г. Яковлев, А. Л. Зернов, Э. В. Иванова,  
 Е. А. Акулина, Е. С. Кузнецова, В. А. Жуйков,  
 С. Г. Алексеева, В. В. Подгорский, И. В. Бессонов,  
 М. Н. Копицына, А. С. Морозов, Е. Ю. Милановский,  
 З. Н. Тюгай, Г. С. Быкова, М. П. Кирпичников,  
 К. В. Шайтан

**Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б** ..... 85

Ю. К. Доронин, И. В. Сенечкин, Л. В. Хилькевич,  
 М. А. Курцер

**Варианты и вариабельность дробления эмбрионов человека** ..... 97

Н. А. Золотарев, О. Г. Максименко, П. Г. Георгиев,  
 А. Н. Бончук

**ZAD-домен определяет ядерную локализацию инсуляторных белков *Drosophila melanogaster*** ..... 107

О. Г. Кулакова, М. Р. Кабилов, Л. В. Данилова,  
 Е. В. Попова, О. А. Батурина, Е. Ю. Царева,  
 Н. М. Баулина, И. С. Киселев, А. Н. Бойко,  
 А. В. Фаворов, О. О. Фаворова, В. В. Власов

**Полногеномный анализ метилирования ДНК мононуклеарных клеток крови больных различными формами рассеянного склероза** ..... 113

Ю. О. Никишина, А. Я. Сапронова, М. В. Угрюмов

**Влияние дофамина, секретируемого мозгом в общую систему циркуляции, на синтез пролактина гипофизом в онтогенезе** ..... 122

Д. К. Нилов, А. В. Куликов, Е. А. Прохорова,  
 В. К. Швядас

**Идентификация новых структурных фрагментов для дизайна ингибиторов лактатдегидрогеназы А** ..... 129

О. А. Смирнова, О. Н. Иванова, Ф. Ш. Мухтаров,  
 В. Л. Туницкая, Ю. Янсонс, М. Г. Исагулянц,  
 С. Н. Кочетков, А. В. Иванов

**Анализ доменов белков капсида и NS5A вируса гепатита С, активирующих каскад Nrf2/ARE** ... 134

А. П. Топольян, М. А. Беляева, Е. Е. Быков,  
 П. В. Кудан, Е. А. Рогожин, Д. А. Стрижевская,  
 О. М. Иванова, А. В. Устинов, И. В. Михура,  
 И. А. Прохоренко, В. А. Коршун, А. А. Формановский

**Дериватизация аминокликозидных антибиотиков трис(2,6-диметоксифенил)метилием** ..... 139

О. В. Шамова, Д. С. Орлов, М. С. Жаркова,  
 С. В. Баландин, Е. В. Ямщикова, Д. Кнаппе,  
 Р. Хоффманн, В. Н. Кокряков, Т. В. Овчинникова

**Мини-бактенецины ChBac7.5N $\alpha$  и ChBac7.5N $\beta$  – антимикробные пептиды из лейкоцитов козы *Capra hircus*** ..... 147

**Правила для авторов** ..... 158



Эпигенетика древней ДНК



**РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ**  
 (См. статью Женило и др.)

УДК 576.5

# Экспансия гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови *ex vivo*

Е. В. Сотнезова, Е. Р. Андреева, А. И. Григорьев, Л. Б. Буравкова\*

Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А

\*E-mail: buravkova@imbp.ru

Поступила в редакцию 10.02.2016

Принята к печати 30.03.2016

**РЕФЕРАТ** В настоящее время трансплантация клеток пуповинной крови активно применяется в клинической практике, однако существенным ее недостатком является ограниченное количество гемопоэтических стволовых клеток и длительное время восстановления пациентов после трансплантации. Увеличить количество гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови можно путем экспансии *ex vivo* с использованием различных комбинаций цитокинов. Кроме этого, существуют методические подходы, обеспечивающие амплификацию клеток пуповинной крови *ex vivo* при взаимодействии с естественными для гемопоэтических клеток факторами микроокружения, в том числе со стромальным компонентом и тканевым содержанием кислорода. Развитие молекулярно-генетических методов анализа привело к расширению представлений о механизмах, опосредующих функционирование гемопоэтической ниши, что позволило разработать новые технологические приемы амплификации клеток пуповинной крови. С помощью таких подходов улучшен ряд важных клинических показателей восстановления кроветворения. Хорошие результаты получены при повышении эффективности трансплантации пуповинной крови путем создания оптимальных условий для хоминга и приживления клеток в костном мозге реципиента. В настоящем обзоре рассмотрены современные методические подходы, направленные на повышение эффективности применения гемопоэтических клеток пуповинной крови.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** гемопоэтические стволовые клетки, пуповинная кровь, экспансия клеток *ex vivo*.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ГСПК – гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки; МСК – мезенхимальные стромальные клетки; КОЕ – колониеобразующие единицы; ПК – пуповинная кровь; G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL – интерлейкин; TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста; dmPGE2 – 16,16-диметилпростагландин E2; SDF-1 – фактор стромальных клеток 1; CXCR4 – СХС-рецептор хемокинов типа 4; С3а – фрагмент системы комплемента 3а.

## ВВЕДЕНИЕ

В конце прошлого века пуповинная кровь (ПК) привлекла большой интерес ученых и врачей-трансфузиологов в связи с успешным использованием в качестве альтернативы гемопоэтическим клеткам костного мозга. В настоящее время ПК применяется не только для гематологических трансплантаций. Перечень заболеваний и патологий, при которых возможно использование ПК, с каждым годом увеличивается. Следует отметить, что ПК содержит клетки крови различной степени зрелости, включая дифференцированные форменные элементы и гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки (ГСПК), а также другие типы клеток, в том числе недифференцированные соматические стволовые клетки [1–

5], мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) [6–9] и эндотелиальные прогениторные клетки [10].

Если рассматривать пуповинную кровь в качестве трансплантата кроветворной ткани, то бесспорным ее преимуществом является неинвазивный способ получения, доступность, безопасность для донора и меньшая по сравнению с костным мозгом или мобилизованной периферической кровью частота и тяжесть развития реакции «трансплантат против хозяина» [11–13]. Однако из-за небольшого содержания ГСПК ПК имеет и недостатки, связанные с медленным восстановлением кроветворения и иммунитета. ПК существенно отличается от костного мозга или мобилизованной периферической крови количе-



ством, составом и свойствами гемопоэтических клеток. ГСПК пуповинной крови, в отличие от костномозговых, находятся вне клеточного цикла, однако достаточно быстро дают сильный пролиферативный ответ на стимуляцию ростовыми факторами [14–17]. Способность ГСПК ПК к экспансии *ex vivo* в ответ на стимуляцию легла в основу разработки различных подходов к увеличению содержания кроветворных клеток в трансплантатах ПК.

Существуют две основные стратегии увеличения количества гемопоэтических клеток после выделения мононуклеарной фракции из ПК: одна из них основана на экспансии коммитированных гемопоэтических предшественников, а другая – на увеличении количества клеток с большим пролиферативным потенциалом – ГСПК [18]. В первом случае использование коммитированных клеток позволяет сократить период восстановления кроветворения после трансплантации, а во втором – пропадает необходимость введения дополнительной единицы ПК. Так, если использовать для трансплантации мононуклеарные клетки пуповинной крови после *ex vivo* наращивания коммитированных предшественников, то для долгосрочного восстановления кроветворения после аплазии костного мозга пациентам необходимо вводить дополнительную единицу ПК, не подвергшуюся каким-либо манипуляциям и содержащую ГСПК. Если в ходе *ex vivo* экспансии получены клетки, обладающие большим пролиферативным потенциалом и способные длительно поддерживать кроветворение (long-term repopulating cells), то дальнейшие манипуляции позволят получить как малодифференцированные клетки, так и коммитированные, что сможет гарантировать краткосрочное и длительное восстановление кроветворения после трансплантации. Такой подход позволит избежать введения дополнительной единицы ПК. Стоит отметить, что, помимо описанных, существуют другие стратегии повышения эффективности ПК, направленные не на экспансию, а на обеспечение действенного хоминга и приживления трансплантируемых клеток [19–25].

### ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПАНСИИ ГСПК ПУПОВИННОЙ КРОВИ *ex vivo*

При создании эффективных и контролируемых методических подходов, обеспечивающих получение большого количества ГСПК, основное внимание направлено на подбор компонентов ростовых сред и методов выделения малодифференцированных клеток. Между тем в большинстве существующих моделей культивирования ГСПК из ПК недооцененной остается роль локального микроокружения: взаимодействий со стромальными элементами, паракринной регуляции и концентрации кислорода (рис. 1).



Рис. 1. Методические подходы к экспансии клеток пуповинной крови *ex vivo*

### Использование обогащенной фракции ПК

Выбор между использованием нефракционированного образца кроветворной ткани или проведением селекции – первая задача при подборе подхода к экспансии клеток пуповинной крови. Селекция проводится с помощью моноклональных антител к специфическим маркерам с магнитными или флуоресцентными метками. Возможна положительная селекция, когда из исходно гетерогенного материала выделяют определенные типы клеток, либо отрицательная, при которой происходит удаление нежелательных клеток непосредственно из суспензии. Показано, что с использованием обогащенной гемопоэтическими клетками фракции удастся добиться лучшего результата при экспансии *in vitro* [26].

Наиболее распространенные маркеры для позитивной селекции гемопоэтических стволовых клеток – CD34 и CD133, однако при их использовании из экспансии исключаются клетки, негативные по данным антигенам, но обладающие свойствами стволовых [27]. Присутствие тех или иных поверхностных маркеров не свидетельствует о физиологических особенностях клетки, будь то способность к самообновлению, пролиферации или дифферен-

цировке. Кроме того, экспрессия фенотипа не всегда может быть устойчивой. Так, Summers и соавт. показано, что популяция CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>-клеток пуповинной крови генерирует CD34<sup>+</sup>-ГСПК при культивировании с использованием стромальных клеток костного мозга мышей [28]. В данном подходе есть и другие недостатки: требуется большое количество исходных клеток, в процессе выделения часть гемопоэтических клеток теряется [29]. Отказ от предварительной процедуры иммуносепарации позволяет избежать возможного повреждения клеток при проведении большого количества лабораторных манипуляций (центрифугирование, ресуспендирование и др.), а также изменения функционального состояния клеток, опосредованного связыванием антител с поверхностными молекулами [30].

В настоящее время опубликованы работы, в которых для экспансии ГСПК используют нефракционированную ПК [31–33]. В то же время разработаны подходы, в которых часть одной единицы пуповинной крови вводят реципиенту без какой-либо обработки, а другую часть используют для экспансии с предварительным обогащением (CD34<sup>+</sup> или CD133<sup>+</sup> селекция). Таким образом, трансплантат сохраняет свой иммунологический потенциал, что увеличивает его приживание и иммунологическое восстановление [34, 35].

### Растворимые компоненты систем культивирования

Традиционным компонентом для культивирования большинства типов клеток человека, включая ГСПК, является фетальная телячья сыворотка (ФТС), содержащая природный коктейль факторов роста, медиаторов адгезии, минеральных веществ, липидов и гормонов. Однозначного мнения о возможности клинического применения клеток после их экспансии с использованием ФТС не существует. К недостаткам сыворотки можно отнести трудность стандартизации состава, возможность вирусной контаминации, а также высокий риск иммунизации реципиента чужеродными белками [36, 37]. В этой связи некоторые исследователи отказываются от ФТС в пользу цитокиновых коктейлей [26, 38]. Тем не менее следует учитывать, что в сыворотке присутствуют минорные компоненты, действие которых до сих пор не идентифицировано и не может быть полностью скомпенсировано бессывороточными средами.

В настоящее время известно большое количество растворимых факторов, влияющих на пролиферацию и дифференцировку ГСПК. Различные их комбинации могут определять сроки и степень экспансии культивируемых клеток. Клетки ПК так же, как клетки периферической крови, синтезируют цитокины. В частности, Т-клетки, ЕК-клетки и ма-

крофаги ПК продуцируют гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкины 2, 3 и 4 (IL-2, -3, -4), трансформирующий фактор роста (TGF-β), интерферон-γ [39–41]. Однако количество синтезируемого медиатора, его биологическая активность и количество продуцирующих клеток в ПК значительно меньше, чем в периферической крови.

Несмотря на обилие рекомбинантных цитокинов, применяемых для экспансии малодифференцированных гемопоэтических предшественников, оптимальной комбинации, утвержденной для использования в клинической практике, пока не существует. Наиболее часто используются фактор стволовых клеток (SCF), IL-3 и -6, G-CSF, тромбопоэтин (TPO) и лиганд Flt-3 [42, 43].

Следует отметить, что важен не только выбор факторов, но также их концентрация и последовательность применения. Так, использование (в течение первых 3 дней) цитокинов SCF, IL-3, Flt-3, TPO и среды, содержащей 4% фетальной телячьей сыворотки для культивирования ГСПК, с последующим переводом клеток на среду, содержащую 20% фетальной телячьей сыворотки и макрофагальный колониестимулирующий фактор, Flt-3, IL-3, SCF, способствует экспансии CD34<sup>+</sup> клеток [43]. Факторы роста SCF, Flt-3, IL-11, IL-3, IL-6, GM-CSF отвечают за пролиферацию клеток, в то время как макрофагальный колониестимулирующий фактор, G-CSF, эритропоэтин (EPO) и TPO отвечают за дифференцировку и созревание клеток. Цитокины SCF, IL-3 и IL-6 действуют в фазе G0/G1 клеточного цикла и, работая вместе, индуцируют митоз [44].

Тем не менее для экспансии гемопоэтических клеток применяют и другие комбинации цитокинов. Naylock и соавт. показали, что при использовании сочетания IL-1β, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF и SCF степень экспансии выше, чем при использовании комбинаций, в которых не хватает какого-либо из этих шести цитокинов [45].

Стоит отметить, что существуют факторы, присутствие которых в среде культивирования уменьшает степень экспансии гемопоэтических клеток. Показано, что IL-8, тромбоцитарный фактор-4, индуцируемый IFN-γ белок и моноцитарный хемотаксический фактор-1 *in vitro* снижают пролиферацию колониеобразующих единиц гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов (КОЕ-ГЭММ), гранулоцитов и моноцитов (КОЕ-ГМ) и бурстобразующих единиц эритроцитов (БОЕ-Э), стимулированных ростовыми факторами [46, 47], а макрофагальный белок воспаления α подавляет пролиферацию

стволовых клеток мышей, соответствующих КОЕ-С 12 (колониеобразующие единицы селезенки, дающие начало гранулоцитарным, моноцитарным, эритроидным, мегакариоцитарным и лимфоидным колониям на 12-е сутки после трансплантации облученным животным), и более ранних клеток КОЕ-Бл (клетки, образующие в культуре колонии бластных клеток) у мышей в системе *ex vivo* [48].

При культивировании с использованием только растворимых факторов гемопоэтические клетки лишаются поддерживающего влияния микроокружения: межклеточных взаимодействий с негемопоэтическими клетками, компонентов тканевого матрикса и паракринных медиаторов. С другой стороны, добавление в среду экзогенных цитокинов при использовании фидерных клеток, продуцирующих SCF и IL-6, а также многие другие паракринные факторы, способствует поддержанию гемопоэтических предшественников, но не является строго обязательным.

### **МОДЕЛИРОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ДЛЯ ЭКСПАНСИИ ГСПК *ex vivo***

Справедливости ради стоит сказать, что первые этапы изучения гемопоэтических стволовых клеток взрослого организма были связаны с созданием естественного микроокружения [49, 50]. Так, начальные попытки культивирования суспензионных гемопоэтических культур показывали быстрое угасание гемопоэза и замещение гемопоэтических клеток макрофагами. Использование системы культивирования, содержащей подложку из клеток костного мозга, позволило получить культуру, содержащую кроветворные предшественники, обладающие свойствами гемопоэтических стволовых клеток интактного костного мозга [49]. Дальнейшие исследования были направлены на создание различных модификаций и усовершенствований данной системы культивирования.

### **Сокультивирование со стромальными клетками**

Сокультивирование со стромальными фидерными клетками представляет собой более физиологичную альтернативу использованию рекомбинантных цитокинов, которое применялось с самого начала изучения костномозговых гемопоэтических клеток [49]. В настоящее время активно проводится поиск новых линий клеток, поддерживающих экспансию *in vitro* ГСПК при сокультивировании [51]. Совместное культивирование гемопоэтических предшественников с различными типами клеток, проявляющих фидерные свойства по отношению к ним, не только применимо для экспансии малодифференцированных предшественников в целях их клинического ис-

пользования, но также позволяет исследовать взаимоотношения клеток в пределах кроветворной ниши.

Традиционным и наиболее практичным подходом является использование мезенхимальных стромальных клеток в качестве фидерного подслоя для экспансии ГСПК *in vitro* [52–59]. Помимо того, что МСК проявляют фидерные свойства по отношению к гемопоэтическим клеткам, они обладают высокой пролиферативной активностью, а также более доступны, чем иные типы фидерных клеток человека (например, дуктальные эпителиоциты или спленоциты) [60]. Показано, что стромальные клетки костного мозга в Dexter-культурах могут поддерживать кроветворение *in vitro* более 6 месяцев [49]. Некоторые исследователи используют МСК после направленной дифференцировки в остеобласты, создавая таким образом подобие эндостальной ниши [61].

МСК и более дифференцированные стромальные клетки секретируют различные цитокины [62–64]. Практически все данные о продукции цитокинов МСК человека получены на культуре клеток, поэтому о том, как каждый цитокин вовлечен в паракринную регуляцию *in vivo*, с уверенностью сказать нельзя. Тем не менее показано, что МСК продуцируют большое количество цитокинов, поддерживающих ГСПК в состоянии покоя или способствующих их самообновлению, в частности SCF, фактор, ингибирующий лейкозные клетки, фактор стромальных клеток 1 (SDF-1), онкостатин М, морфогенетический белок кости-4, лиганд Flt-3, TGF- $\beta$ , IL-1, -6, -7, -8, -11, -12, -14, -15 [62, 63]. Кроме того, при добавлении в среду культивирования IL-1 $\alpha$  МСК могут продуцировать такие факторы роста, как GM-CSF и G-CSF, влияющие на более зрелые гемопоэтические предшественники, что свидетельствует о взаимной регуляции МСК и гемопоэтических клеток [65–67].

Исследователи, моделируя *in vitro* условия костномозговой ниши, используют МСК из различных источников [52, 54, 68]. Наиболее часто используемыми и поэтому хорошо охарактеризованными являются МСК из костного мозга. МСК получены также из стенки сосудов, синовиальной мембраны, плаценты, пуповинной крови, субэндотелиального слоя пупочной вены. Между МСК из различных источников существуют некоторые отличия, касающиеся экспрессии ряда маркеров, способности к пролиферации и дифференцировке, но в целом их характеристики сходны [69–72]. Известно, что МСК из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека способны поддерживать гемопоэз *in vitro* [53, 73]. Поэтому они представляют хорошую альтернативу МСК из костного мозга и легкодоступный источник фидерных клеток для экспансии ГСПК ПК с целью широкомасштабного клинического использования [74].



McNiese и соавт. разработали протокол культивирования ГСПК, согласно которому 14-дневная экспансия клеток ПК обеспечивается совместным их культивированием с МСК из костного мозга в присутствии гемопоэтических цитокинов в течение 7 дней, а также культивированием в течение 7 дней в присутствии только цитокинов [52]. С помощью данной методики удалось существенно сократить время восстановления нейтрофилов и тромбоцитов после трансплантации двух единиц ПК, одна из которых была обогащена ГСПК с использованием описанного протокола. Таким образом, применение фидерных слоев для экспансии ГСПК ПК позволяет ограничить использование экзогенных факторов роста без снижения эффективности амплификации клеток.

### Тканевое содержание кислорода

Содержание кислорода – один из основных неклочечных факторов кроветворного микроокружения, участвующих в регуляции развития гемопоэтических клеток. В костном мозге содержание кислорода варьирует от 1 до 6%, при этом в области гипоксии находятся покоящиеся ГСПК, тогда как в местах с более высоким содержанием кислорода – пролиферирующие ГСПК [75]. Низкое парциальное давление кислорода играет важную роль в поддержании тех или иных физиологических свойств гемопоэтических клеток, что существенно при изучении взаимодействия гемопоэтических и стромальных клеток *in vitro*, а также должно обязательно учитываться при разработке протоколов амплификации клеток ПК [76, 77].

Известно, что пониженное содержание кислорода оказывает значительное влияние на гемопоэтические клетки *in vitro*, их способность к колониеобразованию, устойчивость к облучению и потенциал к восстановлению гемопоэза у летально облученных животных [75, 78]. Кроме того, низкое парциальное давление кислорода способствует преимущественному поддержанию жизнеспособности и пролиферации малодифференцированных гемопоэтических клеток по сравнению с коммитированными предшественниками [78, 79].

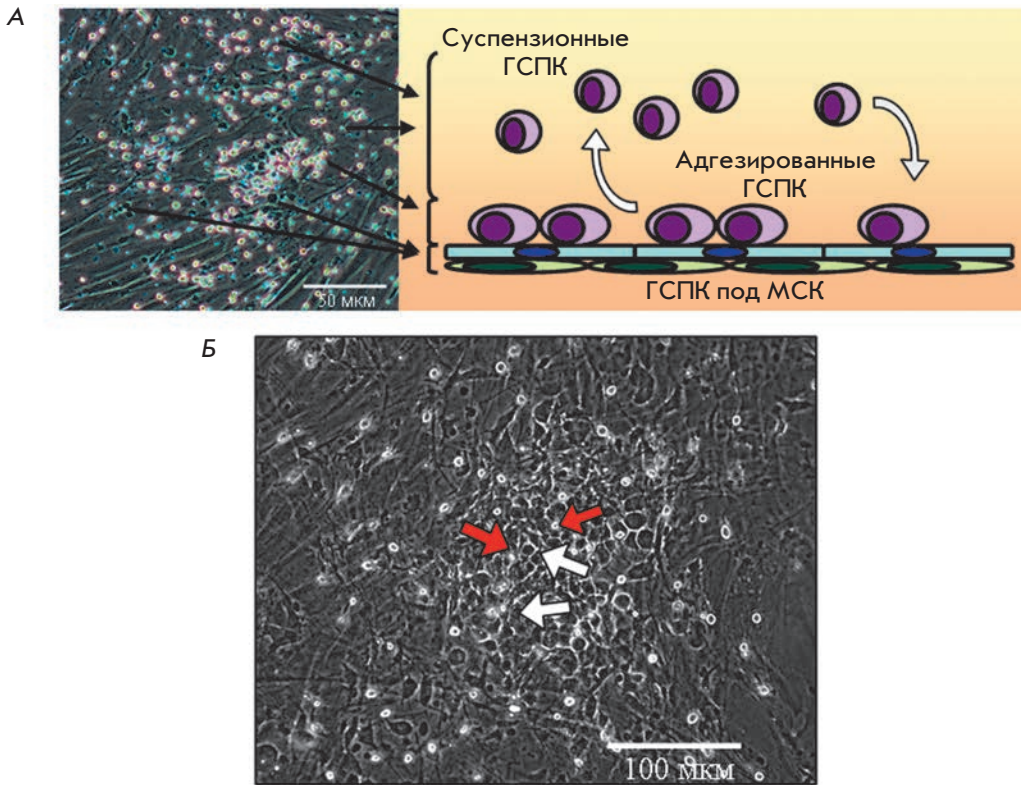
Интересно, что варьирование содержания кислорода в сочетании с различными комбинациями цитокинов позволяет амплифицировать клетки ПК с различными свойствами. Так, группой исследователей под руководством Ivanovic было показано, что при 3% кислорода в присутствии SCF, G-CSF, TPO и IL-3 обеспечивается одновременно поддержание примитивных гемопоэтических клеток, способных восстанавливать кроветворение у облученных животных при трансплантации, и экспансию коммитированных предшественников (КОЕ) [80]. Показано

также, что культивирование обогащенной CD133<sup>+</sup> клетками фракции ПК с добавлением рекомбинантных цитокинов SCF, Flt-3, TPO, IL-6, IL-3 в присутствии 5% кислорода позволяет увеличить количество CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клеток почти в 27 раз (независимо от присутствия сыворотки в среде), что значительно ( $P < 0.01$ ) выше, чем при стандартном содержании кислорода [81]. Среди клеток, амплифицированных в условиях пониженного содержания кислорода, было больше КОЕ с миелоидным потенциалом, а также выше способность к восстановлению гемопоэза при трансплантации облученным животным. Показано, что пониженное содержание кислорода индуцирует в гемопоэтических клетках экспрессию генов *HIF-1α*, *VEGF* и *ABCG2*, а также активирует экспрессию CXС рецептора хемокинов 4 (CXCR4) [82].

В работе Tursky и соавт. культивирование клеток ПК при 10% кислорода с добавлением цитокинов (TPO, SCF, Flt-3 лиганда и IL-6) приводило к большей экспансии ГСПК, чем при использовании наиболее распространенного протокола культивирования клеток ПК (20% кислорода, TPO, SCF и G-CSF) [42].

С зависимостью от содержания кислорода связана одна важная особенность гемопоэтических клеток – занимать определенные «ниши» при совместном культивировании со стромальными клетками. Еще в 1977 году в работах Dexter и соавт. было описано распределение гемопоэтических клеток в таких сокультурах: часть гемопоэтических предшественников находится в суспензии над подслоем, часть адгезирует к поверхности подслоя, а некоторые клетки мигрируют в субстромальное пространство (рис. 2А) [49]. При длительном сокультивировании образуются участки активной пролиферации гемопоэтических клеток (так называемых областей «булыжной мостовой»), которые обнаруживаются с помощью фазово-контрастной микроскопии и визуально представляют плотные скопления клеток, располагающиеся под слоем МСК (рис. 2Б) [82].

Пространственная организация гемопоэтических клеток в совместной культуре сопоставима с их распределением в костном мозге: клетки в зависимости от состояния покоя/активной пролиферации располагаются в областях с различным содержанием кислорода и доступностью питательных веществ. Так, фракция клеток, адгезирующих на поверхность МСК, содержала наибольшую долю активно пролиферирующих клеток. По сравнению с другими фракциями гемопоэтических предшественников в сокультуре клетки, мигрировавшие под стромальный монослой, делятся редко и сохраняют незрелый фенотип CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> [83]. Учитывая особенность гемопоэтических клеток занимать определенное по-



**Рис. 2.** Культивирование мононуклеарных клеток пуповинной крови на подслое МСК. А – характерный вид сокультуры и графическое представление распределения в ней гемопоэтических клеток. Б – области «бульжистой мостовой». Белыми стрелками отмечены ГСПК, адгезированные к поверхности МСК, красными стрелками – ГСПК, лежащие под МСК

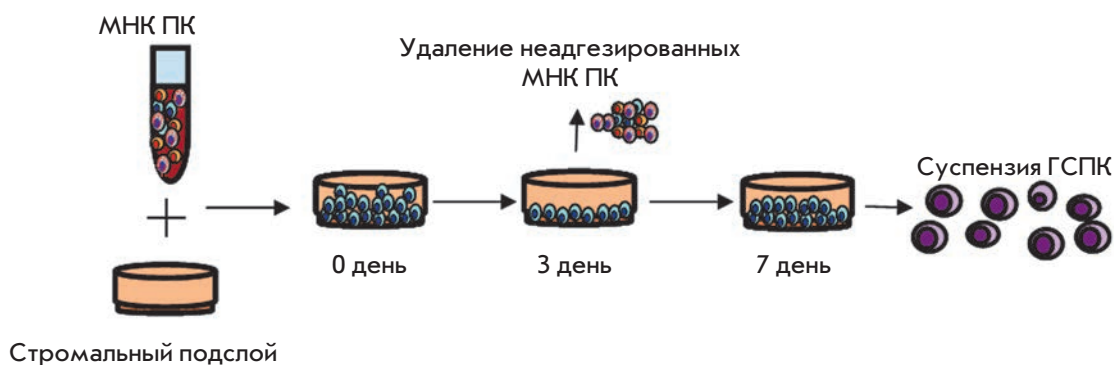
ложение в сокультуре в зависимости от пролиферативного потенциала, можно фракционировать клетки по их способности к адгезии и выделять популяции клеток с определенными свойствами (рис. 3) [73].

Согласно Jing и соавт., при культивировании в условиях атмосферного содержания кислорода наиболее «гипоксические» гемопоэтические клетки располагались под монослоем стромальных клеток [83]. При пониженном содержании кислорода уменьшалась адгезия гемопоэтических клеток к стромальным клеткам, однако такие условия способствовали миграции клеток под монослой. В условиях гипоксии усиливалась продукция фактора роста эндотелия сосудов А, который, по-видимому, опосредовал увеличение проницаемости монослоя МСК. Стоит отметить, что пониженное содержание кислорода влияет как на гемопоэтические и стромальные клетки, так и на их взаимодействие [83].

Воссоздавая микроокружение костного мозга *ex vivo*, используют кислород, содержание которого соответствует тканевому, а в качестве клеточного компонента микроокружения – различные фидерные слои, в частности МСК [76, 77]. Однако стоит учитывать, что пониженное содержание кислорода в среде культивирования влияет не только на гемопоэтические клетки, но и на МСК. Определение дифференцировочного потенциала этих клеток *in*

*vitro* в условиях гипоксии выявило снижение остеогенного и адипогенного потенциала [84, 85]. Кроме того, пониженное содержание кислорода при культивировании усиливает дифференцировку в хондрогенном направлении, а также увеличивает пролиферативную активность и число колониеобразующих единиц фибробластов [84, 86, 87]. Эти данные подчеркивают роль кислорода как важного фактора, определяющего судьбу клеток, относящихся к стромальному и гемопоэтическому гистогенетическому ряду. Используя МСК в качестве фидерного подслоя для культивирования гемопоэтических клеток, важно учитывать влияние содержания кислорода на продукцию биологически активных медиаторов МСК. Установлено, что в присутствии 4–5% кислорода возрастает продукция МСК таких медиаторов, как IL-1 $\beta$ , IL-10, фактор роста гепатоцитов, фактор роста эндотелия сосудов, основной фактор роста фибробластов, TGF- $\beta$ , GM-CSF, однако снижается образование фактора некроза опухолей  $\alpha$  [64, 88].

Koller и соавт. для экспансии гемопоэтических клеток пуповинной крови *in vitro* использовали методический подход, учитывающий влияние совокупности факторов кровяного микроокружения [89]. Клетки ПК культивировали с добавлением или отсутствием рекомбинантных цитокинов и подслоя



**Рис. 3.** Схема культивирования мононуклеарных клеток пуповинной крови (МНК ПК) на стромальном подслое, в котором адгезирующая к МСК фракция МНК ПК способна генерировать популяцию клеток, обогащенную гемопоэтическими предшественниками [73]

МСК, при 5 или 20% кислорода. Установлено, что использование IL-3/IL-6 обеспечивает более эффективную экспансию гемопоэтических предшественников, поддерживаемую в культуре более 8 недель, чем IL-1/IL-3. Этот эффект усиливался при культивировании в условиях пониженного содержания кислорода. Присутствие слоя облученных стромальных клеток не оказывало значительного эффекта на экспансию гемопоэтических клеток при добавлении цитокинов, особенно при низком содержании кислорода.

В зависимости от содержания кислорода в среде культивирования эффект, оказываемый на гемопоэтические клетки, может быть различным. Совместное культивирование мононуклеаров пуповинной крови и МСК из костного мозга в условиях 2% O<sub>2</sub> способствует значительно более низкой продукции CD34<sup>+</sup> клеток (25-кратное увеличение против 60-, 64- и 92-кратного на 10 день при 5, 21, 10% O<sub>2</sub> соответственно). Определение динамики роста выявило более высокий пролиферативный статус клеток ПК, культивируемых при 5, 10, 21% кислорода, чем при 2% O<sub>2</sub> [90].

Таким образом, для создания эффективных и контролируемых методических подходов, обеспечивающих получение большого количества гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток для трансплантации, необходимо учитывать особенности микроокружения кроветворной ниши, в том числе содержание кислорода.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПАНСИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ *ex vivo*

Наиболее распространенные подходы к экспансии клеток ПК основаны на данных, полученных в ходе

изучения влияния клеточных и неклеточных факторов кроветворного микроокружения на ГСПК, включая тканевое содержание кислорода, взаимодействие со стромальными клетками и паракринные медиаторы. Однако, благодаря развитию молекулярно-генетических методов, представления о механизмах, опосредующих работу гемопоэтической ниши, значительно расширились, что позволило создать новые технологические подходы к амплификации ГСПК ПК.

### Экспансия, опосредованная Notch

Известно, что семейство рецепторов и лигандов Notch участвует в многочисленных процессах [91–93]. Рецептор Notch 1 обнаружен на CD34<sup>+</sup> гемопоэтических предшественниках [94]. Кроме того, активация сигнализации Notch способствует сохранению фенотипа самых примитивных гемопоэтических стволовых клеток *in vitro*. Это привело к созданию бессывороточной системы культивирования CD34<sup>+</sup> гемопоэтических клеток, состоящей из иммобилизованного Delta1 Notch-лиганда и ранних цитокинов гемопоэтических стволовых клеток (SCF, TPO, Flt-3 лиганд, IL-3 и IL-6) [95]. Неоднозначные результаты получены при трансплантации двух единиц ПК, одна из которых была обогащена ГСПК с применением Notch-системы, проведенной в ходе клинических испытаний. Использование Notch-трансплантата позволяло сократить время восстановления нейтрофилов, однако по истечении 3 месяцев кроветворение у реципиентов обеспечивалось другим трансплантатом ПК. Наблюдаемый эффект можно объяснить двумя обстоятельствами: потерей за время культивирования клеток, обеспечивающих долгосрочное восстановление гемопоэза (long-term repopulating cells); иммунным ответом Т-клеток неманипулированного трансплантата ПК [34, 35].



### Экспансия в присутствии StemEx (хелатора меди)

У пациентов с дефицитом меди значительно снижен гранулоцитопоз и эритропоз, при этом в биоптатах костного мозга у них выявлено снижение числа зрелых гранулоцитов и увеличение числа промиелоцитов и миелоцитов по сравнению с людьми без этого дефицита [96, 97]. Данное наблюдение позволило предположить, что дефицит меди влияет на дифференцировку миелоидных предшественников. Позднее был разработан компонент культуральной системы StemEx, действие которого основано на влиянии низких концентраций меди на дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток в системе *in vitro*. В StemEx медный хелатор тетраэтиленпентамин сочетается с ранними и поздними гемопоэтическими цитокинами [98, 99]. Применение технологии StemEx предполагает проведение экспансии в присутствии StemEx части клеток из одной единицы ПК в течение 21 дня. Другую часть ПК вводят в исходном виде совместно с клетками, амплифицированными в присутствии StemEx [100]. Использование такого подхода приводит к улучшению ряда важных клинических показателей по сравнению с применением ПК в исходном виде, что свидетельствует об эффективности данной системы культивирования для амплификации ГСПК ПК *ex vivo* [101].

### Экспансия NiCord

Технология NiCord основана на действии эпигенетического фактора – никотинамида, который позволяет замедлить дифференцировку и увеличить функциональность гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток, полученных в ходе *ex vivo* экспансии. Добавление никотинамида вместе с гемопоэтическими цитокинами в культуру способствует увеличению доли CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> примитивных клеток и усиливает миграцию в направлении к SDF-1 *in vitro*. Кроме того, показана высокая эффективность приживления амплифицированных клеток в моделях *in vivo* [102]. NiCord не только позволяет увеличить количество ГСПК в сравнении с представленными выше технологиями, но и обеспечивает эффективное приживание клеток. Уникальной особенностью NiCord-трансплантата является то, что вместе с фракцией ГСПК, полученной после 21-дневной экспансии, он содержит фракцию некультивированных Т-клеток, которую собирают и повторно замораживают после разморозки. Таким образом, NiCord-трансплантат сохраняет иммунологический потенциал, что улучшает приживание трансплантата и иммунологическое восстановление. Результаты клинического применения ГСПК, амплифицированных в соответствии с протоколом NiCord и трансплантированных вместе с дополнительной единицей ПК, свидетельствуют

о более раннем восстановлении нейтрофилов (медиана 11 дней против 25 дней,  $P = 0.001$ ) и тромбоцитов (30 дней против 41,  $P = 0.012$ ) по сравнению с контролем [103]. Это исследование подтверждает присутствие долгосрочных (long-term repopulating cells) и краткосрочных репопулирующих клеток в трансплантате пуповинной крови после NiCord-экспансии.

### Экспансия в присутствии Stem-Regenin 1

Stem-Regenin 1 – пуриновое производное, способствующее экспансии *ex vivo* ГСПК [104]. В технологии Stem-Regenin 1 для инициирования клеточной культуры используется фракционированная популяция CD34<sup>+</sup> клеток ПК. Показано, что во время 3-недельного культивирования в среде без сыворотки, содержащей Stem-Regenin 1 и дополнительно TPO, SCF, лиганд Flt-3 и IL-6, происходит 1118-кратная экспансия CD34<sup>+</sup> клеток относительно исходной популяции. Удаление из системы культивирования Stem-Regenin 1 приводит к быстрой дифференцировке, что указывает на важную роль этого компонента в поддержании малодифференцированного состояния гемопоэтических предшественников ПК. Клетки, полученные с применением Stem-Regenin 1, способны к высокоэффективному приживлению после трансплантации мышам с иммунодефицитом, что свидетельствует о присутствии среди них гемопоэтических предшественников, обеспечивающих раннее и устойчивое восстановление гемопоэза. Эта технология хорошо проявила себя в клинических испытаниях и в настоящее время продолжает активно изучаться [105].

### СТРАТЕГИИ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА ПОВЫШЕНИЕ ХОМИНГА ГСПК

Разработаны также методические подходы, направленные на увеличение хоминга и приживание потенциальных стволовых клеток ПК без экспансии. Они представляют недорогую и безопасную альтернативу экспансии ГСПК *ex vivo*.

### Сокультивирование с простагландином E2

Изучение гемопоэза рыб *Danio rerio* выявило участие dmPGE2 (16,16-диметилпростагландин E2) в гомеостазе гемопоэтических стволовых клеток [22]. Это позволило предположить, что короткая экспозиция *ex vivo* клеток ПК с dmPGE2 позволит увеличить «эффективную дозу» гемопоэтических стволовых клеток без значительной токсичности для пациента. Показано, что краткосрочная инкубация ГСПК с dmPGE2 способствует увеличению их количества после трансплантации и обеспечивает преимущество этих клеток при серийной трансплантации с полным мультилинейным восстановлением костного мозга

у мышей [106]. Обнадеживающие результаты получены при клиническом использовании dmPGE2, и методика применения dmPGE2 в настоящий момент продолжает активно разрабатываться [24].

### Фукозилирование

Данный подход направлен на увеличение хоминга стволовых клеток ПК к строме костного мозга. Методика основана на том, что гемопоэтические стволовые клетки ПК не мигрируют в костный мозг столь же активно, как клетки взрослого костного мозга или мобилизованные клетки периферической крови. Снижение эффективности хоминга в костном мозге может частично возникать из-за отсутствия связи с молекулами адгезии (Р- и Е-селектинами), которые экспрессируются на эндотелиальных клетках в сосудах костного мозга [19]. Фукозилирование лигандов селектина, экспрессирующихся на стволовых клетках ПК, увеличивает сродство к Р- и Е-селектинам гемопоэтического микроциркуляторного русла и критично для обеспечения «роллинга» ГСПК [107]. Достаточно простая процедура фукозилирования представляет собой инкубацию клеток ПК с фукозилтрансферазой IV и ее субстратом GDP-фукозой в течение 30 мин при комнатной температуре. На моделях *in vivo* показано повышение эффективности приживления стволовых клеток ПК с использованием предтрансплантационного *ex vivo* фукозилирования у мышей с иммунодефицитом [25, 108].

### Взаимодействие CXCR4–SDF-1

SDF-1 и его рецептор CXCR4 также обеспечивают хоминг ГСПК и удерживание их в костном мозге. CXCR4 экспрессируется на ряде клеток, включая МСК, эндотелиальные клетки и различные субпопуляции гемопоэтических клеток, в том числе ГСПК. SDF-1 является мощным хемоаттрактантом для CD34<sup>+</sup> ГСПК, которые после трансплантации мигрируют в костный мозг по градиенту SDF-1 [109–113]. Оптимальная экспрессия CXCR4 в ГСПК и эффективный уровень SDF-1 в костном мозге реципиента обеспечивают приживление трансплантата. Негативным регулятором данного взаимодействия является дипептидилпептидаза-4 (DPP4), способная удалить N-концевой дипептид из SDF-1, снижая, тем самым, его активность и способность к взаимодействию с рецептором. Ингибирование этого фермента привело к 2–3-кратному увеличению хоминга CD34<sup>+</sup> и Lin<sup>-</sup>клеток человека при трансплантации мышам NOD/SCID/B2m<sup>null</sup> [114]. Кроме того, известно, что дипептидилпептидаза-4 регулирует работу гемопоэтических факторов роста. Таким образом, ингибирование этого фермента благоприятно сказывается не только на хоминге, но и на росте клеток,

опосредованном действием ростовых факторов [115]. Использование препаратов, ингибирующих дипептидилпептидазу-4, дало обнадеживающие результаты по приживлению ПК трансплантатов [116]. Дальнейшие исследования направлены на определение оптимальной дозировки и сроков использования этих препаратов.

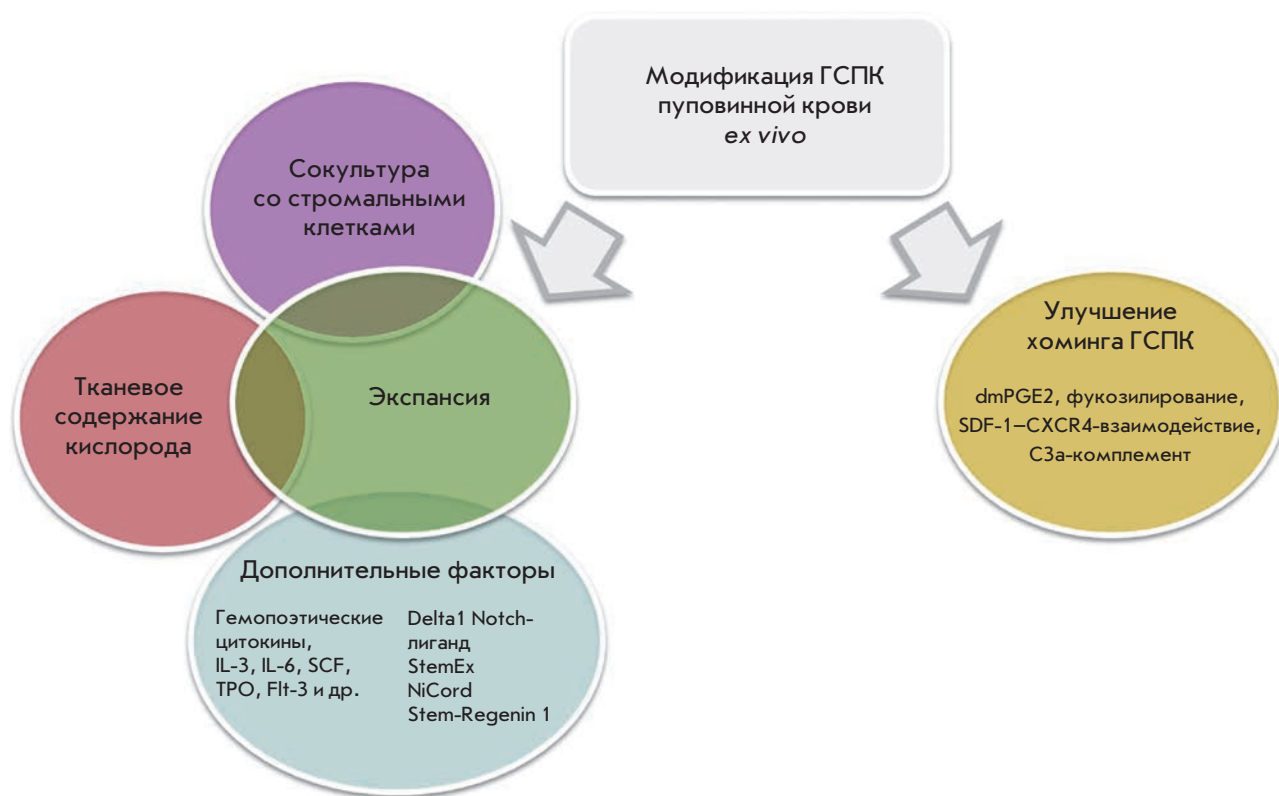
### Компонент С3а-комплемента

Компонент системы комплемента 3а (С3а) – продукт протеолитического расщепления белка комплемента С3. Наряду с многочисленными иммунорегуляторными свойствами, С3а сенсibiliзирует гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки человека к хомингу в направлении к SDF-1 через связывание С3а с рецептором CXCR4. С3а наряду с DPP4, а также с гиалуриновой кислотой, фибронектином и фибриногеном регулирует экспрессию SDF-1 на ГСПК [117, 118]. Доклинические исследования показали, что инкубация гемопоэтических стволовых клеток с С3а до трансплантации летально облученным мышам ускоряет динамику приживления [20, 21]. Однако результаты клинического применения были не такими успешными, так как С3а не давал преимущества в приживлении трансплантата [23].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многочисленные исследования, направленные на оптимизацию методических подходов к обогащению стволовыми клетками кроветворных трансплантатов, единой оптимальной технологии получения амплифицированных стволовых клеток до сих пор не существует. Основные задачи, стоящие перед исследователями на сегодняшний день, – сформировать представление о составе и биологических свойствах гемопоэтических клеток кроветворного трансплантата, обеспечивающих восстановление гемопоэза реципиента, и разработать методические подходы, обеспечивающие амплификацию этих клеток.

Сравнительный анализ материалов, накопленных в этой области, обнаруживает две тенденции: использование в системах для амплификации клеток пуповинной крови стромальных фидерных слоев или применение различных комбинаций гемопоэтических цитокинов. Между тем, в суспензионных культурах, в которых поддержание гемопоэтических предшественников происходит только за счет гемопоэтинов, не учитывается роль локального микроокружения (взаимодействие с клетками стромы и регуляция кислородом), тогда как показано, что эти факторы могут играть ключевую роль в развитии клеток крови. Экспансия ГСПК ПК более эффективна в сокультуре, чем в суспензионной культуре. Кроме



**Рис. 4.** Современные технологические подходы к модификации гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови *ex vivo*

того, сокультивирование улучшает приживание амплифицированных клеток после трансплантации. Добавление к системе сокультивирования экзогенных цитокинов дополнительно поддерживает экспансию ГСПК. Таким образом, представляется целесообразным использовать для амплификации системы *ex vivo*, включающие как стромальный подслон и физиологический уровень кислорода, так и необходимый коктейль из цитокинов и факторов роста.

В настоящий момент достаточно успешно показали себя молекулярно-генетические подходы, направленные как на амплификацию гемопоэтических клеток, так и на улучшение хоминга транспланти-

руемых клеток в костном мозге реципиента (рис. 4). Таким образом, системы *ex vivo* для амплификации ГСПК уже разработаны и успешно применяются, однако продолжается поиск новых эффективных методических подходов к экспансии клеток ПК с привлечением современных клеточных и молекулярно-биологических технологий. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Kögler G., Radke T.F., Lefort A., Sensken S., Fischer J., Sorg R.V., Wernet P. // *Exp. Hematol.* 2005. V. 33. № 5. P. 573–583.
2. Kögler G., Sensken S., Airey J.A., Trapp T., Müschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R.V., Fischer J., Rosenbaum C., et al. // *J. Exp. Med.* 2004. V. 200. № 2. P. 123–135.
3. Kögler G., Sensken S., Wernet P. // *Exp. Hematol.* 2006. V. 34. № 11. P. 1589–1595.
4. Sensken S., Waclawczyk S., Knaupp A.S., Trapp T., Enczmann J., Wernet P., Kogler G. // *Cytotherapy.* 2007. V. 9. № 4. P. 362–378.
5. Greschat S., Schira J., Küry P., Rosenbaum C., de Souza Silva M.A., Kögler G., Wernet P., Müller H.W. // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. № 2. P. 221–232.
6. Мусина Р.А., Бекчанова Е.С., Белявский А.В., Гриненко Т.С., Сухих Г.Т. // *Клет. технологии в биологии и медицине.* 2007. № 1. С. 16–20.



7. Erices A., Conget P., Minguell J.J. // *Br. J. Haematol.* 2000. V. 109. № 1. P. 235–242.
8. Bieback K., Kern S., Klüter H., Eichler H. // *Stem Cells.* 2004. V. 22. № 4. P. 625–634.
9. Yang S.E., Ha C.W., Jung M., Jin H.J., Lee M., Song H., Choi S., Oh W., Yang Y.S. // *Cytotherapy.* 2004. V. 6. № 5. P. 476–486.
10. Yoder M.C., Mead L.E., Prater D., Krier T.R., Mroueh K.N., Li F., Krasich R., Temm C.J., Prchal J.T., Ingram D.A. // *Blood.* 2007. V. 109. № 5. P. 1801–1809.
11. Cutler C., Antin J.H. // *Stem Cells.* 2001. V. 19. № 2. P. 108–117.
12. Gluckman E., Rocha V. // *Haematologica.* 2009. V. 94. № 4. P. 451–454.
13. Семенова Ж.Б., Сушкевич Г.Н., Карасева О.В., Ахатов Т.А., Семенова Н.А., Семенова Н.Ю., Сорокина Е.Г., Фуфаева Е.В., Романов Ю.А., Рошаль Л.М. и др. // *Нейрохирургия и неврология детского возраста.* 2011. № 1. С. 70–82.
14. Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S., Ribeiro R.C., Graves V., Yoder M., Wagner J., Vadhan-Raj S., Benninger L., Rubinstein P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. № 9. P. 4109–4113.
15. Lu L., Xiao M., Shen R.N., Grigsby S., Broxmeyer H.E. // *Blood.* 1993. V. 81. № 1. P. 41–48.
16. Moore M.A., Hoskins I. // *Blood Cells.* 1994. V. 20. № 2–3. P. 468–479; discussion P. 479–481.
17. Movassagh M., Caillot L., Baillou C., Guigon M., Lemoine F.M. // *Stem Cells.* 1997. V. 15. № 3. P. 214–222.
18. Horwitz M.E., Frassoni F. // *Cytotherapy.* 2015. V. 17. № 6. P. 730–738.
19. Hidalgo A., Weiss L.A., Frenette P.S. // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 110. № 4. P. 559–569.
20. Reza R., Mastellos D., Majka M., Marquez L., Ratajczak J., Franchini S., Glodek A., Honczarenko M., Spruce L.A., Janowska-Wieczorek A., et al. // *Blood.* 2003. V. 101. № 10. P. 3784–3793.
21. Ratajczak J., Reza R., Kucia M., Majka M., Allendorf D.J., Baran J.T., Janowska-Wieczorek A., Wetsel R.A., Ross G.D., Ratajczak M.Z. // *Blood.* 2004. V. 103. № 6. P. 2071–2078.
22. North T.E., Goessling W., Walkley C.R., Lengerke C., Kopani K.R., Lord A.M., Weber G.J., Bowman T.V., Jang I.H., Grosser T., et al. // *Nature.* 2007. V. 447. № 7147. P. 1007–1011.
23. Brunstein C.G., McKenna D.H., DeFor T.E., Sumstad D., Paul P., Weisdorf D.J., Ratajczak M., Laughlin M.J., Wagner J.E. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2013. V. 19. № 10. P. 1474–1479.
24. Cutler C., Multani P., Robbins D., Kim H.T., Le T., Hoggatt J., Pelus L.M., Despons C., Chen Y.B., Rezner B., et al. // *Blood.* 2013. V. 122. № 17. P. 3074–3081.
25. Robinson S.N., Thomas M.W., Simmons P.J., Lu J., Yang H., Parmar S., Liu X., Shah N., Martín-Antonio B., Bollard C., Dotti G., et al. // *Cytotherapy.* 2014. V. 16. № 1. P. 84–89.
26. Briddell R.A., Kern B.P., Zilm K.L., Stoney G.B., McNiece I.K. // *J. Hematother.* 1997. V. 6. № 2. P. 145–150.
27. Уфимцева А.И., Канов Е.В. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012. Т. 6. № 4. С. 21–27.
28. Summers Y.J., Heyworth C.M., de Wynter E.A., Chang J., Testa N.G. // *Stem Cells.* 2001. V. 19. № 6. P. 505–513.
29. Koller M.R., Manchel I., Newsom B.S., Palsson M.A., Palsson B.O. // *J. Hematother.* 1995. V. 4. № 3. P. 159–169.
30. Gilner J.B., Walton W.G., Gush K., Kirby S.L. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 2. P. 279–288.
31. de Lima M., McNiece I., Robinson S.N., Munsell M., Eapen M., Horowitz M., Alousi A., Saliba R., McMannis J.D., Kaur I., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2012. V. 367. № 24. P. 2305–2315.
32. Mantel C.R., O'Leary H.A., Chitteti B.R., Huang X., Cooper S., Hangoc G., Brustovetsky N., Srour E.F., Lee M.R., Messina-Graham S., et al. // *Cell.* 2015. V. 161. № 7. P. 1553–1565.
33. Aliyari Z., Khaziri N., Brazvan B., Saayah Melli M., Tayefi Nasrabadi H., Akbarzadeh A., Nozad Charoudeh H. // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2015. Jun 4. P. 1–8.
34. Gutman J.A., Turtle C.J., Manley T.J., Heimfeld S., Bernstein I.D., Riddell S.R., Delaney C. // *Blood.* 2010. V. 115. № 4. P. 757–765.
35. Moretta A., Andriolo G., Lisini D., Martinetti M., Pasi A., Rebutta P., Soligo D., Giordano R., Lazzari L., Maccario R. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2012. V. 18. № 7. P. 1108–1118.
36. Spees J.L., Gregory C.A., Singh H., Tucker H.A., Peister A., Lynch P.J., Hsu S.C., Smith J., Prockop D.J. // *Mol. Ther.* 2004. V. 9. № 5. P. 747–756.
37. Sundin M., Ringdén O., Sundberg B., Nava S., Götherström C., Le Blanc K. // *Haematologica.* 2007. V. 92. № 9. P. 1208–1215.
38. Петёвка Н.В., Гончарова Н.В., Северин И.Н., Космачева С.М., Потапнёв М.П. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012. Т. 7. № 1. С. 40–48.
39. Sano-Martins I.S., Dabrowski Z., Tabarowski Z., Witkowska-Pelc E., Spadacci Morena D.D., Spodaryk K. // *Cell Tissue Res.* 2002. V. 310. № 1. P. 67–75.
40. Gao L., Chen X., Zhang X., Liu Y., Kong P., Peng X., Liu L., Liu H., Zeng D. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2006. V. 36. № 2. P. 322–328.
41. Ławicki S., Mroczko B., Szmitkowski M. // *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2001. V. 55. № 3. P. 449–465.
42. Tursky M.L., Collier F.M., Ward A.C., Kirkland M.A. // *Cytotherapy.* 2012. V. 14. № 6. P. 679–685.
43. Hordyjewska A., Popiołek Ł., Horecka A. // *Cytotechnology.* 2015. V. 67. № 3. P. 387–396.
44. Grskovic B., Ruzicka K., Karimi A., Qujeq D., Müller M.M. // *Clin. Chim. Acta.* 2004. V. 343. № 1–2. P. 173–178.
45. Haylock D.N., To L.B., Dowse T.L., Juttner C.A., Simmons P.J. // *Blood.* 1992. V. 80. № 6. P. 1405–1412.
46. Broxmeyer H.E., Sherry B., Lu L., Cooper S., Oh K.O., Tekamp-Olson P., Kwon B.S., Cerami A. // *Blood.* 1990. V. 76. № 6. P. 1110–1116.
47. Broxmeyer H.E., Cooper S., Cacalano G., Hague N.L., Bailish E., Moore M.W. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 184. № 5. P. 1825–1832.
48. Graham G.J., Wright E.G., Hewick R., Wolpe S.D., Wilkie N.M., Donaldson D., Lorimore S., Pragnell I.B. // *Nature.* 1990. V. 344. № 6265. P. 442–444.
49. Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha L.G. // *J. Cell Physiol.* 1977. V. 91. № 3. P. 335–344.
50. Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Latsinik N.V., Panasyuk A.F., Keiliss-Borok I.V. // *Transplantation.* 1974. V. 17. № 4. P. 331–340.
51. De Angeli S., Di Liddo R., Buoro S., Toniolo L., Conconi M.T., Belloni A.S., Parnigotto P.P., Nussdorfer G.G. // *Int. J. Mol. Med.* 2004. V. 13. № 3. P. 363–371.
52. McNiece I., Harrington J., Turney J., Kellner J., Shpall E.J. // *Cytotherapy.* 2004. V. 6. № 4. P. 311–317.
53. Corre J., Barreau C., Cousin B., Chavoin J.P., Caton D., Fournial G., Penicaud L., Casteilla L., Laharrague P. // *J. Cell Physiol.* 2006. V. 208. № 2. P. 282–288.
54. Jang Y.K., Jung D.H., Jung M.H., Kim D.H., Yoo K.H., Sung K.W., Koo H.H., Oh W., Yang Y.S., Yang S.E. // *Ann. Hematol.* 2006. V. 85. № 4. P. 212–225.
55. Kilroy G.E., Foster S.J., Wu X., Ruiz J., Sherwood S., Heifetz A., Ludlow J.W., Stricker D.M., Potiny S., Green P., et al. // *J. Cell Physiol.* 2007. V. 212. № 3. P. 702–709.
56. Nakao N., Nakayama T., Yahata T., Muguruma Y., Saito S., Miyata Y., Yamamoto K., Naoe T. // *Am. J. Pathol.* 2010. V. 177. № 2. P. 547–554.
57. De Toni F., Poglio S., Youcef A.B., Cousin B., Pflumio F., Bourin P., Casteilla L., Laharrague P. // *Stem Cells Dev.* 2011. V. 20. № 12. P. 2127–2138.

58. Жамбалова А.П., Даревская А.Н., Кабаева Н.В., Романов Ю.А., Буравкова Л.Б. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2009. № 2. С. 89–95.
59. Петрова Т.В., Свиная Д.А., Нифонтова И.Н., Момотюк К.С., Савченко В.Г., Дризе Н.И. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. № 4. С. 218–222.
60. Анисимов С.В. // Цитология. 2012. Т. 54. № 4. С. 289–297.
61. Mishima S., Nagai A., Abdullah S., Matsuda C., Taketani T., Kumakura S., Shibata H., Ishikura H., Kim S.U., Masuda J. // Eur. J. Haematol. 2010. V. 84. № 6. P. 538–546.
62. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. // J. Cell. Physiol. 1996. V. 166. № 3. P. 585–592.
63. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M., Gerson S.L. // J. Cell. Physiol. 1998. V. 176. № 1. P. 57–66.
64. Буравкова Л.Б., Жамбалова А.П., Кабаева Н.В., Романов Ю.А. Стволовые клетки и регенеративная медицина. М.: Макс Пресс, 2011. С. 145–161.
65. Taichman R.S., Reilly M.J., Verma R.S., Emerson S.G. // Blood. 1997. V. 89. № 4. P. 1165–1172.
66. Ahmed N., Sammons J., Carson R.J., Khokher M.A., Hassan H.T. // Cell. Biol. Int. 2001. V. 25. № 5. P. 429–435.
67. Petit I., Szyper-Kravitz M., Nagler A., Lahav M., Peled A., Habler L., Ponomarev T., Taichman R.S., Arenzana-Seisdedos F., Fujii N., et al. // Nat. Immunol. 2002. V. 3. № 7. P. 687–694.
68. Kim J.W., Kim S.Y., Park S.Y., Kim Y.M., Kim J.M., Lee M.H., Ryu H.M. // Ann. Hematol. 2004. V. 83. № 12. P. 733–738.
69. Тепляшина А.С., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Чупикова Н.И., Ростовская М.С., Савченкова И.П. // Цитология. 2005. Т. 47. № 2. С. 130–135.
70. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И., Старостин В.И. // Изв. АН. Серия биологическая. 2006. № 1. С. 6–25.
71. Романов Ю.А., Даревская А.Н., Кабаева Н.В., Антонова О.А. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. № 4. С. 206–211.
72. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т. 7. № 1. С. 23–33.
73. Маслова Е.В., Андреева Е.Р., Андрианова И.В., Бобылева П.И., Романов Ю.А., Кабаева Н.В., Балашова Е.Е., Ряскина С.С., Дугина Т.Н., Буравкова Л.Б. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2013. № 4. С. 238–243.
74. Gimble J.M., Katz A.J., Bunnell B.A. // Circ. Res. 2007. V. 100. № 9. P. 1249–1260.
75. Parmar K., Mauch P., Vergilio J.A., Sackstein R., Down J.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 13. P. 5431–5436.
76. Сотнезова (Маслова) Е.В., Горностаева А.Н., Андреева Е.Р., Романов Ю.А., Балашова Е.В., Буравкова Л.Б. // Цитология. 2015. Т. 57. № 6. С. 428–435.
77. Andreeva E.R., Andrianova I.V., Sotnezova E.V., Buravkov S.V., Bobileva P.I., Romanov Y.A., Buravkova L.B. // PLoS One. 2015. V. 10. № 4. P. e0124939.
78. Cipolleschi M.G., Dello Sbarba P., Olivetto M. // Blood. 1993. V. 82. P. 7. P. 2031–2037.
79. Shima H., Takubo K., Iwasaki H., Yoshihara H., Gomei Y., Hosokawa K., Arai F., Takahashi T., Suda T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 378. № 3. P. 467–472.
80. Ivanovic Z., Hermite F., Brunet de la Grange P., Dazey B., Belloc F., Lacombe F., Vezon G., Praloran V. // Stem Cells. 2004. V. 22. № 5. P. 716–724.
81. Roy S., Tripathy M., Mathur N., Jain A., Mukhopadhyay A. // Eur. J. Haematol. 2012. V. 88. № 5. P. 396–405.
82. Ploemacher R.E., van der Sluijs J.P., Voerman J.S., Brons N.H. // Blood. 1989. V. 74. № 8. P. 2755–2763.
83. Jing D., Wobus M., Poitz D.M., Bornhäuser M., Ehninger G., Ordemann R. // Haematologica. 2012. V. 97. № 3. P. 331–339.
84. Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Жамбалова А.П., Козионова М.П. // Цитология. 2009. Т. 51. № 1. С. 5–12.
85. Malladi P., Xu Y., Chiou M., Giaccia A.J., Longaker M.T. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2006. V. 290. № 4. P. 1139–1146.
86. Wang D.W., Fermor B., Gimble J.M., Awad H.A., Guilak F. // J. Cell. Physiol. 2005. V. 204. № 1. P. 184–191.
87. Xu Y., Malladi P., Chiou M., Bekerman E., Giaccia A.J., Longaker M.T. // Tissue Eng. 2007. V. 13. № 12. P. 2981–2993.
88. Li Z., Wei H., Deng L., Cong X., Chen X. // FEBS J. 2010. V. 277. № 18. P. 3688–3698.
89. Koller M.R., Bender J.G., Papoutsakis E.T., Miller W.M. // Blood. 1992. V. 80. № 2. P. 403–411.
90. Andrade P.Z., de Soure A.M., Dos Santos F., Paiva A., Cabral J.M., da Silva C.L. // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2015. V. 9. № 10. P. 1172–1181.
91. Andersson E.R., Sandberg R., Lendahl U. // Development. 2011. V. 138. № 17. P. 3593–3612.
92. Sethi N., Kang Y. // Br. J. Cancer. 2011. V. 105. № 12. P. 1805–1810.
93. Румянцев С.А., Осипова Е.Ю., Ипатов С.Е., Шаманская Т.В., Майорова О.А., Румянцев А.Г. // Онкогематология. 2011. Т. 6. № 1. С. 64–75.
94. Milner L.A., Kopan R., Martin D.I., Bernstein I.D. // Blood. 1994. V. 83. № 8. P. 2057–2062.
95. Delaney C., Varnum-Finney B., Aoyama K., Brashem-Stein C., Bernstein I.D. // Blood. 2005. V. 106. № 8. P. 2693–2699.
96. Zidar B.L., Shaddock R.K., Zeigler Z., Winkelstein A. // Am. J. Hematol. 1977. V. 3. P. 177–185.
97. Percival S.S. // Nutr. Rev. 1995. V. 53. № 3. P. 59–66.
98. Peled T., Landau E., Mandel J., Glukhman E., Goudsmid R.N., Nagler A., Fibach E. // Exp. Hematol. 2004. V. 32. № 6. P. 547–555.
99. Peled T., Mandel J., Goudsmid R.N., Landor C., Hasson N., Harati D., Austin M., Hasson A., Fibach E., Shpall E.J., Nagler A. // Cytotherapy. 2004. V. 6. № 4. P. 344–355.
100. de Lima M., McMannis J., Gee A., Komanduri K., Couriel D., Andersson B.S., Hosing C., Khouri I., Jones R., Champlin R., et al. // Bone Marrow Transplant. 2008. V. 41. № 9. P. 771–778.
101. Montesinos P., Peled T., Landau E., Rosenheimer N., Mandel J., Hasson N., Olesinski E., Glukhman E., Snyder D.A., Cohen E.G., et al. // Blood. 2013. V. 122. № 21. P. 295.
102. Peled T., Shoham H., Aschengrau D., Yackoubov D., Frei G., Rosenheimer G.N., Lerrer B., Cohen H.Y., Nagler A., Fibach E., et al. // Exp. Hematol. 2012. V. 40. № 4. P. 342–355.
103. Horwitz M.E., Chao N.J., Rizzieri D.A., Long G.D., Sullivan K.M., Gasparetto C., Chute J.P., Morris A., McDonald C., Waters-Pick B., et al. // J. Clin. Invest. 2014. V. 124. № 7. P. 3121–3128.
104. Boitano A.E., Wang J., Romeo R., Bouchez L.C., Parker A.E., Sutton S.E., Walker J.R., Flaveny C.A., Perdew G.H., Denison M.S., Schultz P.G., Cooke M.P. // Science. 2010. V. 329. № 5997. P. 1345–1348.
105. Wagner W., Wein F., Roderburg C., Saffrich R., Faber A., Krause U., Schubert M., Benes V., Eckstein V., Maul H., et al. // Exp. Hematol. 2007. V. 35. № 2. P. 314–325.
106. Hoggatt J., Singh P., Sampath J., Pelus L.M. // Blood. 2009. V. 113. № 22. P. 5444–5455.
107. Robinson S.N., Simmons P.J., Thomas M.W., Brouard N., Javni J.A., Trilok S., Shim J.S., Yang H., Steiner D., Decker W.K., et al. // Exp. Hematol. 2012. V. 40. № 6. P. 445–456.
108. Xia L., McDaniel J.M., Yago T., Doeden A., McEver R.P. // Blood. 2004. V. 104. № 10. P. 3091–3096.
109. Tashiro K., Tada H., Heilker R., Shirozu M., Nakano T., Honjo T. // Science. 1993. V. 261. № 5121. P. 600–603.

110. Kim C.H., Broxmeyer H.E. // *Blood*. 1998. V. 91. № 1. P. 100–110.
111. Aiuti A., Webb I.J., Bleul C., Springer T., Gutierrez-Ramos J.C. // *J. Exp. Med.* 1997. V. 185. № 1. P. 111–120.
112. Bleul C.C., Fuhlbrigge R.C., Casasnovas J.M., Aiuti A., Springer T.A. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 184. № 3. P. 101–109.
113. Peled A., Petit I., Kollet O., Magid M., Ponomaryov T., Byk T., Nagler A., Ben-Hur H., Many A., Shultz L., et al. // *Science*. 1999. V. 283. № 5403. P. 845–848.
114. Christopherson K.W. 2nd, Paganessi L.A., Napier S., Porecha N.K. // *Stem Cells Dev.* 2007. V. 16. № 3. P. 355–360.
115. Broxmeyer H.E., Hoggatt J., O'Leary H.A., Mantel C., Chitteti B.R., Cooper S., Messina-Graham S., Hangoc G., Farag S., Rohrabough S.L., et al. // *Nat. Med.* 2012. V. 18. № 12. P. 1786–1796.
116. Farag S.S., Srivastava S., Messina-Graham S., Schwartz J., Robertson M.J., Abonour R., Cornetta K., Wood L., Secrest A., Strother R.M., et al. // *Stem Cells Dev.* 2013. V. 22. № 7. P. 1007–1015.
117. Avigdor A., Goichberg P., Shvitiel S., Dar A., Peled A., Samira S., Kollet O., Hershkoviz R., Alon R., Hardan I., et al. // *Blood*. 2004. V. 103. № 8. P. 2981–2989.
118. Wysoczynski M., Reza R., Ratajczak J., Kucia M., Shirvaikar N., Honczarenko M., Mills M., Wanzeck J., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. // *Blood*. 2005. V. 105. № 1. P. 40–48.



УДК 577.27

# Молекулярные и клеточные механизмы формирования дендритными клетками противоопухолевого иммунного ответа

О. В. Марков\*, Н. Л. Миронова†, В. В. Власов, М. А. Зенкова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

E-mail: \*markov\_oleg@list.ru; †mironova@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.12.2015

Принята к печати 29.04.2016

**РЕФЕРАТ** Дендритные клетки (ДК) играют огромную роль в инициации и регуляции противоопухолевого иммунного ответа. В настоящее время большое внимание привлекают противоопухолевые вакцины на основе ДК, которые активно изучают как на животных моделях, так и в клинических испытаниях. Дендритно-клеточные вакцины получают из выделенных из крови клеток-предшественников, которые нагружают опухолеспецифическими антигенами в виде ДНК, РНК или клеточного лизата из аллогенного опухолевого материала. Однако эффективность таких вакцин остается достаточно низкой. Несомненно, что лучшее понимание механизмов функционирования ДК позволит увеличить противоопухолевый потенциал ДК-вакцин для их успешного применения в клинике. В обзоре рассмотрены происхождение и основные субпопуляции ДК мыши и человека, указаны различия между ДК этих видов. Описаны клеточные механизмы презентации и кросс-презентации экзогенных антигенов дендритными клетками Т-лимфоцитам в комплексах с молекулами МНС II и МНС I соответственно. Обсуждаются механизмы внутриклеточного процессинга антигенов в ДК, явление кросс-дрессинга и развитие функции кросс-презентации. Отдельная часть обзора посвящена описанию механизмов ухода опухоли от иммунного надзора путем подавления функции ДК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дендритные клетки, иммуносупрессия опухолей, презентация и кросс-презентация антигенов, протеасома.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АГ – антиген; АПК – антигенпредставляющие клетки; пДК – плазмацитоидные дендритные клетки; преДК – предшественники дендритных клеток; TCR – Т-клеточный рецептор; Treg – Т-регуляторные клетки; СМР – общие миелоидные предшественники; HLA – человеческий лейкоцитарный антиген; MDP – предшественники макрофагов дендритных клеток; MDSC – супрессорные клетки миелоидного происхождения; NK – натуральные киллеры; IL – интерлейкин; TAM – опухоль-ассоциированные макрофаги; Th – Т-хелперные клетки; TLR – толл-подобный рецептор; <sup>low</sup> – низкий уровень экспрессии; <sup>mid</sup> – средний уровень экспрессии; <sup>high</sup> – высокий уровень экспрессии.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в терапии онкологических заболеваний особое место занимают методы, основанные на активации иммунной системы. Среди множества подходов выделяется использование вакцин на основе дендритных клеток (ДК), способных запускать и поддерживать опухолеспецифический Т- и В-клеточный иммунный ответ [1]. ДК – это профессиональные антигенпредставляющие клетки (АПК), главная функция которых заключается в захвате чужеродных антигенов, их процессинге и презентации на клеточной поверхности в комплексах с мо-

лекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) первого и второго типа наивным Т-клеткам. В результате такого взаимодействия происходят созревание и активация опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), способных проникать в места локализации опухоли, идентифицировать опухолевые клетки и уничтожать их. Помимо этого запускается ответ Т-хелперных клеток (Th-клеток) первого и второго типа, стимулирующий Т- и В-клеточные звенья противоопухолевого иммунного ответа. Дополнительная стимуляция секретируемыми ДК цитокинами способствует проли-

ферации клонов опухолеспецифических ЦТЛ. В настоящее время крайне актуальной представляется разработка вакцин на основе ДК, позволяющих эффективно лечить онкологические заболевания и преодолевать вызванные опухолью иммунодефицитные состояния.

Известно, что микроокружение опухоли подавляет иммунную систему, за счет чего опухоль уходит от иммунного надзора. Опухоль и ее микроокружение продуцируют разнообразные цитокины и хемокины, препятствующие созреванию АПК и Т-лимфоцитов, что, в конечном итоге, приводит к подавлению функциональной активности Т-клеточного звена противоопухолевого иммунитета. Иммуносупрессия, обусловленная действием веществ, выделяемых опухолевым окружением, приводит к неэффективности стандартных подходов, применяемых при злокачественных новообразованиях. Поэтому в настоящее время актуальна разработка методов терапии опухолей, основанных на активации иммунной системы организма. Вакцины на основе дендритных клеток считаются одним из наиболее эффективных способов преодоления иммунодефицита с использованием собственных ресурсов организма.

В обзоре рассмотрены происхождение ДК, их субпопуляции, молекулярные и клеточные механизмы активации дендритными клетками противоопухолевого иммунного ответа, а также противодействие опухоли и ее окружения способности дендритных клеток подавлять опухолевый рост.

### **ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ДК: СВЯЗЬ С ВРОЖДЕННЫМ И ПРИОБРЕТЕННЫМ ИММУНИТЕТОМ**

Основной задачей ДК, представленных во всех тканях организма, является опознавание чужеродных или собственных патогенных антигенов (АГ) и передача полученной информации клеткам приобретенного иммунитета (наивным Т-лимфоцитам) с помощью презентации АГ в комплексе с молекулами МНС на поверхности ДК.

ДК – ключевые клетки, связывающие между собой древний низкоспецифичный врожденный и эволюционно новый высокоспецифичный приобретенный иммунитет. ДК происходят из костномозговых предшественников, общих для моноцитов, макрофагов и гранулоцитов – основных клеточных факторов врожденного иммунитета. ДК обладают общими с этими клетками свойствами, прежде всего способностью к фагоцитозу, т.е. к поглощению твердых частиц (клетки, апоптотические тельца, белки и др.). Действительно, практически все клетки врожденного иммунитета, за исключением эозинофилов и натуральных киллеров (НК), используют фагоцитоз в ка-

честве одного из важных механизмов уничтожения мишеней (бактерий, чужеродных или собственных инфицированных или опухолевых клеток) [2]. ДК используют фагоцитоз наряду с пиноцитозом и рецептор-опосредованным эндоцитозом для поглощения АГ с целью последующего процессинга и презентации.

Клетки врожденного иммунитета обладают неспецифическим механизмом распознавания своих мишеней при помощи рецепторов, идентифицирующих не отдельные молекулы (эпитопы АГ, как клетки приобретенного иммунитета Т-лимфоциты), а группы молекул, сигнализирующих о чужеродности или агрессивности их носителей [3]. Так, большинство клеток врожденного иммунитета содержат на своей поверхности лектины, распознающие концевые остатки сахаров протеогликанов. На клеточной поверхности ДК также представлено большое количество С-лектинов, прежде всего маннозных рецепторов (CD206), связывающих концевые остатки маннозы [4]. Маннозные рецепторы также широко экспрессируются макрофагами.

Другое свойство, объединяющее ДК с клетками врожденного иммунитета, а именно, с фагоцитами (моноцитами и макрофагами), – их способность презентировать АГ в комплексах с молекулами МНС лимфоцитам. Однако ДК, будучи профессиональными АПК, в 10–100 раз более эффективно стимулируют Т-лимфоциты, чем другие АПК (моноциты, макрофаги, В-лимфоциты) [5–7]. Только ДК способны наиболее эффективно кросс-презентировать АГ, т.е. представлять экзогенные АГ в комплексах с молекулами МНС I CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, запуская специфичный к таким АГ ответ ЦТЛ [8]. Кроме того, только ДК способны представлять АГ наивным Т-лимфоцитам в лимфоидных органах [9].

Другой клеточный фактор врожденного иммунитета – НК, имеющие лимфоцитарное происхождение, но отличающиеся от лимфоцитов приобретенного иммунитета более примитивным механизмом распознавания и единственным способом уничтожения клеток-мишеней – перфорин-зависимым цитолизом с участием перфорина и гранзима [3]. Показано, что ДК тесно взаимодействуют с НК, способны стимулировать пролиферацию и продукцию цитокинов НК, а также усиливать их цитотоксичность. Активированные НК, в свою очередь, играют большую роль в элиминировании незрелых толерогенных ДК. С другой стороны, НК могут вызывать созревание ДК и влиять на поляризацию Т-клеточных ответов. При узнавании мишени НК выделяют фактор некроза опухолей  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), способствующие созреванию ДК и поляризации Т-хелперного ответа первого типа (Th1-

ответа). Более того, эти цитокины способствуют усилению кросс-презентации АГ дендритными клетками Т-лимфоцитам. Таким образом, взаимосвязь ДК с НК имеет большое значение для формирования эффективного опухолеспецифического приобретенного иммунного ответа [10].

Для формирования антигенспецифического приобретенного иммунного ответа незрелые ДК выходят из костного мозга и по кровотоку мигрируют в периферические ткани. Там ДК захватывают чужеродные или свои АГ, процессируют их и выставляют на своей поверхности в комплексах с молекулами МНС I и МНС II. В то же время в периферических тканях на ДК действуют патогенные агенты и/или воспалительные цитокины, которые приводят к их созреванию. Зрелые ДК, нагруженные АГ, мигрируют в лимфатические узлы через афферентные лимфатические сосуды, где взаимодействуют с наивными  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитами [11, 12] (рис. 1).

При взаимодействии с ДК наивные Т-лимфоциты могут дифференцироваться в антигенспецифические эффекторные Т-клетки с различными функциями. Так  $CD4^+$  Т-лимфоциты могут стать Т-хелперными клетками типа 1, 2 и 17, а также регуляторными Т-клетками (Treg). Их главные функции заключаются в стимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, активации В-лимфоцитов, продуцирующих под их

действием антитела, регуляции аутоиммунных и провоспалительных ответов, а также в подавлении функции других лимфоцитов соответственно. Наивные  $CD8^+$  Т-лимфоциты дифференцируются в ЦТЛ, способные специфически узнавать и уничтожать опухолевые клетки [13]. Таким образом, ДК способны как прямо, так и опосредованно специфически запускать, программировать и регулировать Т- и В-клеточный противоопухолевый иммунный ответ.

### Происхождение и субпопуляции ДК

ДК представляют собой гетерогенную популяцию клеток, берущую начало от отдельной от других лейкоцитов гемопоэтической линии костномозговых предшественников [14]. Существует несколько субпопуляций ДК, различающихся происхождением, фенотипом, локализацией, путям миграции и функциям и, как результат, влиянием на врожденный и приобретенный иммунитет [15]. Эти субпопуляции можно объединить в две главные группы: классические ДК (кДК) и плазматоидные ДК (пДК).

### Предшественники ДК (преДК)

Считается, что преДК берут начало от костномозговых предшественников, теряющих по мере созревания потенциал к развитию в клетки других ти-

**Рис. 1.**  
Взаимодействие ДК с  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитами [12]

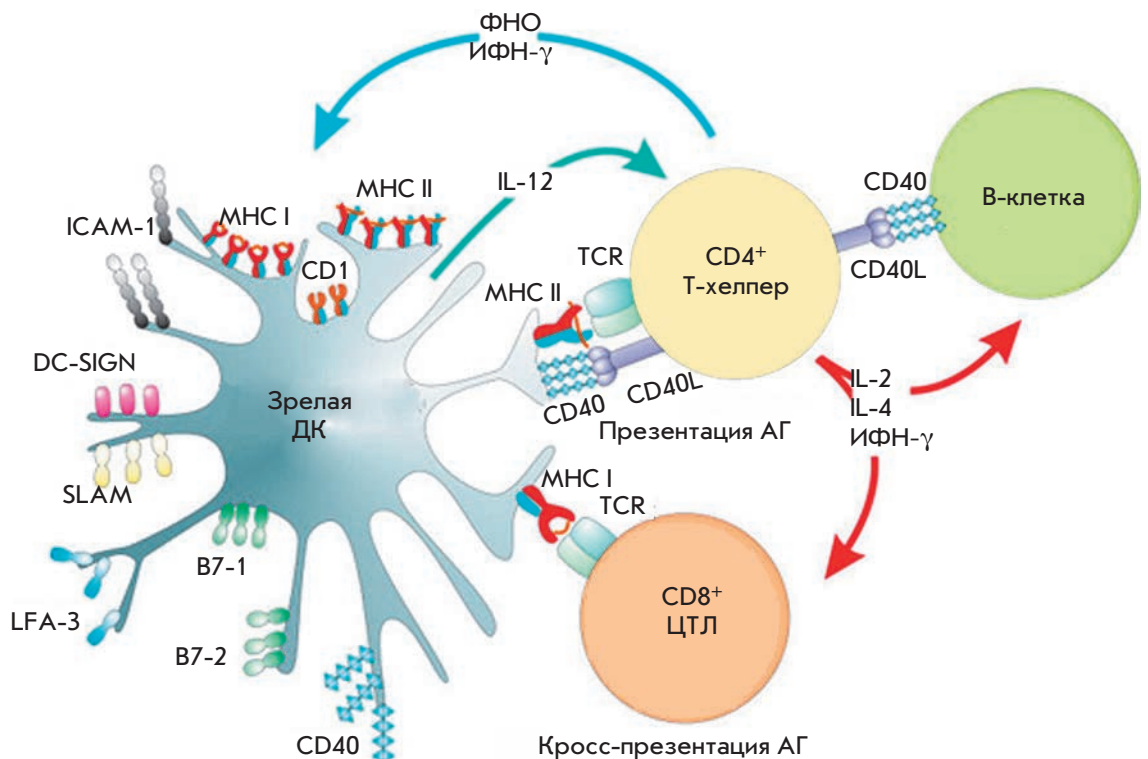
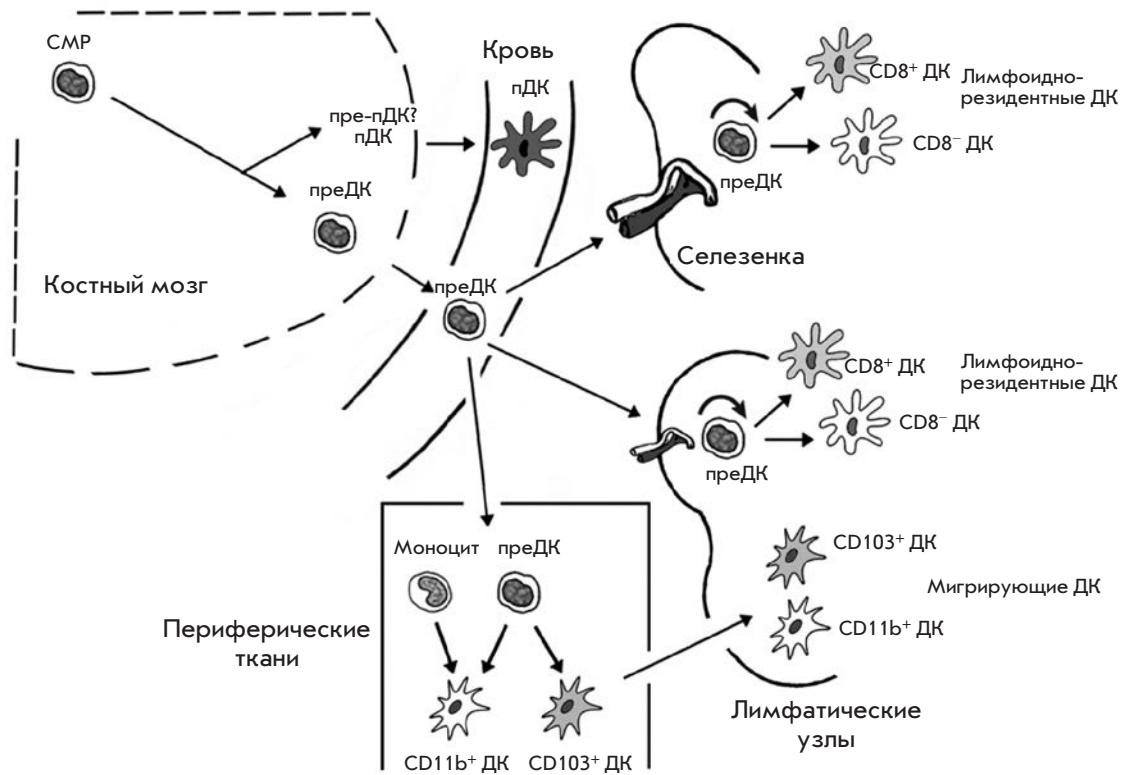




Рис. 2.  
Предшественники ДК  
[16]



пов. Данный процесс называется коммитированием. Наиболее ранними коммитированными преДК являются клональные общие миелоидные предшественники (СМР), обнаруженные и у мыши, и у человека [16] (рис. 2), дающие начало эритроцитам, гранулоцитам, мегакариоцитам, моноцитам, макрофагам, ДК и пДК [17, 18].

Предшественники кДК (пре-кДК), имеющие фенотип  $Lin^-CD11c^+MHC II^+$ , покидают костный мозг и по кровотоку попадают в лимфоидные органы, где дифференцируются в лимфоидно-резидентные  $CD8^+$  и  $CD11b^+$  кДК. Они попадают также в такие нелимфоидные органы, как печень, почки, легкие и кишечник, где дают начало  $CD103^+$  и  $CD11b^+$  кДК [19, 20]. Таким образом, пре-кДК являются непосредственными предшественниками кДК, которые постоянно мигрируют из костного мозга на периферию для дифференцировки в кДК периферических тканей и резидентные ДК лимфоидных органов.

Клетки Лангерганса отличаются от других субпопуляций ДК, поскольку самообновляются вне зависимости от костного мозга и дифференцируются из предшественников, заселивших кожу еще в пренатальном периоде [21]. Однако в условиях воспаления, когда популяция клеток Лангерганса сильно истощается, эти клетки могут развиваться из моноцитов крови [22].

### Субпопуляции ДК

**Плазмацитоидные ДК.** пДК – немногочисленная субпопуляция ДК (0.3–0.5% клеток периферической крови человека или клеток лимфоидных органов мыши), которая имеет сходное с классическими ДК происхождение, но отличается от них жизненным циклом. пДК накапливаются в основном в крови и лимфоидных органах и проникают в лимфатические узлы по кровотоку [14]. В пДК выявлен низкий уровень экспрессии МНС II и костимулирующих молекул. Для пДК мыши характерен фенотип  $CD11c^{low}CD11b^-CD45R/B220^+$  [23, 24], для пДК человека –  $Lin^-CD11c^-CD123(IL-3 R\alpha)^+$  [25]. Большинство пДК развиваются из общих костномозговых преДК (СДР), обладающих как дендритно-клеточным, так и лимфоидным потенциалом [26].

пДК называют клетками, продуцирующими интерфероны типа I (ИФН- $\alpha/\beta$ ), поскольку они секретируют большие количества ИФН- $\alpha/\beta$  при взаимодействии патогенных нуклеиновых кислот с толл-подобными рецепторами (TLR3, TLR7, TLR8 и/или TLR9), которые экспрессируются в пДК [27–29]. В этом случае индуцируется развитие защитного иммунитета, поскольку ИФН- $\alpha/\beta$  усиливают кросс-презентирующую способность классических ДК, а также активируют такие иммунные клетки,



Рис. 3. Субпопуляции классических ДК мыши

как В- и Т-лимфоциты, и NK-клетки. Таким образом, активированные пДК играют важную роль во врожденном и приобретенном иммунном ответе [30].

В норме пДК мыши локализируются в лимфоидных органах и крови, а также в печени, легких и коже. У человека пДК обнаруживаются не только в печени и крови, но и в лимфоидных органах. Они могут мигрировать из лимфоидных органов по кровотоку в Т-клеточные зоны вторичных лимфоидных тканей и маргинальную зону селезенки. При патологических состояниях пДК покидают костный мозг, органы или кровяное русло и инфильтрируют воспаленные ткани, где взаимодействуют с сигналами опасности (чужеродными АГ, патогенными агентами и т.д.) и высвобождают большие количества интерферонов типа I [31].

**Классические ДК.** Классическими ДК (кДК) называются все ДК за исключением плазмацитоидных ДК. Их можно обнаружить в большинстве лимфоидных и нелимфоидных тканей. кДК способны обнаруживать повреждение тканей, захватывать собственные или чужеродные АГ, процессировать их и высокоэффективно презентировать антигены Т-лимфоцитам. Таким образом, кДК способны индуцировать иммунитет к любым чужеродным АГ, проникающим в ткани, а также запускать толерантность к собственным АГ.

кДК конститутивно экспрессируют гемопоэтические маркеры CD45, MHC II, Flt3 и CD11c, а линейно-специфические маркеры Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров, гранулоцитов и эритроцитов в них отсутствуют [14]. Классические ДК можно классифицировать по месту локализации на мигрирующие нелимфоидные кДК и лимфоидно-резидентные кДК, не покидающие лимфоидные органы всю жизнь.

**Классические ДК мыши.** кДК нелимфоидных тканей составляют 1–5% клеток в зависимости от конкретного органа и состоят из двух субпопуляций: CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> и CD11b<sup>+</sup> кДК (рис. 3). CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> кДК заселяют большинство соединительных тканей. Это главные АПК, способные более эффективно кросс-презентировать АГ наивным Т-лимфоцитам, чем другие субпопуляции ДК [32] (рис. 3). Как нелимфоидные, так и лимфоидно-резидентные CD11b<sup>+</sup> кДК играют главную роль в презентации АГ с помощью молекул MHC II [33] (рис. 3).

В эпидермальном слое кожи представлена третья субпопуляция кДК – клетки Лангерганса. Они составляют 2–4% от общего количества эпидермальных клеток [34] и характеризуются MHC II<sup>low</sup>CD11c<sup>mid</sup>CD207<sup>high</sup>. Клетки Лангерганса способны запускать противовирусный CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ против разнообразных вирусных

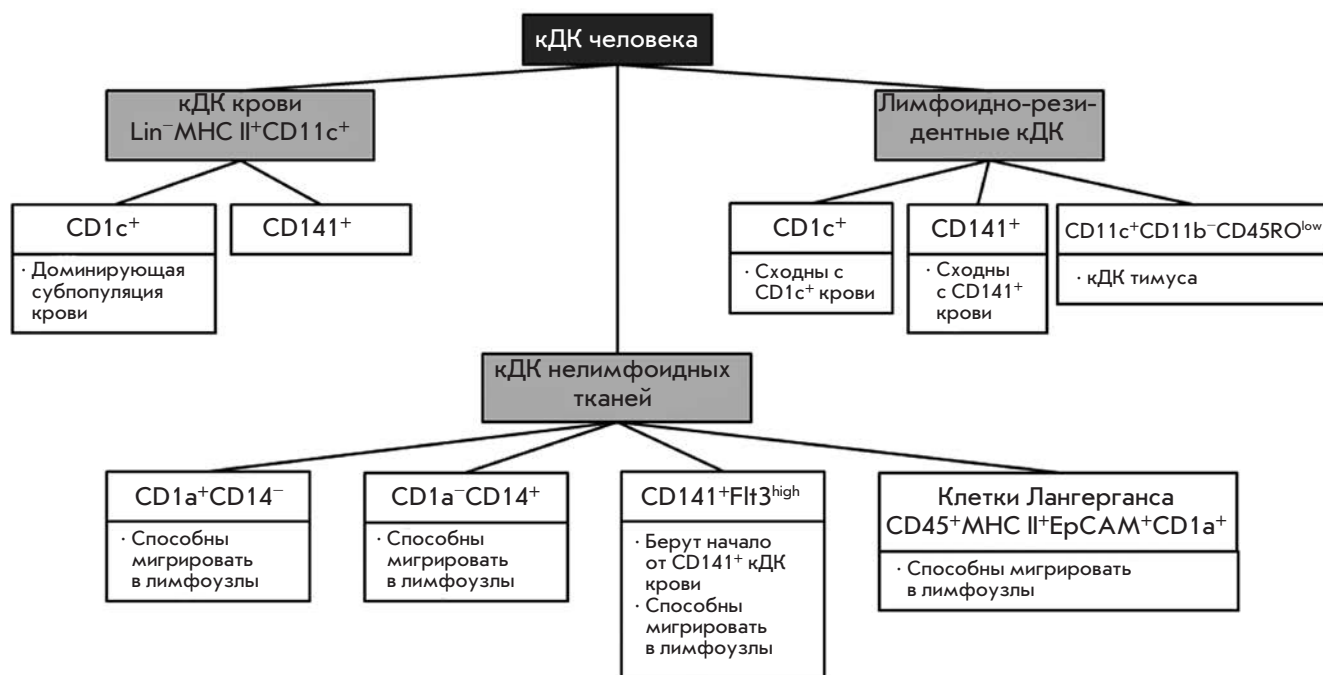


Рис. 4. Субпопуляции классических ДК человека

патогенов, за исключением цитолитических вирусов, таких, как вирусы простого герпеса и осповакцины, поскольку они обладают способностью индуцировать апоптоз ДК, в том числе и клеток Лангерганса [35].

Резидентные кДК лимфоидных органов в основном состоят из двух субпопуляций – CD8<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup> кДК [36] (рис. 3). CD8<sup>+</sup> ДК составляют 20–40% от кДК селезенки и лимфатических узлов. CD11b<sup>+</sup> ДК преобладают среди лимфоидно-резидентных популяций кДК во всех лимфоидных тканях за исключением тимуса. Эти клетки продуцируют высокие уровни хемокинов CCL17 и CCL22, привлекающие CD4<sup>+</sup> Т-клетки [14].

**Классические ДК человека.** Главное отличие кДК человека от кДК мыши заключается в спектре поверхностных маркеров. кДК человека подразделяются на кДК крови и нелимфоидных тканей, а также резидентные кДК лимфоидных тканей (рис. 4). кДК крови человека имеют фенотип Lin<sup>-</sup>MHC II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> и представлены двумя субпопуляциями, экспрессирующими неперекрывающиеся маркеры CD1c (BDCA1) или CD141 (BDCA3). Доминирующая субпопуляция ДК периферической крови представлена клетками CD1c<sup>+</sup>, тогда как CD141<sup>+</sup> ДК формируют короткоживущую популяцию [14] (рис. 4).

К кДК нелимфоидных тканей относятся CD1a<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> ДК, CD1a<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> ДК [37], отдель-

ная субпопуляция CD141<sup>+</sup>Flt3<sup>high</sup> ДК, берущая начало от CD141<sup>+</sup> ДК периферической крови [38]. К кДК нелимфоидных тканей относят также клетки Лангерганса, экспрессирующие маркеры CD45, MHC II, молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpCAM) и лангерина CD207, а также CD1a [14] (рис. 4).

Резидентные кДК лимфоидных тканей состоят из субпопуляций CD1c<sup>+</sup> и CD141<sup>+</sup> кДК, имеющих сходство с ДК крови [38]. Клетки лимфатических узлов также включают клетки MHC II<sup>high</sup>CD11c<sup>mid</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>, клетки EpCAM<sup>-</sup>CD1a<sup>+</sup> и клетки CD206<sup>+</sup>, классифицированные как мигрирующие клетки Лангерганса, мигрирующие кожные CD1a<sup>+</sup> ДК и кожные CD14<sup>+</sup> ДК соответственно [39] (рис. 4). Большинство кДК тимуса человека имеют фенотип CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45RO<sup>low</sup>, у них отсутствуют миелоидные маркеры, представленные на CD141<sup>+</sup> ДК.

## ФУНКЦИИ ДК

### Презентация антигенов ДК с помощью молекул MHC II

Профессиональные АПК, такие, как ДК, макрофаги и В-лимфоциты, характеризуются прежде всего высоким уровнем экспрессии молекул MHC II на клеточной поверхности. Практически все субпо-



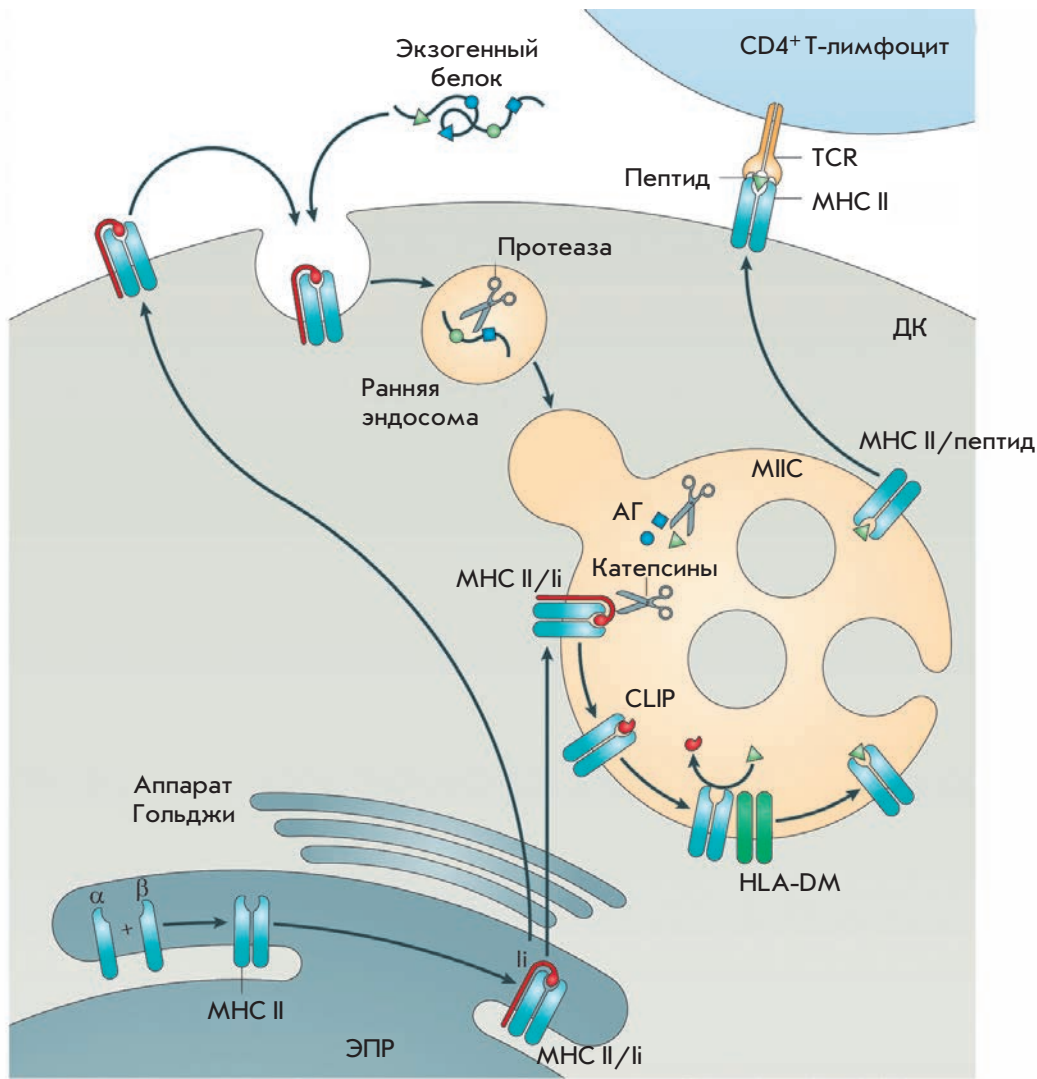


Рис. 5. Презентация экзогенных АГ ДК с помощью молекул МНС класса II [41]

пуляции ДК способны поглощать экзогенные АГ, процессировать и представлять их в комплексах с молекулами МНС II CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам и запускать Т-хелперный иммунный ответ разного типа. Для эффективного запуска Т-хелперного ответа помимо комплексов МНС II–АГ ДК необходимо присутствие на поверхности клеток костимулирующих и адгезионных молекул (CD80, CD86, CD40 и др.), а также синтез таких цитокинов, как IL-12, ИФН-γ (Th1-ответ), IL-4 (Th2-ответ) или IL-23 (Th17-ответ) [40] (рис. 1, 5).

На рис. 5 представлены события презентации экзогенных АГ ДК с помощью МНС II. Молекула МНС II представляет собой гетеродимер, состоящий из двух гомогенных пептидов, α- и β-цепей, которые собираются в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и соединяются с инвариантной цепью (Ii) (рис. 5). Комплексы МНС II/Ii транспортируются

в поздние эндосомы, называемые компартментами МНС II (МНС). Транспорт регулируется двумя дилейциновыми мотивами, расположенными на цитоплазматическом конце инвариантной цепи, которые узнаются сортировочными адапторами AP1 (адаптор транс-комплекса Гольджи) и AP2 (адаптор плазматической мембраны). AP2-зависимый эндоцитозный путь транспорта молекул МНС II с плазматической мембраны к МНС преобладает у незрелых ДК, тогда как AP1-зависимый транспорт из транс-Гольджи характерен для зрелых ДК [41].

В МНС инвариантная цепь отщепляется от молекулы МНС II с помощью протеаз катепсинов S и L, причем в пептидсвязывающей бороздке МНС II остается ассоциированный с классом II пептид Ii (CLIP). Для обмена CLIP на высокоаффинный антигенный пептид молекулам МНС II необходим белок-шаперон H2-DM у мыши или HLA-DM у человека. Следует

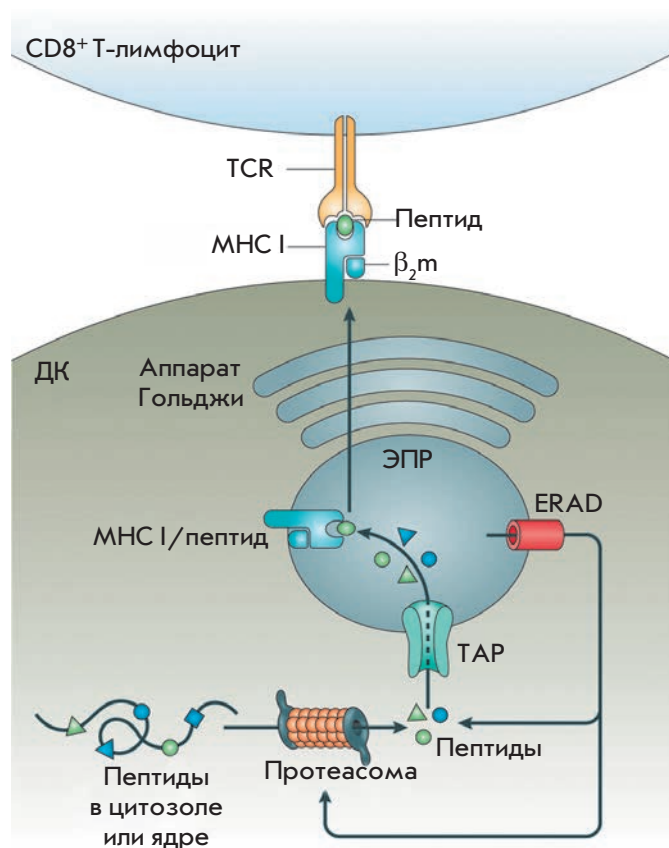


Рис. 6. Кросс-презентация экзогенных АГ ДК с помощью молекул МНС класса I [41]

отметить, что при презентации АГ с помощью молекул МНС II ДК используют вакуолярный путь процессинга АГ, где захваченные белки расщепляются на пептиды с помощью лизосомальных протеаз.

Образующиеся комплексы МНС II/пептид транспортируются в везикулах к плазматической мембране с помощью быстрого микротрубочкового транспорта с участием моторных белков динеина (входящий транспорт) и кинезина (исходящий транспорт), а также медленного транспорта с участием актомиозиновых моторных белков.

Эффективность презентации АГ с помощью молекул МНС II находится в обратной зависимости от (1) чувствительности белковых АГ к деградации, а также от (2) концентрации и активности протеолитических ферментов в поздних эндосомах. ДК отличаются от других фагоцитирующих клеток (например, макрофагов) значительно более низким уровнем экспрессии лизосомальных протеаз, а также сниженным уровнем их протеолитической активности. Это связано с высоким уровнем рН эндосомных компартментов, что обусловлено низкой активностью V-АТФ-азы и повышенной активностью NADPH-оксидазы 2 [42].

### Кросс-презентация АГ с помощью молекул МНС I

Кросс-презентацией называют презентацию экзогенных АГ с помощью молекул МНС I, что необходимо для запуска цитотоксического CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа (рис. 6). ДК – это уникальные АПК, поскольку только они способны кросс-презентировать АГ наивным CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам [8]. Эта способность необходима для иммунного надзора и позволяет иммунной системе идентифицировать опухоли и вирусы, не инфицирующие ДК. Следует отметить, что не все субпопуляции ДК обладают способностью к эффективной кросс-презентации. У мыши наиболее эффективными являются мигрирующие CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> ДК и резидентные CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> ДК лимфоидных органов [32], у человека – CD141<sup>+</sup> ДК [14].

Молекулы МНС I экспрессируются всеми клетками, содержащими ядро. Основная функция молекул МНС I в клетках – презентация собственных АГ клеткам иммунной системы с целью передачи сигнала о том, что это не чужеродная клетка, а собственная клетка организма. Молекула МНС I представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из полиморфной тяжелой цепи и легкой цепи, называемой β2-микроглобулином. Полиморфизм тяжелой цепи обеспечивает разнообразие пептидсвязывающих полостей на молекулах МНС I, что позволяет узнавать уникальные антигенные пептиды благодаря различиям в якорных остатках, к которым они прикрепляются [41].

Молекулы МНС I собираются в ЭПР и перед присоединением пептидов удерживаются там благодаря взаимодействию с белками-шаперонами, такими, как кальнексин, кальретикулин, ERp57, PDI и тапазин. Гетеродимеры МНС I неустойчивы, и в отсутствие подходящего пептида легко диссоциируют в физиологических условиях.

Антигенные пептиды для кросс-презентации, прошедшие процессинг, транспортируются TAP-белками к молекулам МНС I в ЭПР. Пептидсвязывающая полость в МНС I вмещает в себя пептиды длиной от 8 до 10 аминокислотных остатков в зависимости от гаплотипа МНС. Пептиды прикрепляются к якорным последовательностям в молекуле МНС I преимущественно с помощью N- и C-концевых аминокислотных остатков, а также с участием некоторых боковых цепей внутримолекулярных остатков [43]. Связывание пептида с молекулой МНС I приводит к стабилизации взаимодействия между тяжелыми и легкими цепями МНС I, высвобождению шаперонов, после чего полностью собранный комплекс МНС I/пептид может покинуть ЭПР для презентации на клеточной поверхности. Этот механизм не позволяет «пустым» молекулам МНС I транспортироваться на плазма-

тическую мембрану и взаимодействовать там с экзогенными АГ. Пептиды и молекулы МНС I, которые не связались в ЭПР, возвращаются в цитозоль для деградации [44].

### **Процессинг АГ и образование комплексов с МНС I**

Существует два основных механизма процессинга АГ при кросс-презентации – вакуолярный и цитозольный, которые могут действовать как по отдельности, так и одновременно в зависимости от типа кросс-презентируемого АГ.

*Вакуолярный путь процессинга АГ.* При вакуолярном пути процессинга АГ кросс-презентируемые АГ процессируются и связываются с молекулами МНС I внутри эндосом/фагосом. Одним из механизмов считается участие шаперона CD74 в транспортировке вновь синтезированных молекул МНС I из ЭПР в эндоцитозные компартменты в ДК [45]. В фагосоме в процессинге АГ для кросс-презентации участвует цистеиновая протеаза катепсин S [46]. Кроме того, в синтез кросс-презентируемых пептидов в цитозольном пути процессинга АГ вовлечена регулируемая инсулином аминопептидаза IRAP, родственная аминопептидазам ERAP1 и ERAP2 ЭПР [47, 48].

*Цитозольный путь процессинга АГ.* Цитозольный путь играет главную роль в процессинге АГ ДК [46]. Показано, что блокирование вакуолярного пути процессинга АГ слабо ингибирует кросс-презентацию и даже может усиливать ее, тогда как ингибиторы протеасомы и транспорта белков в комплекс Гольджи (лактактинин и брэфелдин А соответственно) полностью подавляют способность ДК кросс-презентировать АГ CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам [49].

При цитозольном пути АГ транспортируются из фагосом в цитозоль, где процессируются для кросс-презентации подобно эндогенным АГ путем протеасомного протеолиза. Механизм транспорта АГ из эндосом в цитозоль не до конца установлен. Предполагается, что в нем может участвовать ЭПР-ассоциированная машина деградации (ERAD-машина), в частности, входящие в ее состав белки SEC61 и p97 [50]. Транслокация АГ, захваченных ДК с помощью маннозных рецепторов, контролируется убиквитинированием цитозольных участков МР. Белок p97, являющийся АТР-азой, привлекается к мембране эндосом/фагосом взаимодействием с полиубиквитинированными МР [51]. Альтернативным механизмом выхода АГ из эндосом в цитозоль может быть простая дестабилизация мембраны эндосомы активными формами кислорода, которые эффективно продуцируются в эндоцитозных компартментах ДК [52].

После выхода в цитозоль АГ подвергаются протеасомному процессингу с участием как стандартной протеасомы, так и иммунопротеасомы [53, 54]. Антигенные пептиды, генерируемые протеасомой и/или иммунопротеасомой, транспортируются в просвет ЭПР с помощью белков ТАР, где гидролизуются терминальной аминопептидазой ERAP1 до пептидов подходящей длины для нагрузки молекул МНС I и дальнейшей кросс-презентации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам.

### **Кросс-дрессинг ДК**

Помимо прямой презентации и кросс-презентации экзогенных АГ, существует дополнительный механизм презентации АГ, называемый кросс-дрессингом, когда ДК захватывают готовые комплексы МНС I/антигенный пептид из мертвых опухолевых клеток. Кросс-дрессинг опосредуется секретруемыми экзосомами, а также трофоцитозом – процессом, в результате которого происходит обмен участками клеточных мембран и мембранных белков между клетками. Это позволяет ДК презентировать непосредственно захваченные АГ без дальнейшего процессинга. В отличие от кросс-презентации АГ, при которой активируются CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, направленные на пептиды, процессированные ДК, кросс-дрессинг способствует активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, специфичных к пептидам, генерированным самой опухолевой клеткой, что может усиливать антигенную специфичность противоопухолевого иммунного ответа. В кросс-дрессинге способны принимать участие CD8<sup>α</sup><sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup> ДК, активированные и наивные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты и CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти [55–57].

### **Индукция функции кросс-презентации ДК**

Функция кросс-презентации приобретает на последнем этапе созревания ДК при стимуляции микробными продуктами, например TLR-лигандами, или такими цитокинами, как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ). Поэтому эффективная кросс-презентация характерна для субпопуляций периферических ДК при воспалении и инфекции.

CD8<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> ДК, выделенные из селезенки нормальной мыши, были малоэффективными в кросс-презентации АГ с помощью молекул МНС I в среде в отсутствие лигандов TLR и цитокинов, но эффективно презентировали АГ с помощью молекул МНС II [58]. Для запуска кросс-презентации требовались дополнительные активационные факторы, что указывает на регулируемость этого свойства CD8<sup>+</sup> ДК.

TLR-лиганды не только активируют созревание CD8<sup>+</sup> ДК, но и способствуют увеличению уровня ко-стимулирующих и адгезионных молекул на их по-



верхности, а также могут влиять на процессинг АГ CD8<sup>+</sup> ДК и усиливать кросс-презентацию АГ [58].

Помимо таких микробных продуктов, как TLR-лиганды, функция кросс-презентации у ранних предшественников CD8<sup>+</sup> ДК может индуцироваться ГМ-КСФ. В нормальном состоянии ГМ-КСФ продуцируется на низком уровне, но при инфекции или воспалении его продукция резко возрастает. Индукция функции кросс-презентации ДК под действием ГМ-КСФ не сопровождается увеличением экспрессии стандартных маркеров активации ДК – МНС II, CD80, CD86 или CD40, однако повышается экспрессия ключевого маркера мигрирующих ДК – CD103.

Механизм индукции кросс-презентации у CD8<sup>+</sup> ДК под действием этих факторов не до конца ясен, по-видимому, он может заключаться в усилении протеасомной активности ДК, индукции транспорта белков ТАР к ранним эндосомам или усилении транспорта АГ из ранних эндосом в цитозоль [58].

При отсутствии «сигналов опасности» в нормальном состоянии кросс-презентация является важным механизмом индукции и поддержания толерантности, направленной на собственные АГ. Так, CD8<sup>+</sup> ДК тимуса обладают способностью к кросс-презентации в нормальных условиях и участвуют в уничтожении развивающихся аутореактивных Т-клеток [58].

### Презентация липидных антигенов ДК с помощью молекул CD1

Презентация липидных АГ с помощью молекул CD1 представляет путь стимуляции Т-лимфоцитов, не зависящий от МНС I и II. По своему строению белки CD1 похожи на МНС I, поскольку представляют собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи CD1, нековалентно связанной с β2-микроглобулином. ДК человека экспрессируют пять белков CD1: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d и CD1e, тогда как у мыши на ДК экспрессируется всего лишь один белок – CD1d. Строение и функции данных белков имеют некоторые отличия, однако их общая главная функция – презентировать антигены липидной природы Т-лимфоцитам [59].

С участием CD1a, CD1b, CD1c и, возможно, CD1d происходит презентация Т-лимфоцитам микробных липидных и липопептидных антигенов, таких, как миколовая кислота, фосфатидилинозитолманнозид, липоарабиноманнан, дидегидрокси микобактин и др. Кроме того, CD1d, а в некоторых случаях и CD1a, CD1b, CD1c способны представлять собственные липидные антигены. Т-лимфоциты опознают комплексы CD1–антиген с помощью Т-клеточных рецепторов (TCR), практически не отличающихся по своему строению от TCR, взаимодей-

ствующих с комплексами МНС–антиген. Отобранные с помощью CD1 TCR, распознающие чужеродные антигены, способны различать даже небольшие изменения в структуре гидрофильной группы липидного антигена [59].

Полученные таким образом Т-лимфоциты принимают участие в иммунных реакциях против бактериальных (*Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Borrelia burgdorferi* и др.), паразитарных (*Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma gondii* и др.), вирусных (вирус простого герпеса типа 1 и 2, вирус Коксаки В3, вирус гепатита В и др.) и грибковых (*Cryptococcus neoformans*) инфекций [59].

### Уход опухоли от иммунного надзора путем подавления функций ДК

Известно, что многие виды опухолей содержат функционально аномальные ДК [60–62]. Более того, прямое подавление пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов опухолью или опухолевым окружением и подавление дифференцировки ДК считаются важным механизмом ухода опухоли от действия иммунной системы. В этой части обзора рассмотрено неблагоприятное действие опухоли и ее окружения на функциональную активность ДК, приводящее к подавлению специфической активации эффекторных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

### Опухолевая строма

Важным компонентом, обеспечивающим сопротивление опухоли иммунной системе, является опухолевая строма. Строма состоит из фибробластов, эндотелиальных клеток, а также компонентов внеклеточного матрикса и воспалительного инфильтрата, локализующегося внутри опухолевой стромы, в состав которого входят, в частности, спинномозговые супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и опухолеспецифические макрофаги (ТАМ) [63, 64]. Клетки стромы продуцируют множество факторов, включая цитокины, хемокины, факторы роста, гормоны, простагландины, соли молочной кислоты и ганглиозиды, способствующих подавлению опосредованного ДК ответа эффекторных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток и индукции Treg [65, 66]. Кроме того, описаны прямые химические или ферментативные взаимодействия между продуктами лейкоцитов и клонами опухолеспецифических Т-лимфоцитов, как, например, нитротирозилирование Т-клеточных рецепторов и молекул CD8, что приводит к ослаблению противоопухолевых функций Т-лимфоцитов [67].

### Механизмы подавления функций ДК опухолью

Существует несколько механизмов подавления или даже «выключения» функций ДК опухолью. Во-

первых, опухоль может препятствовать проникновению (инфильтрации) ДК и преДК в опухолевую ткань. Однако, согласно некоторым данным, большинство опухолей инфильтрованы даже большим количеством ДК, чем нормальные ткани [68, 69]. Это объясняется тем, что опухолевые клетки могут продуцировать такие хемокины, как MIP-3 $\alpha$ , «выборочно хемотаксичные» именно для незрелых ДК, экспрессирующих рецептор CCR6 к MIP-3 $\alpha$  [69].

Во-вторых, опухоль может подавлять созревание инфильтрирующих незрелых ДК, что может привести к развитию Т-клеточной толерантности. Действительно, в лейкоцитарном инфильтрате опухолей определенного типа обнаружено повышение экспрессии костимулирующих молекул макрофагами и ДК, однако способность таких ДК презентировать АГ значительно ослаблена [61, 70].

В-третьих, фагоцитоз и процессинг в ДК растворимых опухолевых АГ могут быть подавлены или полностью заблокированы. Так в ДК, полученных от больных раком почки, наблюдалось снижение эффективности поглощения АГ [68]. Ингибирование фагоцитоза ДК часто связывают с секрецией фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), одного из важнейших иммуносупрессорных цитокинов, продуцируемых опухолью [71]. В нескольких работах показана взаимосвязь между повышенным уровнем VEGF в сыворотке онкологических больных и количеством и функциональностью циркулирующих ДК [72, 73]. Установлено, что блокада VEGF приводит к увеличению захвата АГ и миграционной способности опухолеспецифических ДК [71].

В-четвертых, может быть снижена миграционная активность ДК, что рассматривается как еще один механизм ухода опухоли от иммунного ответа [66]. Действительно, такие цитокины и ростовые факторы, как IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF [61], также хорошо сверхэкспрессируются в опухолевой ткани, как факторы-хемоаттрактанты MIP-3 $\alpha$ /CCL20 [69]. С другой стороны, в опухолевой ткани представлены такие факторы, как например, ганглиозиды, ингибирующие миграцию ДК. Оба механизма могут регулировать рекрутирование и миграцию ДК в опухолевое окружение.

В-пятых, на подавление функций ДК и прогрессию опухоли влияет воспаление, часто сопровождающее злокачественные новообразования [74]. Медиаторы воспаления могут вырабатываться как самими опухолевыми клетками, так и клетками предопухолевой стромы, в состав которой входят различные популяции лейкоцитов, в частности, супрессорные клетки миелоидного происхождения [63] и опухолеспецифические макрофаги [64]. Медиаторы воспаления могут вызывать лейкопению и влиять на ангиогенез, а так-

же на выживаемость опухолевых клеток, их подвижность и хемотаксис [75].

Сверхэкспрессия белка STAT3 опухолевыми клетками влияет на экспрессию нескольких иммуносупрессорных цитокинов, включая IL-10 и TGF- $\beta$ , супрессирует Th1-ответ, снижает экспрессию костимулирующих молекул и молекул МНС II, активирует экспрессию TGF- $\beta$  в ДК. Опухолевая прогрессия также коррелирует с накоплением незрелых ДК, которые индуцируют пролиферацию Treg в инфильтрированных опухолью лимфоузлах.

В-шестых, показана роль экзосом, секретируемых опухолевыми клетками, с помощью которых опосредуются разнообразные эффекты на иммунокомпетентные клетки, в том числе и на ДК [76, 77]. Экзосомы опухолевых клеток способны подавлять иммунную систему с помощью нескольких механизмов, включая снижение количества ДК и подавление их функций, ослабление пролиферации и цитотоксичности натуральных киллеров и Т-лимфоцитов, а также увеличение количества иммуносупрессорных клеток (MDSC и Treg) [76, 77].

Воздействуя на ДК, опухолевые экзосомы способствуют усилению фосфорилирования STAT3 и экспрессии IL-6 и снижают таким образом как активность, так и количество ДК путем ингибирования дифференцировки CD14<sup>+</sup> моноцитов в незрелые ДК. Более того, в этом случае CD14<sup>+</sup> клетки дифференцируются в HLA-DR<sup>-low</sup> клетки, синтезирующие TGF- $\beta$ , который ингибирует функции Т-лимфоцитов [76].

### **Роль опухолевого окружения в подавлении функций ДК**

*Цитокины и ростовые факторы при опухолевой прогрессии.* Макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-KCF) и IL-6 – важные факторы, вовлеченные в дифференцировку моноцитов [78, 79] и подавляющие дифференцировку ДК [80] путем увеличения экспрессии рецепторов к M-KCF параллельно со снижением количества  $\alpha$ -рецепторов к GM-KCF в преДК. Подобные явления характерны и для IL-10, продуцируемого клетками опухолей [81, 82]. *In vitro* IL-10 ингибирует дифференцировку, созревание и функциональную активность ДК [83–85], переключая дифференцировку в макрофагальную сторону [86].

Другим фактором роста, секретируемым множеством опухолей в условиях гипоксии, является VEGF. Уровень VEGF как в сыворотке крови, так и в опухолевой ткани коррелирует с опухолевой прогрессией [87, 88]. Показано, что *in vitro* VEGF ингибирует развитие ДК из CD34<sup>+</sup> предшественников [89]. Более

того, после воздействия VEGF в ДК снижена продукция IL-12, а также способность стимулировать аллогенные Т-клетки [90]. VEGF ингибирует развитие ДК, увеличивая количество незрелых миелоидных клеток [91].

**Влияние гипоксии при опухолевой прогрессии на функции ДК.** Для микроокружения опухоли характерно низкое содержание кислорода (гипоксия), обусловленное сниженной микроциркуляцией крови в опухолевой ткани [92]. Гипоксия опухоли связана с опухолевой прогрессией, устойчивостью к радио- и химиотерапии [93], а также с изменениями фенотипа макрофагов [94, 95]. В условиях гипоксии ДК имеют нормальный уровень экспрессии поверхностных маркеров и цитокинов, но их миграционная активность подавлена [96, 97]. Физиологический ответ на гипоксию обусловлен действием фактора HIF (hypoxia induced factor), индуцируемый в клетке в условиях гипоксии [98, 99]. К генам-мишеням HIF относятся гены, кодирующие VEGF-A, Glut-1 (переносчик глюкозы 1) и LDH (лактатдегидрогеназа) [100]. Изоформа LDH-5 лактатдегидрогеназы, трансформирующая молочную кислоту в пируват с самой медленной скоростью среди ферментов своего типа, не только сверхэкспрессируется во множестве опухолей, но также связана с агрессивным фенотипом опухолевых клеток [101]. Высокая экспрессия этого изофермента приводит к накоплению молочной кислоты в опухолевых клетках и микроокружении.

**Влияние измененного метаболизма опухолевых клеток на функции ДК.** Хорошо известно, что метаболизм опухолевых клеток отличается от метаболизма нормальных клеток. Опухолевые клетки производят энергию преимущественно с помощью очень активного гликолиза с последующим образованием молочной кислоты, а не посредством медленного гликолиза и окисления пирувата в митохондриях с использованием кислорода как в большинстве нормальных клеток. Этот феномен, названный «аэробным гликолизом», или «эффектом Варбурга» (впервые описан Отто Варбургом), ведет к увеличению продукции молочной кислоты [102].

В опухолях с высоким уровнем молочной кислоты уровень лактатдегидрогеназы повышен по сравнению с нормальной тканью [103], в некоторых опухолях детектируется даже изофермент LDH-5 [101, 104]. При немелкоклеточном раке легкого или аденокарциноме кишечника подобную сверхэкспрессию связывают с неблагоприятным прогнозом [101, 104]. В 60–75% случаев рака кишечника высокая экспрессия LDH-5 строго коррелирует с высокой экспрес-

сией VEGF-R2 (KDR/Flk-1) [105]. Молочная кислота является важным фактором, влияющим на ДК, который может способствовать уходу опухоли от иммунного ответа.

Молочная кислота оказывает как негативное, так и положительное влияние на формирование Т-клеточного иммунного ответа [106, 107]. Натриевая соль молочной кислоты и метаболиты глюкозы подавляют фенотипическое и функциональное созревание ДК, что коррелирует с подавлением активации NF-κB [108]. Под действием молочной кислоты изменяется экспрессия АГ в человеческих ДК моноцитарного происхождения и снижается секреторный потенциал ДК [109]. Молочная кислота может также прямо ингибировать CD8<sup>+</sup> Т-клетки [110]. Внеклеточный ацидоз приводит к накоплению молочной кислоты в опухолевой ткани. В нескольких работах описано неблагоприятное воздействие кислых значений pH на функции Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [111–113]. Хотя некоторые исследователи отмечали улучшение захвата АГ ДК мыши при ацидозе, а также повышение эффективности индукции специфических ЦТЛ [114].

Помимо молочной кислоты на функции ДК способны влиять и другие метаболиты опухолевых клеток. Синтез метаболитов арахидоновой кислоты (простаноидов), включая простагландин и тромбоксан, катализируется циклооксигеназами-1 и -2 (COX-1/2) [115]. Экспрессия циклооксигеназ изменена во многих видах опухолей, таких, как рак толстой кишки, молочной железы, легкого и яичников, а также меланомы [116–118]. Экспрессия COX-2 обнаружена в опухолевых клетках и в клетках опухолевой стромы [115]. Помимо прямого влияния на рост опухоли, апоптоз, межклеточные взаимодействия и ангиогенез, простаноиды подавляют противоопухолевый иммунный ответ организма [118], в частности, за счет ингибирования дифференцировки и функции ДК. Так Sombroek С.С. и соавт. обнаружили ингибирующий эффект простаноидов и IL-6 на дифференцировку ДК из CD34<sup>+</sup> предшественников и моноцитов [119].

Ганглиозиды – производные липидов, синтезируемые опухолевыми клетками, также подавляют противоопухолевый иммунный ответ [120–122], ингибируя дифференцировку гемопоэтических клеток [120]. Некоторые типы опухолей (нейробластома, ретинобластома, меланомы, рак печени и толстого кишечника), а также лимфомы характеризуются аномальным составом ганглиозидов [123, 124], что может быть связано с гипоксией [125]. Ганглиозиды ухудшают созревание и миграционную активность клеток Лангерганса [126], ингибируют дифференцировку, созревание и функции ДК [127].



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопленные за последние десятилетия знания о происхождении и функционировании дендритных клеток позволили разработать принципы онкоиммунологии, основанные на привлечении собственных иммунных клеток организма для противостояния злокачественным заболеваниям. Однако при многих видах опухолей наблюдали подавление самого важного звена иммунной системы, иницирующего развитие специфического противоопухолевого ответа, – дендритных клеток. Подобное избегание иммунного надзора приводило к ослаблению компонентов врожденного иммунитета, таких, как макрофаги, так и специфического иммунитета – Т-клеточных звеньев. В связи с этим становится очевидным,

что при разработке противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток большое внимание следует уделять их активации/созреванию; типу опухолеспецифического антигена, используемого для нагрузки дендритных клеток; дополнительным конструкциям, кодирующим костимулирующие молекулы, для повышения эффективности презентации опухолевого антигена; методам доставки антигена в дендритные клетки, обеспечивающим максимальный уровень процессинга и презентации антигена в комплексах с МНС I и МНС II. Решение этих задач поможет создать протоколы получения дендритно-клеточных вакцин для эффективного лечения пациентов с опухолями различного происхождения. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Palucka K., Ueno H., Fay J., Banchereau J. // *J. Intern. Med.* 2011. V. 269. P. 64–73.
- Greenberg S., Grinstein S. // *Curr. Opin. Immunol.* 2002. V. 14. P. 136–145.
- Ярилин А.А. Основы иммунологии: Учебник. М.: Медицина, 1999. С. 608.
- Figdor C.G., van Kooyk Y., Adema G.J. // *Nat. Rev. Immunol.* 2002. V. 2. P. 77–84.
- Fong L., Engleman E.G. // *Annu. Rev. Immunol.* 2000. V. 18. P. 245–273.
- Massard G., Tongio M.M., Wihlm J.M., Morand J. // *Ann. Thorac. Surgeon.* 1996. V. 61. P. 252–258.
- Nussenzweig M.C., Steinman R.M., Gutchinov B., Cohn Z.A. // *J. Exp. Med.* 1980. V. 152. P. 1070–1084.
- Jung S., Unutmaz D., Wong P., Sano G., De los Santos K., Sparwasser T., Wu S., Vuthoori S., Ko K., Zavala F., et al. // *Immunity.* 2002. V. 17. P. 211–220.
- Heath W.R., Belz G.T., Behrens G.M., Smith C.M., Forehan S.P., Parish I.A., Davey G.M., Wilson N.S., Carbone F.R., Villadangos J.A. // *Immunol. Rev.* 2004. V. 199. P. 9–26.
- Bonaccorsi I., Pezzino G., Morandi B., Ferlazzo G. // *Immunol. Lett.* 2013. V. 155. P. 6–10.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K. // *Annu. Rev. Immunol.* 2000. V. 18. P. 767–811.
- Gogolák P., Réthi B., Hajas G., Rajnavölgyi E. // *J. Mol. Recognit.* 2003. V. 16. P. 299–317.
- Palucka K., Banchereau J. // *Nat. Rev. Cancer.* 2012. V. 12. P. 265–277.
- Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A. // *Annu. Rev. Immunol.* 2013. V. 31. P. 563–604.
- Ueno H., Schmitt N., Klechevsky E., Pedroza-Gonzalez A., Matsui T., Zurawski G., Oh S., Fay J., Pascual V., Banchereau J., et al. // *Immunol. Rev.* 2010. V. 234. P. 199–212.
- Helft J., Ginhoux F., Bogunovic M., Merad M. // *Immunol. Rev.* 2010. V. 234. P. 55–75.
- Manz M.G., Traver D., Akashi K., Merad M., Miyamoto T., Engleman E.G., Weissman I.L. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001. V. 938. P. 167–174.
- Traver D., Akashi K., Manz M., Merad M., Miyamoto T., Engleman E.G., Weissman I.L. // *Science.* 2000. V. 290. P. 2152–2154.
- Diao J., Winter E., Cantin C., Chen W., Xu L., Kelvin D., Phillips J., Catral M.S. // *J. Immunol.* 2006. V. 176. P. 7196–7206.
- Ginhoux F., Liu K., Helft J., Bogunovic M., Greter M., Hashimoto D., Price J., Yin N., Bromberg J., Lira S.A., Stanley E.R., Nussenzweig M., Merad M. // *J. Exp. Med.* 2009. V. 206. P. 3115–3130.
- Chorro L., Sarde A., Li M., Woollard K.J., Chambon P., Malissen B., Kissenpfennig A., Barbaroux J.B., Groves R., Geissmann F. // *J. Exp. Med.* 2009. V. 206. P. 3089–3100.
- Ginhoux F., Tacke F., Angeli V., Bogunovic M., Loubreau M., Dai X.M., Stanley E.R., Randolph G.J., Merad M. // *Nat. Immunol.* 2006. V. 7. P. 265–273.
- O’Keefe M., Hochrein H., Vremec D., Caminschi I., Miller J.L., Anders E.M., Wu L., Lahoud M.H., Henri S., Scott B., et al. // *J. Exp. Med.* 2002. V. 196. P. 1207–1319.
- Nakano H., Yanagita M., Gunn M.D. // *J. Exp. Med.* 2001. V. 194. P. 1171–1178.
- Shortman K., Liu Y.J. // *Nat. Rev. Immunol.* 2002. V. 2. P. 151–161.
- Reizis B., Bunin A., Ghosh H.S., Lewis K.L., Sisirak V. // *Annu. Rev. Immunol.* 2011. V. 29. P. 163–183.
- Van Lint S., Renmans D., Broos K., Dewitte H., Lentacker I., Heirman C., Breckpot K., Thielemans K. // *Expert Rev. Vaccines.* 2015. V. 14. P. 235–251.
- Hanabuchi S., Liu Y.-J. // *Immunity.* 2011. V. 35. P. 851–853.
- Takagi H., Fukaya T., Eizumi K., Sato Y., Sato K., Shibazaki A., Otsuka H., Hijikata A., Watanabe T., Ohara O., et al. // *Immunity.* 2011. V. 35. P. 958–971.
- Tel J., de Vries I.J. // *Immunotherapy.* 2012. V. 4. P. 979–982.
- Pinto A., Rega A., Crother T.R., Sorrentino R. // *Oncoimmunology.* 2012. V. 1. P. 726–734.
- Joffre O.P., Segura E., Savina A., Amigorena S. // *Nat. Rev. Immunol.* 2012. V. 12. P. 557–569.
- Dudziak D., Kamphorst A.O., Heidkamp G.F., Buchholz V.R., Trumpfheller C., Yamazaki S., Cheong C., Liu K., Lee H.W., Park C.G., et al. // *Science.* 2007. V. 315. P. 107–111.
- Valladeau J., Saeland S. // *Semin. Immunol.* 2005. V. 17. P. 273–283.
- Merad M., Ginhoux F., Collin M. // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. V. 8. P. 935–947.
- Vremec D., Zorbas M., Scollay R., Saunders D.J., Ardavin C.F., Wu L., Shortman K. // *J. Exp. Med.* 1992. V. 176. P. 47–58.

37. Nestle F.O., Zheng X.G., Thompson C.B., Turka L.A., Nickoloff B.J. // *J. Immunol.* 1993. V. 151. P. 6535–6545.
38. Haniffa M., Shin A., Bigley V., McGovern N., Teo P., See P., Wasan P.S., Wang X.N., Malinarich F., Malleret B., et al. // *Immunity.* 2012. V. 37. P. 60–73.
39. Segura E., Valladeau-Guilemond J., Donnadiou M.H., Sastre-Garau X., Soumelis V., Amigorena S. // *J. Exp. Med.* 2012. V. 209. P. 653–660.
40. Cintolo J.A., Datta J., Mathew S.J., Czerniecki B.J. // *Future Oncol.* 2012. V. 8. P. 1273–1299.
41. Neefjes J., Jongsma M.L., Paul P., Bakke O. // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. V. 11. P. 823–836.
42. Delamarre L., Pack M., Chang H., Mellman I., Trombetta E.S. // *Science.* 2005. V. 307. P. 1630–1634.
43. Rock K.L., Goldberg A.L. // *Annu. Rev. Immunol.* 1999. V. 17. P. 739–779.
44. Koopmann J.O., Albring J., Hüter E., Bulbuc N., Spee P., Neefjes J., Hämmerling G.J., Momburg F. // *Immunity.* 2000. V. 13. P. 117–127.
45. Basha G., Omilusik K., Chavez-Steenbock A., Reinicke A.T., Lack N., Choi K.B., Jefferies W.A. // *Nat. Immunol.* 2012. V. 13. P. 237–245.
46. Rock K.L., Farfan-Arribas D.J., Shen L. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. P. 9–15.
47. Weimershaus M., Maschalidi S., Sepulveda F., Manoury B., van Endert P., Saveanu L. // *J. Immunol.* 2012. V. 188. P. 1840–1846.
48. Saveanu L., Carroll O., Weimershaus M., Guermonprez P., Firat E., Lindo V., Greer F., Davoust J., Kratzer R., Keller S.R., et al. // *Science.* 2009. V. 325. P. 213–217.
49. Kovacovics-Bankowski M., Rock K.L. // *Science.* 1995. V. 267. P. 243–246.
50. Ackerman A.L., Giodini A., Cresswell P. // *Immunity.* 2006. V. 25. P. 607–617.
51. Zehner M., Chasan A.I., Schuette V., Embgenbroich M., Quast T., Kolanus W., Burgdorf S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 9933–9938.
52. Boya P., Kroemer G. // *Oncogene.* 2008. V. 27. P. 6434–6451.
53. Chapatte L., Ayyoub M., Morel S., Peitrequin A.L., Lévy N., Servis C., van den Eynde B.J., Valmori D., Lévy F. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 5461–5468.
54. Angeles A., Fung G., Luo H. // *Front. Biosci.* 2012. V. 17. P. 1904–1916.
55. Yewdell J.W., Dolan B.P. // *Nature.* 2011. V. 471. P. 581–582.
56. Dolan B.P., Gibbs K.D.Jr., Ostrand-Rosenberg S. // *J. Immunol.* 2006. V. 177. P. 6018–6024.
57. Li L., Kim S., Herndon J.M., Goedegebuure P., Belt B.A., Satpathy A.T., Fleming T.P., Hansen T.H., Murphy K.M., Gillanders W.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 12716–12721.
58. Dresch C., Leverrier Y., Marvel J., Shortman K. // *Trends Immunol.* 2012. V. 33. P. 381–388.
59. Brigl M., Brenner M.B. // *Annu. Rev. Immunol.* 2004. V. 22. P. 817–890.
60. Pinzon-Charry A., Maxwell T., Lopez J.A. // *Immunol. Cell Biol.* 2005. V. 83. P. 451–461.
61. Shurin M.R., Shurin G.V., Lokshin A., Yurkovetsky Z.R., Gutkin D.W., Chatta G., Zhong H., Han B., Ferris R.L. // *Cancer Metastasis Rev.* 2006. V. 25. P. 333–356.
62. Kusmartsev S., Gabrilovich D.I. // *Cancer Metastasis Rev.* 2006. V. 25. P. 323–331.
63. Marigo I., Dolcetti L., Sefarini P., Zanovello P., Bronte V. // *Immunol. Rev.* 2008. V. 222. P. 162–179.
64. Sica A., Bronte V. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. P. 1155–1166.
65. Töpfer K., Kempe S., Müller N., Schmitz M., Bachmann M., Cartellieri M., Schackert G., Temme A. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. V. 2011. P. 918471.
66. Benencia F., Sprague L., McGinty J., Pate M., Muccioli M. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. V. 2012. P. 425476.
67. Nagaraj S., Gabrilovich D.I. // *Cancer Res.* 2008. V. 6. P. 82561–82563.
68. Thurnher M., Radmayr C., Ramoner R., Ebner S., Böck G., Klocker H., Romani N., Bartsch G. // *Int. J. Cancer.* 1996. V. 68. P. 1–7.
69. Bell D., Chomarar P., Broyles D., Netto G., Harb G.M., Lebecque S., Valladeau J., Davoust J., Palucka K.A., Banchereau J. // *J. Exp. Med.* 1999. V. 190. P. 1417–1426.
70. Chaux P., Moutet M., Favre J., Martin F., Martin M. // *Lab. Invest.* 1996. V. 74. P. 975–983.
71. Ishida T., Oyama T., Carbone D.P., Gabrilovich D.I. // *J. Immunol.* 1998. V. 161. P. 4842–4852.
72. Almand B., Resser J.R., Lindman B., Nadaf S., Clark J.I., Kwon E.D., Carbone D.P., Gabrilovich D.I. // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. P. 1755–1766.
73. Lissoni P., Malugani F., Bonfanti A., Bucovec R., Secondino S., Brivio F., Ferrari-Bravo A., Ferrante R., Vigoré L., Rovelli F., et al. // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2001. V. 15. P. 140–144.
74. Mantovani A., Pierotti M.A. // *Cancer Lett.* 2008. V. 267. P. 180–181.
75. Borello M.G., Degl'innocenti D., Pierotti M.A. // *Cancer Lett.* 2008. V. 267. P. 262–270.
76. Zhang H.G., Grizzle W.E. // *Am. J. Pathol.* 2014. V. 184. P. 28–41.
77. Kharaziha P., Ceder S., Li Q., Panaretakis T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1826. P. 103–111.
78. Stanley E.R., Berg K.L., Einstein D.B., Lee P.S., Pixley F.J., Wang Y., Yeung Y.G. // *Mol. Reprod. Dev.* 1997. V. 46. P. 4–10.
79. Jansen J.H., Kluin-Nelemans J.C., Van Damme J., Wientjens G.J., Willemze R., Fibbe W.E. // *J. Exp. Med.* 1992. V. 175. P. 1151–1154.
80. Menetrier-Caux C., Montmain G., Dieu M.C., Bain C., Favrot M.C., Caux C., Blay J.Y. // *Blood.* 1998. V. 92. P. 4778–4791.
81. Smith D.R., Kunkel S.L., Burdick M.D., Wilke C.A., Orringer M.B., Whyte R.I., Strieter R.M. // *Am. J. Pathol.* 1994. V. 145. P. 18–25.
82. Krüger-Krasagakes S., Krasagakis K., Garbe C., Schmitt E., Huls C., Blankenstein T., Diamantstein T. // *Br. J. Cancer.* 1994. V. 70. P. 1182–1185.
83. Steinbrink K., Wöfl M., Jonuleit H., Knop J., Enk A.H. // *J. Immunol.* 1997. V. 159. P. 4772–4780.
84. Buelens C., Verhasselt V., De Groote D., Thielemans K., Goldman M., Willems F. // *Eur. J. Immunol.* 1997. V. 27. P. 756–762.
85. Enk A.H., Angeloni V.L., Udey V.C., Katz S.I. // *J. Immunol.* 1993. V. 151. P. 2390–2398.
86. Allavena P., Piemonti L., Longoni D., Bernasconi S., Stoppacciaro A., Ruco L., Mantovani A. // *Eur. J. Immunol.* 1998. V. 28. P. 359–369.
87. Yamamoto Y., Toi M., Kondo S., Matsumoto T., Suzuki H., Kitamura M., Tsuruta K., Taniguchi T., Okamoto A., Mori T., et al. // *Clin. Cancer Res.* 1996. V. 2. P. 821–826.
88. Toi M., Matsumoto T., Bando H. // *Lancet Oncol.* 2001. V. 2. P. 667–673.
89. Gabrilovich D.I., Chen H.L., Girgis K.R., Cunningham H.T., Meny G.M., Nadaf S., Kavanaugh D., Carbone D.P. // *Nat. Med.* 1996. V. 2. P. 1096–1103.
90. Takahashi A., Kono K., Ichihara F., Sugai H., Fujii H., Matsumoto Y. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2004. V. 53. P. 543–550.

91. Gabrilovich D.I., Ishida T., Oyama T., Ran S., Kravtsov V., Nadaf S., Carbone D.P. // *Blood*. 1998. V. 92. P. 4150–4166.
92. Groebe K., Vapuel P. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1998. V. 15. P. 691–697.
93. Teicher B.A. // *Cancer Metastasis Rev.* 1994. V. 13. P. 139–168.
94. Turner L., Scotton C., Negus R., Balkwill F. // *Eur. J. Immunol.* 1999. V. 29. P. 2280–2287.
95. Lewis J.S., Lee J.A., Underwood J.C., Harris A.L., Lewis C.E. // *J. Leukoc. Biol.* 1999. V. 66. P. 889–900.
96. Zhao W., Darmanin S., Fu Q., Chen J., Cui H., Wang J., Okada F., Hamada J., Hattori Y., Kondo T., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. P. 3468–3477.
97. Qu X., Yang M.X., Kong B.H., Qi L., Lam Q.L., Yan S., Li P., Zhang M., Lu L. // *Immunol. Cell. Biol.* 2005. V. 83. P. 668–673.
98. Semenza G.L., Wang G.L. // *Mol. Cell. Biol.* 1992. V. 12. P. 5447–5454.
99. Semenza G.L. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998. V. 8. P. 588–594.
100. Wenger R.H., Stiehl D.P., Camenisch G. // *Sci. STKE*. 2005. V. 2005. P. re12.
101. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Simopoulos C., Polychronidis A., Sivridis E. // *Clin. Exp. Metastasis*. 2005. V. 22. P. 25–30.
102. Warburg O. // *Munch. Med. Wochenschr.* 1961. V. 103. P. 2504–2506.
103. Walenta S., Schroeder T., Mueller-Klieser W. // *Cyrr. Med. Chem.* 2004. V. 11. P. 2195–2204.
104. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Sivridis E., Bougioukas G., Didilis V., Gatter K.C., Harris A.L., Tumour and Angiogenesis Research Group. // *Br. J. Cancer*. 2003. V. 89. P. 877–885.
105. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Sivridis E., Gatter K.C., Harris A.L. // *J. Clin. Oncol.* 2006. V. 24. P. 4301–4308.
106. Droge W., Roth S., Altmann A., Mihm S. // *Cell Immunol.* 1987. V. 108. P. 405–416.
107. Roth S., Gmunder H., Droge W. // *Cell Immunol.* 1991. V. 136. P. 95–104.
108. Puig-Kroger A., Muniz-Pello O., Selgas R., Criado G., Bajo M.A., Sanchez-Tomero J.A., Alvarez V., del Peso G., Sánchez-Mateos P., Holmes C., et al. // *J. Leukoc. Biol.* 2003. V. 73. P. 482–492.
109. Gottfried E., Kunz-Schughart L.A., Ebner S., Mueller-Klieser W., Hoves S., Andreesen R., Mackensen A., Kreutz M. // *Blood*. 2006. V. 107. P. 2013–2021.
110. Fischer K., Hoffmann P., Voelkl S., Meidenbauer N., Ammer J., Edinger M., Gottfried E., Schwarz S., Rothe G., Hoves S., et al. // *Blood*. 2007. V. 109. P. 2812–2819.
111. Loeffler D.A., Juneau P.L., Heppner G.H. // *Int. J. Cancer*. 1991. V. 48. P. 895–899.
112. Fischer B., Muller B., Fischer K.G., Baur N., Kreutz W. // *Clin. Immunol.* 2000. V. 96. P. 252–263.
113. Muller B., Fischer B., Kreutz W. // *Immunology*. 2000. V. 99. P. 375–384.
114. Vermeulen M., Giordano M., Trevani A.S., Sedlik C., Gamberale R., Fernandes-Calotti P., Salamone G., Raiden S., Sanjurjo J., Geffner J.R. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. P. 3196–3204.
115. Gately S., Li W.W. // *Semin. Oncol.* 2004. V. 31. P. 2–11.
116. Denkert C., Kobel M., Berger S., Siegert A., Leclere A., Trefzer U., Hauptmann S. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 303–308.
117. Denkert C., Kobel M., Pest S., Koch I., Berger S., Schwabe M., Siegert A., Reles A., et al. // *Am. J. Pathol.* 2002. V. 160. P. 893–903.
118. Tsuji S., Tsuji M., Kawano S., Hori M. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2001. V. 20. P. 117–129.
119. Sombroek C.C., Stam A.G., Masterson A.J., Lougheed S.M., Schakel M.J., Meijer C.J., Pinedo H.M., van den Eertwegh A.J., Scheper R.J., de Gruijl T.D. // *J. Immunol.* 2002. V. 168. P. 4333–4343.
120. Sietsma H., Nijhof W., Donje B., Vellenga E., Kamps W.A., Kok J.W. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. P. 4840–4844.
121. Ladisch S., Wu Z.L., Feig S., Ulsh L., Schwartz E., Floutsis G., Wiley F., Lenarsky C., Seeger R. // *Int. J. Cancer*. 1987. V. 39. P. 73–76.
122. Biswas K., Richmond A., Rayman P., Biswas S., Thornton M., Sa G., Das T., Zhang R., Chahlavi A., Tannenbaum C.S., et al. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 6816–6825.
123. Birkle S., Zheng G., Gao L., Yu R.K., Aurby J. // *Biochimie*. 2003. V. 85. P. 455–463.
124. Tourkova I.L., Shurin G.V., Chatta G.S., Perez L., Finke J., Whiteside T.L., Ferrone S., Shurin M.R. // *J. Immunol.* 2005. V. 175. P. 3045–3052.
125. Yin J., Hashimoto A., Izawa M., Miyazaki K., Chen G.Y., Takematsu H., Kozutsumi Y., Suzuki A., Furuhashi K., Cheng F.L., et al. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 2937–2945.
126. Bennaceur K., Popa I., Portoukalian J., Berthier-Vergnes O., Peugeot-Navarro J. // *Int. Immunol.* 2006. V. 18. P. 879–886.
127. Shurin G.V., Shurin M.R., Bykovskaya S., Shogan J., Lotze M.T., Barksdale Jr., E.M. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 363–369.



УДК 576

# Клеточные подходы к лечению инсулинзависимого диабета

М. А. Борисов<sup>1,3</sup>, О. С. Петракова<sup>1,2\*</sup>, И. Г. Гвазава<sup>1,3</sup>, Е. Н. Калистратова<sup>2</sup>, А. В. Васильев<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>3</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

\*E-mail: PetrakovaOl@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.10.2015

Принята к печати 11.03.2016

**РЕФЕРАТ** В настоящее время в мире насчитывается более 350 миллионов больных сахарным диабетом. По данным Всемирной организации здравоохранения в течение ближайших 20 лет этот показатель превысит 500 миллионов. Инсулинзависимый сахарный диабет, или сахарный диабет первого типа, – это эндокринное заболевание, вызванное аутоиммунной реакцией, разрушающей инсулинпродуцирующие  $\beta$ -клетки, расположенные в островках Лангерганса поджелудочной железы, что приводит к нехватке инсулина. Наиболее доступным видом терапии при сахарном диабете остается введение экзогенного инсулина. Это помогает регулировать уровень глюкозы в крови и существенно увеличивает ожидаемую продолжительность жизни пациентов. Однако остаются долгосрочные осложнения, связанные с системным характером болезни и ее влиянием на все виды обмена веществ. Избежать этих осложнений можно при помощи методов, способных обеспечить лучший контроль над уровнем глюкозы в крови. В настоящий момент усилия регенеративной медицины направлены на поиск именно такого метода лечения. В данном обзоре рассмотрена классическая методика трансплантации донорских островков Лангерганса. Описаны также такие новые перспективные методы, как использование плюрипотентных стволовых и коммитированных клеток и клеточное репрограммирование. Обсуждаются молекулярно-генетические механизмы панкреатической дифференцировки. Большое внимание уделяется методам доставки трансплантатов и материалам, используемым для их создания.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дифференцировка, клеточная терапия, поджелудочная железа, сахарный диабет, экспрессия генов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МКМ – межклеточный матрикс; МСК – мезенхимные стволовые клетки; оЛ – островки Лангерганса; ПЖ – поджелудочная железа; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; СД1Т – сахарный диабет первого типа; ЭР – эмбриональное развитие; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Для изучения возможностей дифференцировки клеток *in vitro* в панкреатическом направлении необходимо понимать процесс панкреатического органогенеза. Многочисленные исследования в этой области, проводимые в основном на мышинных моделях, помогли гораздо лучше понять процессы развития и выявить стадии формирования различных органов (таблица).

Поджелудочная железа (ПЖ), в которой происходит синтез и секреция ряда гормонов и ферментов, играет критически важную роль в обмене веществ. В поджелудочной железе выделяют экзо-

кринную и эндокринную части. Экзокринная часть состоит из ацинарных клеток, секретирующих пищеварительные ферменты: амилазы, липазы, протеазы и нуклеазы, которые выводятся в протоки ПЖ, формирующие ветвящуюся структуру, состоящую из эпителиальных клеток [1]. Эндокринные клетки сгруппированы в мельчайшие островки, называемые островками Лангерганса (оЛ), состоящие из клеток пяти подтипов:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  и РР, которые продуцируют гормоны глюкагон, инсулин, соматостатин, грелин и панкреатический полипептид соответственно.

Поджелудочная железа – это производное энтодермы. После закладки энтодерма формирует эмбриональную кишку, которая затем под действием

Временная шкала развития поджелудочной железы человека *in vivo* [6, 7]

Стадия	Стволовая клетка	Энтодерма	Эмбриональная кишка	Панкреатическая энтодерма	Клетка-предшественник	β-клетка
Дни ЭР	6	14	21–28	30–33	45+	55+
Маркеры	Oct4 <sup>+</sup> Sox2 <sup>+</sup>	Sox17 <sup>+</sup> Foxa2 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> Sox7 <sup>-</sup> Pdgfra <sup>-</sup>	Sox17 <sup>+</sup> Foxa2 <sup>+</sup>	Pdx1 <sup>+</sup> Nkx6.1 <sup>+</sup> Ptf1a <sup>+</sup> Ki67 <sup>+</sup> Sox9 <sup>+</sup> Sox17 <sup>-</sup>	Ngn3 <sup>+</sup> Pdx1 <sup>+</sup> Nkx6.1 <sup>+</sup> Ptf1a <sup>-</sup>	Ins <sup>+</sup> Nkx6.1 <sup>+</sup> Mafa <sup>+</sup> Gcg <sup>-</sup> Sox9 <sup>-</sup>

факторов роста, секретируемых соседними тканями, разделяется на отделы. ПЖ формируется из двух листов эпителия дорсально и вентрально от головной кишки, располагаясь между желудком и двенадцатиперстной кишкой [2, 3]. Дорсальный отросток получает сигналы от хорды и спинной аорты [4], вентральный отросток находится под влиянием сигналов прилегающей сердечной мезенхимы и мезодермы боковой пластины [5].

Однако при инъекции факторов роста фибробластов (FGF) и морфогенетического белка кости (BMP) в эмбриональные экспланты энтодермы направление дифференцировки можно изменить с панкреатического на гепатоцитарное. С другой стороны, уменьшение зависимого от белка р300 ацетилирования гистона, ассоциированного с активацией генов, обеспечивает обратный переход к панкреатической дифференцировке [8]. Далее, на 11.5 день ЭР мыши вентральная и дорсальная части увеличиваются в размерах и сливаются в единый орган [9]. В это время пролиферация панкреатического эпителия стимулируется преимущественно мезенхимными клетками, секретирующими факторы роста (12.5 день ЭР мыши) [10]. Дальнейшее развитие ведет к разветвлению эпителиальных протоков. Параллельно этим процессам предшественники эндокринных клеток отслаиваются от эпителия и собираются в оЛ. На стадии 16.5 ЭР появляются моногормональные инсулинсекретирующие клетки, формируются ацинусы [11]. ПЖ взрослого человека содержит примерно 1 млн оЛ [12]. В процессе дифференцировки эндокринной ткани прогениторные клетки оЛ коэкспрессируют различные гормоны. В ходе дальнейшего созревания клетки превращаются в моногормональные [13, 14]. На моделях грызунов показано, что первыми эндокринными клетками являются глюкагонсекретирующие, которые можно обнаружить примерно на 9.5 день эмбрионального развития [15, 16]. С течением времени появляются клетки, коэкспрессирующие инсулин и глюкагон, а отдельные инсулинсекретиру-

ющие β- и глюкагонсекретирующие α-клетки наблюдаются с 14-го дня. Вскоре развиваются соматостатинсекретирующие δ-клетки, а PP-секретирующие клетки можно наблюдать на 18-й день эмбрионального развития [14, 15].

Все эндокринные клетки происходят из прогениторных клеток ПЖ, экспрессирующих Pdx1. В ходе развития ПЖ Pdx1 экспрессируется и эндокринными, и экзокринными прогениторными клетками, но по окончании развития его можно наблюдать только в β- и δ-клетках [16]. Развитие эндокринных клеток регулируется фактором транскрипции Ngn3, ингибирование которого на 11.5 день эмбрионального развития ПЖ приводит к значительному снижению уровня эндокринной дифференцировки [17].

Генетические манипуляции позволили лучше понять функции факторов транскрипции, влияющих на генерацию различных типов эндокринных клеток ПЖ. В число этих факторов входят Sox9, Pdx1, Ngn3, Ia-1, Pax4, Arx, Nkx2.2, Nkx6.1, Nkx6.2, Pax6 и Mafa.

Sox9 экспрессируется в Pdx1<sup>+</sup>-клетках эпителия ПЖ, начиная с 9-го дня ЭР. На 14.5 день ЭР его экспрессия ограничена недифференцированными клетками с низким уровнем Pdx1 и полностью отсутствует в гормонсекретирующих клетках. В постнатальный период Sox9 локализован в центральноацинарных клетках и некоторых эпителиальных клетках протоков [19]. Некоторые наблюдения подтверждают, что Sox9 является маркером прогениторных клеток ПЖ: его экспрессия не меняется у мышей с нокаутом *Ngn3* и *Nkx6.1*. У трансгенных мышей с искусственно поддерживаемыми в прогениторном состоянии клетками-предшественниками экспрессия Sox9 остается аномально стабильной. Sox9 коэкспрессируется с проэндокринным транскрипционным фактором Ngn3 на 15.5 день ЭР, но отсутствует в клетках, экспрессирующих маркеры Nkx2.2 и Isl-1, характерные для зрелых оЛ. Точечная делеция Sox9 в прогениторных клетках Pdx1<sup>+</sup> приводит к снижению количества эндокринных клеток одновременно с преждевремен-

ной дифференцировкой в клетки, экспрессирующие глюкокагон и Isl-1. Таким образом, активность Sox9 необходима для поддержания прогениторных клеток в пролиферативном состоянии и предотвращения их преждевременной дифференцировки [20, 21].

Как и Sox9, Pdx1 экспрессируется на 8.5 сутки ЭР в дорсальной и вентральной энтодерме, за эпителием желудка и двенадцатиперстной кишки. Позднее экспрессия Pdx1 ограничивается  $\beta$ -клетками, в которых он контролирует глюкозозависимую секрецию инсулина [22–24]. Показано, что зрелые панкреатические клетки происходят из прогениторов Pdx1<sup>+</sup> [25]. Это подтверждается панкреатическим агенезом у мышей с дефицитом Pdx1 [26]. Инактивация Pdx1 на различных стадиях развития, а также в зрелых  $\beta$ -клетках показала его необходимость для определения и поддержания фенотипа  $\beta$ -клеток [27, 28]. Более того, установлено [29], что инактивация Pdx1 в  $\beta$ -клетках на поздних стадиях ЭР приводит к уменьшению пролиферации инсулинпродуцирующих клеток с одновременным увеличением ее у глюкокагонпродуцирующих клеток. Эти результаты позволяют предположить, что Pdx1 необходим для возникновения и поддержания  $\beta$ -клеток, а также для регулирования числа эндокринных клеток на поздних стадиях ЭР [29].

В отличие от Pdx1, Ngn3 воздействует только на дифференцировку эндокринной ткани. Он детектируется с 8.5 дня ЭР, достигает максимума на 15.5 день и поддерживается на низком уровне в зрелых эндокринных клетках. Ngn3 необходим для спецификации всех энтероэндокринных и эндокринных линий [25, 30, 31]. Инактивация Ngn3 в зрелых Pdx1<sup>+</sup>-клетках приводит к ухудшению функций оЛ [32], а усиление его экспрессии активирует дифференцировку эндокринных клеток [33, 34]. Эктопическая экспрессия Ngn3 в Pdx1<sup>+</sup>-клетках ведет к преждевременному старту эндокринной дифференцировки, в результате которой образуются только глюкокагонпродуцирующие клетки [35, 36]. Показано, что экспрессия Ngn3 проходит две отдельные временные волны, коррелирующие с первым и вторым переходом, описанными Pictet и соавт., генерируя ранне- и позднеформирующиеся эндокринные клетки с различным потенциалом развития [37, 38]. Ранние Ngn3<sup>+</sup>-клетки, согласно [39], дают начало  $\alpha$ -клеткам. Активация Ngn3 на более поздних стадиях развития индуцирует возникновение  $\beta$ - и PP-клеток после 11.5 дня ЭР и  $\delta$ -клеток после 14.5 дня ЭР, в то время как индукция формирования  $\alpha$ -клеток прогрессивно снижается [39].

Фактор транскрипции Ia-1 является мишенью для Ngn3 и принимает участие в дифференцировке эндокринных клеток. При мутациях по Ia-1 эндо-

кринные клетки наблюдаются, но большая их часть не секретирует гормоны [40]. В отличие от Ngn3, эктопическая экспрессия Ia-1 в протоковых клетках недостаточна для индукции эндокринной дифференцировки. В то же время коэкспрессия Ngn3 и Ia-1 значительно усиливает эффективность индукции эндокринной дифференцировки по сравнению с эктопической экспрессией только Ngn3 [41].

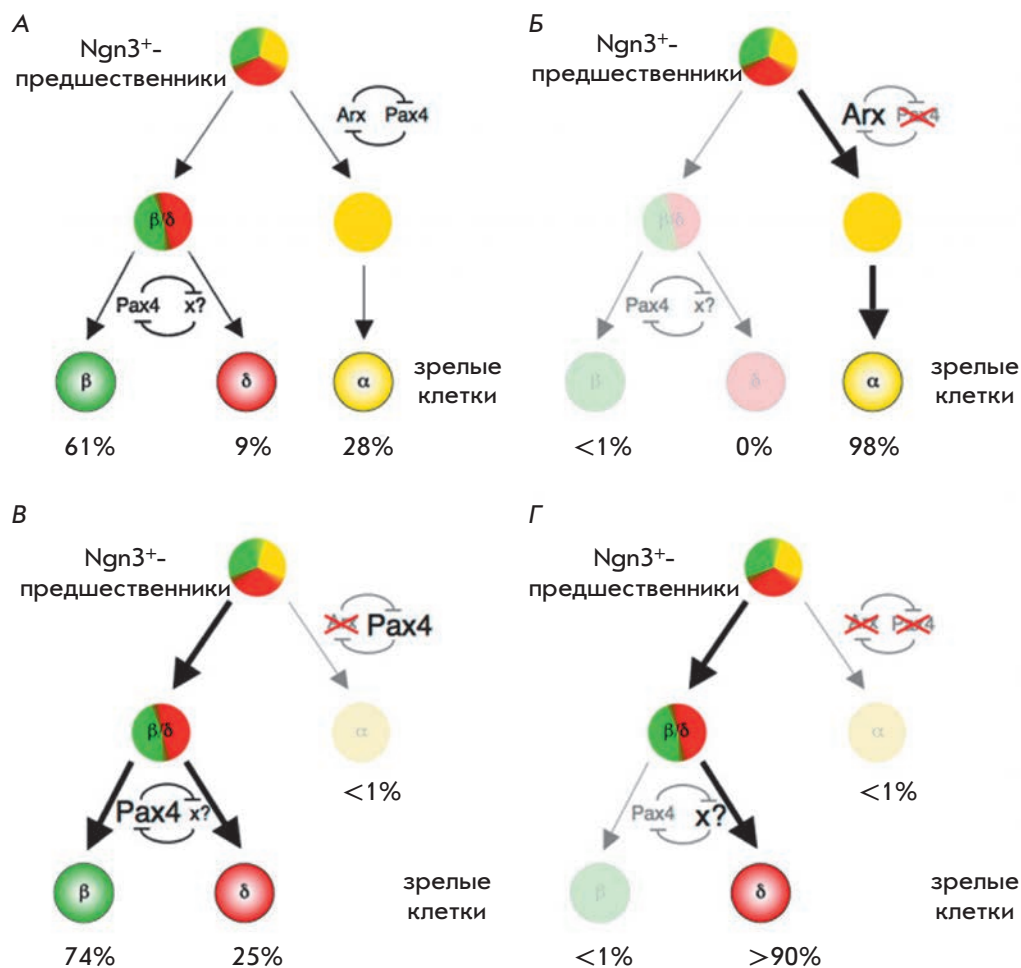
Arx и Pax4 играют ключевые роли в специализации подтипов эндокринных клеток. Arx выступает промотором дифференцировки  $\alpha$ - и PP-клеток, в то время как Pax4 индуцирует  $\beta$ - и  $\delta$ -линии (рис. 1). При дефиците Pax4  $\beta$ - и  $\delta$ -клетки ПЖ не развиваются, при этом увеличивается количество  $\alpha$ -клеток [42]. С другой стороны, потеря Arx ведет к увеличению числа  $\beta$ - и  $\delta$ -клеток с исчезновением  $\alpha$ -популяции [43]. Более тщательный анализ показал антагонизм факторов Arx и Pax4. Одновременный нокаут Pax4 и Arx приводит к исчезновению  $\beta$ - и  $\alpha$ -клеток, увеличению популяции  $\delta$ -клеток, в то время как количество PP-клеток остается неизменным [44]. Из этого был сделан вывод, что Pax4 не входит в число факторов, необходимых для спецификации  $\beta$ -/ $\delta$ -клеток, а, подавляя экспрессию Arx, действует как ингибитор появления  $\alpha$ -клеток.

На ранних стадиях развития Nkx2.2 играет существенную роль в спецификации  $\beta$ -клеток. В то же время в зрелых оЛ Nkx2.2 служит маркером  $\alpha$ -,  $\beta$ - и PP-клеток. У мышей с нокаутом гена *Nkx2.2* наблюдается потеря  $\alpha$ -клеток, а также снижение числа  $\beta$ - и PP-клеток, при том, что количество  $\delta$ -клеток остается неизменным [45, 46].

Nkx6.1, еще один маркер панкреатического эпителия, впервые детектируется на 9.5 день ЭР. Изначально он экспрессируется в Ngn3<sup>+</sup> эндокринных клетках-предшественниках, а в дальнейшем только в зрелых  $\beta$ -клетках, в которых регулирует процесс секреции инсулина [47, 48]. У мышей с нокаутом гена *Nkx6.1* значительно снижено число зрелых  $\beta$ -клеток, в то время как другие подтипы островковых клеток развиваются нормально [47]. Nkx6.2, паралог Nkx6.1, имеет сходные паттерны экспрессии, но не экспрессируется в зрелых  $\beta$ -клетках [49, 50]. Мыши, мутантные по *Nkx6.2*, имеют нормальный фенотип. В то же время у животных с недостатком Nkx6.1 и Nkx6.2 возникают изменения, сходные с проявлениями мутации *Nkx6.1*, но при этом значительно снижено число глюкокагонпродуцирующих клеток. Это позволяет говорить о более широком влиянии Nkx-факторов на формирование  $\alpha$ -клеток [49].

Еще один член семейства Pax, Pax6, играет важную роль в дифференцировке островковых клеток. Pax6 экспрессируется во всех эндокринных гормон-





**Рис. 1.** Схема спецификации эндокринных клеток в процессе развития поджелудочной железы. А – прогениторная эндокринная клетка с потенциалом превращения в α-клетку или во вторую прогениторную клетку с потенциалом превращения в β- или δ-клетку, экспрессирующая Arx и Pax4. Б – изменение спецификации при недостатке Pax4. В – изменение спецификации при недостатке Arx. Г – изменение спецификации при недостатке Pax4 и Arx (по [18])

продуцирующих клетках. Pax6 необходим для развития всех четырех подтипов эндокринных клеток и формирования правильно структурированных оЛ, как показано с помощью нокаута гена *Pax6* у мышей [51, 52].

Представители семейства генов *Maf* (*Mafa*, *Mafb* и *cMaf*) влияют на конечную дифференцировку β- и α-клеток. Так, *Mafa* прямо действует на промотор гена инсулина и трансактивирует его [53–55]. Экспрессия *Mafa* инициируется на 13.5 день ЭР и ограничена инсулин<sup>+</sup>-клетками в течение эмбриогенеза и последующей жизни [56]. У мышей с недостатком *Mafa* развивается сахарный диабет первого типа с сильным снижением уровня инсулина и аномальной архитектурой оЛ. Изолированные инсулин<sup>+</sup>-клетки с дефицитом *Mafa* не способны к глюкозозависимой секреции инсулина [57]. Кроме того, эктопическая экспрессия *Mafa* в энтодерме куриных эмбрионов, а также в культурах непанкреатических клеток достаточна для инициации секреции инсулина [58].

Таким образом, в результате изучения роли основных генов, вовлеченных в спецификацию различных эндокринных клеток, установлена сложность механизмов их регуляции. Для оптимизации программ дифференцировки клеток *in vitro* необходимо изучать *in vitro* и *in vivo* генез инсулинпродуцирующих β-клеток.

### ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ДОНОРСКИХ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА

Трансплантация поджелудочной железы позволяет добиться восстановления нормального уровня глюкозы [59]. Однако подобная операция подвергает пациента определенным рискам и вызывает необходимость иммуносупрессии на протяжении последующей жизни.

Трансплантация аллогенных изолированных островковых клеток позволяет избежать полостной операции. В 1983 году человеческие оЛ пересадили крысам с экспериментальным диабетом [60]. Первая трансплантация аллогенных оЛ человеку была про-

ведена в 1990 году [61]. Эффективность этого метода оставалась крайне низкой до 2000 года. Вероятно, это было связано с технологиями выделения островков, недостаточным их количеством в трансплантате и жесткой иммуносупрессией. Использование разработанного Shapiro и соавт. [62] протокола Эдмонта позволило снизить аллоиммунную реакцию и повысить выживаемость пересаженных островков [62–64]. Удалось добиться независимости от введения экзогенного инсулина. Кроме того, использование этого метода позволило нормализовать уровень гликированного гемоглобина HbA1c [65]. При выделении островков из ПЖ по протоколу Эдмонта используют специфические ферменты. Выделенные клетки вводят в воротную вену печени через катетер, в результате чего клетки задерживаются в венозных синусах печени реципиента, где снабжаются кровью и осуществляют глюкозозависимую секрецию инсулина. Важнейший компонент этого протокола – комбинация иммуносупрессоров. В течение короткого времени сразу после трансплантации пациенту вводят такролимус, чтобы предупредить начальное отторжение. Использование второго компонента, сиролимуса, позволяет избежать использования токсичных для островковых клеток стероидных препаратов. Третий компонент, такролимус, применяется в малых дозах, что снижает его негативное воздействие на оЛ. Современные методики иммуномодуляции позволяют продлить время жизни трансплантата и сохранить донорские оЛ до 5 лет [66–68]. Однако риски, вызываемые длительной иммуносупрессией, а также острый дефицит донорского материала не позволяют широко использовать этот метод.

Сходство инсулина человека и свиньи [69, 70], а также применение инсулина в терапии диабета до появления рекомбинантного человеческого инсулина [71], позволило рассматривать свиные островковые клетки в качестве материала для трансплантата. Для защиты от отторжения используют различные методики инкапсуляции. В компании Living Cell Technologies изучается безопасность и эффективность трансплантации инкапсулированных свиных оЛ больным (СД1Т) без применения иммуносупрессии (<http://www.lctglobal.com>). Показано отсутствие признаков воспаления или фиброза, а также снижение уровня гликированного гемоглобина у пациентов при уменьшении дневной дозы инсулина [72–74].

Активно изучается применение инкапсулированных человеческих островковых клеток [73, 75–78], однако, при снижении или полном отсутствии необходимости в иммуномодуляции остается проблема нехватки доноров.

В качестве материалов для изготовления капсул применяют как водорастворимые полимеры (альги-

нат), так и водонерастворимые [79]. Несмотря на водорастворимость, альгинатные капсулы остаются стабильными в течение нескольких лет [78, 80–84]. Создание двухслойных капсул позволяет снизить пористость мембраны капсулы, что продлит время ее жизни и улучшит иммунозащитные свойства. Возможна также модификация мембраны поли-L-лизинном и полиорнитинном, но это снижает механическую стабильность, что, в свою очередь, уменьшает время жизни капсулы [79, 85, 86].

Немаловажен выбор места для трансплантации. Для адекватного функционирования трансплантата необходим достаточно высокий уровень васкуляризации. К сожалению, найти подходящую область для инкапсулированных трансплантатов достаточно сложно из-за их относительно крупных размеров. Места, пригодные для пересадки неинкапсулированных образцов, такие, как печень и селезенка, не подходят, так как не могут принять капсулы достаточно большого размера (диаметром от 600 мкм). С помощью относительно простой лапароскопии можно поместить капсулу в брюшную полость. Однако это не оптимальное расположение, поскольку вызывает существенный иммунный ответ. В ответ на трансплантат клетки мезотелия брюшной полости продуцируют, в том числе и опосредованно, – через сигналы от макрофагов, фактор некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкины-1 $\beta$  и -10, а также другие цитокины [87]. Лучшие результаты получены при введении как инкапсулированных, так и неинкапсулированных трансплантатов под капсулу почки или подкожно [88]. Подобная локализация вызывала лишь незначительную клеточную иммунную реакцию при высокой жизнеспособности трансплантированных островков и достаточном уровне секреции инсулина [89].

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛЮРИПОТЕННЫХ КЛЕТОК

Плюрипотентные стволовые клетки способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, что дает возможность получить из них и инсулинпродуцирующие клетки для терапии сахарного диабета. Известны два типа ПСК: ЭСК, получаемые из внутренней клеточной массы бластоцисты, и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, получаемые перепрограммированием соматических клеток в плюрипотентные. Первыми ЭСК культивировали Thomson и соавт. [90], что положило начало перепрограммированию соматических клеток [91]. Дифференцировочный потенциал, пролиферативные свойства, морфология и профиль экспрессии генов у ЭСК и ИПСК схожи, что позволяет использовать ИПСК без этических ограничений, связанных с разрушением эмбрионов [92, 93]. Аутологичные ИПСК

человека не элиминируются иммунной системой при пересадке, но остается опасность, что полученные инсулинпродуцирующие клетки будут отторгнуты тем же аутоиммунным механизмом, который привел к появлению сахарного диабета.

И ЭСК, и ИПСК способны к дифференцировке *in vitro* в инсулинпродуцирующие клетки [94–98]. Дифференцировка ПСК в инсулинпродуцирующие клетки проходит, как и при нормальном развитии ПЖ, в несколько стадий, первая из которых – индукция энтодермы. В ЭСК экспрессируется большое количество маркеров энтодермы, например Sox17, Foxa2, Sxcr4, при этом отсутствует экспрессия Sox7 [95, 96, 99–102]. Дифференцировка ЭСК и ИПСК в энтодерму инициируется сигналами Nodal и Wnt [95, 99, 103, 104]. В свою очередь, Nodal активируется белком из семейства TGF- $\beta$  – активином A, в концентрации 50–100 нг/мл, наиболее эффективном для дифференцировки [105, 106]. Долю дифференцированных клеток можно увеличить при одновременном воздействии активина A и некоторых ингибиторов (вортманнин, CHIR99021 [107], бутират натрия [96]) и активаторов Wnt-сигналов, таких, как CHIR9902 [108]. Кроме того, эффективность дифференцировки можно повысить при использовании малых молекул, таких, как IDE1 и IDE2 [109]. Как известно, из энтодермы происходят как панкреатические клетки, так и гепатоциты. Для дальнейшей панкреатической дифференцировки *in vitro* клетки обрабатывают антагонистами TGF- $\beta$  и BMP4, такими, как SU5402 и Noggin, которые подавляют дифференцировку в гепатоцитарном направлении [101].

Вторая стадия панкреатической дифференцировки ПСК – культивирование в присутствии дорсоморфина или его гомолога 1, которые способствуют развитию Pdx1<sup>+</sup>-клеток-предшественников [96, 99, 109]. Последующие стадии, позволяющие превратить клетки-предшественники в полноценные инсулинпродуцирующие клетки, пока ясны не до конца. При попытке провести дифференцировку *in vitro* использовали такие факторы, как никотинамид, инсулиноподобный фактор роста 1 и гепатоцитарный фактор роста [96, 101, 103]. Дальнейшую дифференцировку Pdx1<sup>+</sup>-клеток индуцировали индолактамом V и усиливали ретиноевой кислотой [108]. Показано также, что способность ПСК дифференцироваться в эндокринные клетки сильно зависит от плотности посева в культуре [110, 111]. Однако в клетках, дифференцированных *in vitro*, часто синтезируются несколько гормонов, такие клетки имеют незрелый фенотип, не реагирующий на уровень глюкозы [103, 112, 113]. В связи с этим часто трансплантируют клетки-предшественники, чтобы дальнейшая дифференцировка прошла *in vivo* [99, 105, 114–117]. В опытах

как на здоровых мышах [99, 105], так и на мышах с диабетом, индуцированным стрептозотоцином [114], из ЭСК развивались функциональные инсулинпродуцирующие клетки. Более того, показано, что даже инкапсулированные клетки-предшественники могут дифференцироваться в зрелые инсулинпродуцирующие клетки, способные к эффективной секреции инсулина у мышей с диабетом [118].

В революционной работе Pagliuca и соавт. [119] разработан протокол дифференцировки, позволяющий получать функциональные инсулинпродуцирующие клетки. Дифференцировка ПСК человека осуществляется в течение 28–33 дней с применением большого набора факторов роста и малых молекул. В результате получены инсулинпродуцирующие клетки, способные к глюкозозависимой секреции инсулина на уровне, сопоставимом с уровнем в зрелых  $\beta$ -клетках. Эти клетки содержали инсулиновые гранулы, обладающие ультраструктурой, присущей  $\beta$ -клеткам, и были способны нормализовать уровень глюкозы при трансплантации мышам с экспериментальным диабетом [119].

Обнаружено, что фактор освобождения кортикотропина, белок Ucn3, экспрессируется в  $\beta$ -клетках на высоком уровне и регулирует глюкозозависимую секрецию инсулина [120]. При дифференцировке *in vitro*, однако, Ucn3 не экспрессируется [121]. В то же время в зрелых и незрелых  $\beta$ -клетках уровень экспрессии Ucn3 различается более чем в 7 раз. Таким образом, созревание клеток *in vivo* важно для их функциональности. Это предполагает существование в местах трансплантации некоторых специфических сигналов, которые запускают дифференцировку и созревание  $\beta$ -клеток.

### МЕТОД ПРЯМОГО ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ

Технологии репрограммирования, разработанные для получения ИПСК, могут использоваться и в других целях. Методика прямого перепрограммирования основана на применении генетических конструкций для репрограммирования клеток различного типа в целевые, минуя их возвращение в плюрипотентное состояние. Как и при получении ИПСК, в методе прямого перепрограммирования используются технологии интеграции ДНК (в большинстве случаев с помощью вирусных векторов). В частности, экспрессия гена *Pdx1*, искусственно вызванная в печени мышей с диабетом, привела к появлению инсулин<sup>+</sup>-клеток вблизи кровеносных сосудов. Конверсия, однако, была неполной. Это заставило искать другие гены, действующие синергично и между собой, и с *Pdx1*. Кроме того, начались поиски клеток, подходящих для репрограммирования. Многообещающими оказались протоковые клетки. Еще в 1980-е годы было



показано, что  $\beta$ -клетки могут возникать из протоковых клеток ПЖ. Экспрессия *Pdx1* в протоках ПЖ человека индуцирует экспрессию инсулина [122]. Внутривнутрибрюшинное введение рекомбинантного *Pdx1* снижало уровень гипергликемии у мышей со стрептозотоциновым диабетом [123]. Протоковые клетки взрослых мышей, трансдуцированные аденовирусом, несущим *Pdx1*, *Pax4*, *Ngn3* и *NeuroD*, начинали активно вырабатывать инсулин [124].

Согласно последним исследованиям, ацинарную ткань ПЖ мыши также можно перепрограммировать с помощью искусственной экспрессии генов: возможна индукция дифференцировки ацинарных клеток в протоковые с последующим превращением в островковые [125]. Большое количество ацинарных клеток в ПЖ делает их удобным источником для получения  $\beta$ -клеток. Ацинарные клетки могут дифференцироваться *in vitro* в инсулинпродуцирующие клетки при культивировании в среде с низким содержанием сыворотки с добавлением эпидермального фактора роста и никотинамида. При этом возрастает также экспрессия других гормонов, включая глюкагон, соматостатин и панкреатический полипептид [126]. Ацинарные клетки человека при определенных условиях культивирования могут трансформироваться в структуры, подобные протокам. Добавление дексаметазона индуцирует ацинарно-протоковый переход клеток, но, к сожалению, не дифференцировку в инсулинпродуцирующие клетки [127]. Показано, что при гипергликемии увеличивается инфильтрация ацинарной ткани Т-клетками и индуцируется дифференцировка ацинарных клеток либо в  $\beta$ -клетки, либо в структуры, подобные протокам, из которых могут в дальнейшем формироваться  $\beta$ -клетки [128]. Ацинарно-островковую дифференцировку у крыс можно вызвать обработкой дексаметазоном [129]. Согласно последним исследованиям, ацинарную ткань ПЖ мыши также можно перепрограммировать с помощью искусственной экспрессии генов *Pdx1*, *Ngn3* и *Mafa*. У опытных животных снизился уровень гипергликемии, хотя полного выздоровления не произошло. Возможно, это связано с отсутствием агрегации полученных клеток и с отсутствием у них синхронной глюкозозависимой секреции инсулина [130–132]. Эти результаты подтверждены и в опытах *in vitro*, проведенных на линии ацинарных клеток AR42J, а затем на экзокринных клетках ПЖ человека [133, 134]. Дополнительно стоит отметить, что в опытах *in vivo* перепрограммирование проходит лучше при более сильном иммунном ответе на введение вирусного вектора, используемого для доставки генов [135].

Основная физиологическая роль  $\alpha$ -клеток заключается в секреции глюкагона – антагониста инсули-

на, играющего важную роль в поддержании уровня глюкозы. Переход  $\alpha$ -клеток в  $\beta$ -клетки наблюдается при эктопическом повышении экспрессии *Pax4*. Этому процессу также способствовал *Ngn3* [136]. Усиленная экспрессия *Pdx1*, контролируемая промотором *Ngn3*, на ранних стадиях эмбрионального развития приводит к смещению соотношения между  $\alpha$ - и  $\beta$ -клетками в сторону  $\beta$ -клеток [137]. Подобный переход не индуцируется активацией *Pdx1* на более поздних стадиях. При лигировании выводного протока большое число новообразованных  $\beta$ -клеток происходило из  $\alpha$ -клеток в течение 2 недель [138]. Судя по всему, превращение  $\alpha$ -клеток в  $\beta$ -клетки возможно только в моделях с практически полным уничтожением изначальной популяции  $\beta$ -клеток [138, 139]. В эксперименте с частичным разрушением  $\beta$ -клеток подобный переход не обнаружен [140].

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОММИТИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Использование ЭСК не только этически неоднозначно, но имеет и другие негативные стороны. Например, трансплантаты как из ЭСК, так и из ИПСК могут обладать опухолевой активностью, обусловленной присутствием недифференцированных плюрипотентных клеток. Кроме того, необходимым остается применение иммуномодулирующей терапии для регулирования аллогенных реакций [141, 142]. Использование постнатальных стволовых клеток позволит обойти все эти проблемы [143–146].

Доступным источником стволовых клеток является кожа. Клетки-предшественники кожи впервые были описаны Тома и соавт. [147]. Они обладают широким диапазоном дифференцировки, позволяющим получать функционально различные типы клеток *in vitro* (клетки глии, гладкой мускулатуры, адипоциты). Описан эффективный метод криоконсервации клеток-предшественников кожи, дающий возможность создания клеточного банка. Таким образом, кожа рассматривается в качестве перспективного источника аутологичных клеток, способных к дифференцировке и длительному хранению [148]. Из клеток-предшественников кожи *in vitro* получены клетки, способные к глюкозозависимой секреции инсулина и С-пептида. Дифференцированные клетки экспрессировали характерные для  $\beta$ -клеток маркеры, такие, как *Pdx1*, *Nkx2.2*, *Pax4*, *NeuroD* и *Isl-1* [149].

Наиболее часто упоминаемые в контексте регенеративной медицины ПСК – это мезенхимные стволовые клетки (МСК), в большом количестве представленные в большинстве тканей организма [150]. Их успешно культивируют *in vitro*, они достаточно эффективно дифференцируются в костную, хрящевую и жировую ткани [151]. Предполагается, что для диф-

ференцировки в инсулинпродуцирующие клетки наиболее подходят МСК жировой ткани, полученные при операции на веке, поскольку они происходят из клеток нервного гребня. Подобное происхождение имеют и МСК из периодонтальной связки [152–154]. Однако их не удается достаточно эффективно приблизить к фенотипу  $\beta$ -клеток *in vitro*. Несколько обособленно стоят МСК из пуповинной крови. Исследование, проведенное Prabakar и соавт., выявило у них сходные с ЭСК характеристики, а также сходство их дифференцировки в панкреатическом направлении [155]. Другой вариант терапии – прямое введение недифференцированных МСК, при котором наблюдали различную степень регенерации [153, 154, 156, 157]. Подобная реакция организма обусловлена иммуномодуляторными, противовоспалительными, проангиогенными и трофическими свойствами МСК. Более выраженной способностью к регуляции иммунитета обладают гемопоэтические стволовые клетки, которые успешно использовали для «перезагрузки» иммунитета при диабете [158, 159]. Мультипотентные стволовые клетки, полученные из пуповинной крови, по неподтвержденным результатам могут занимать так называемым «обучением» иммунитета. Лимфоциты больных сахарным диабетом первого типа циркулируют в устройстве с высеянными мультипотентными стволовыми клетками пуповинной крови здоровых доноров. После реинфузии «обученных» лимфоцитов наблюдали снижение симптомов сахарного диабета первого типа [160, 161].

Существует гипотеза, что повреждение ПЖ вызывает активацию факультативных клеток-предшественников, которая ведет к увеличению количества  $\beta$ -клеток. Показано, что в ПЖ мыши  $\beta$ -клетки регенерируют из протоковых клеток-предшественников [161]. Кроме того, в большой выборке больных хроническим панкреатитом и бессимптомным фиброзом ПЖ выявлен неогенез из комплексных островково-протоковых структур, которые представляют собой ассоциацию эндокринной части ПЖ с протоками [162]. У мышей со стрептозотоциновым диабетом обнаружено два типа предшественников  $\beta$ -клеток, экспрессирующих Glut2 и Pdx1/соматостатин. Этим клеткам приписывают протоковое происхождение [163, 164]. Изучение зародышевых ПЖ *in vitro* показало, что новые инсулинпродуцирующие клетки могут происходить из эпителия протоков. Протоки ПЖ, взятые у свиньи в неонатальный период, в особых условиях культивирования экспрессируют инсулин и маркеры предшественников эндокринных клеток [165]. В протоковой ткани ПЖ человека, культивируемой в течение 3–4 недель, наблюдали эндокринные клетки, прорастающие в трехмерных протоковых кистах. Эти клетки экспрессировали

как инсулин, так и другие гормоны оЛ. Это говорит о том, что они находятся в состоянии дифференцировки. Кроме того, в полученных таким образом клетках секреция инсулина была глюкозозависимой [161]. Показано также, что Pdx1 может значительно ускорять дифференцировку протоковых эпителиальных клеток в инсулинпродуцирующие клетки *in vitro* [166]. В результате исследований *in vivo* на мышах с индуцированным стрептозотоциновым диабетом установлено, что протоковые клетки экспрессируют инсулин на ранних стадиях воспаления, а затем экспрессия прекращается [167]. Это может говорить о том, что начальное воспаление при сахарном диабете первого типа индуцирует регенерацию  $\beta$ -клеток. Возможно, новообразованные  $\beta$ -клетки более уязвимы для апоптоза. Экспрессия фактора некроза опухоли- $\alpha$  в  $\beta$ -клетках мыши вызывала хронический инсулит, а не диабет. Это происходило с одновременным развитием внутриостровковых протоков с встроенными в их стенки  $\beta$ -клетками, что может говорить о способности к регенерации [168]. Сходным образом трансгенные мыши, экспрессирующие интерферон- $\gamma$ , были защищены от стрептозотоцинового диабета, который сопровождался увеличенной регенерацией протоковых клеток и неогенезом оЛ [169]. Экспрессия Pdx1 и Msx2 в протоках ПЖ таких трансгенных мышей предполагает ассоциацию этих факторов с дифференцировкой протоковых клеток в этой модели [170]. У людей с аутоиммунным хроническим панкреатитом разрушение  $\beta$ -клеток Т-клетками вызывает дифференцировку  $\beta$ -клеток из протоковых клеток ПЖ [171]. У больных сахарным диабетом первого типа после одновременной пересадки ПЖ и почки обнаружены инсулинпродуцирующие Pdx1<sup>+</sup>-протоковые клетки.

На мышцах с индуцированным аллоксаном диабетом показано, что при *in vivo* воздействии EGF и CNTF новые инсулинпродуцирующие клетки образуются преимущественно из ацинарных клеток [172]. С помощью технологии Cre/LoxP проследили судьбу ацинарных и протоковых клеток и выяснили, что около 40% новообразованных инсулинпродуцирующих клеток происходят из ацинарных клеток и только 4% – из других типов клеток. Это доказывает существование трансдифференцировки в ПЖ млекопитающих.

Ряд работ посвящен поиску непанкреатического источника клеток, способных синтезировать инсулин. Один из таких источников – большие слюнные железы. Показано, что в поднижнечелюстной слюнной железе крысы экспрессируется мРНК препроинсулинов I и II [173]. Иммуногистохимическими методами инсулин обнаружен в околоушной слюнной железе крысы [174]. Установлено, что при диабете

поднижнечелюстные слюнные железы выполняют компенсаторную функцию [175]. У мышей со стрептозотоциновым диабетом после трансплантации поднижнечелюстной слюнной железы под капсулу почки наблюдалась нормализация уровня глюкозы в крови [176]. Клетки, полученные из поднижнечелюстной слюнной железы человека и животных (мышь, крыса, свинья), легко культивируются [177–179]. В трехмерных условиях культивирования они приобретают способность синтезировать глюкагон, альбумин или инсулин [177, 178]. При сферическом культивировании в присутствии никотинамида клетки слюнной железы человека приобретали способность к глюкозозависимой секреции С-пептида [179]. Клетки поднижнечелюстной слюнной железы крысы, экспрессирующие  $\alpha\beta 1/c\text{-Kit}$ , сохраняли морфологию, пролиферативную активность и мультипотентность, присущую стволовым клеткам, более 92 пассажей. В присутствии активина А, эксендина 4 и ретиноевой кислоты эти клетки экспрессировали панкреатические маркеры, такие, как Pdx1, инсулин, панкреатический полипептид и Ngn3 [180].

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МАТРИКСОВ ДЛЯ 3D-СТРУКТУР

Широко известно, что использование трехмерных структур для культивирования клеток имеет некоторые преимущества перед традиционным двумерным культивированием. Клетки содержатся в условиях, более близких к нативным, сохраняют контакты с матриксом и между собой, ускоряется процесс дифференцировки [181]. Такие системы приближают условия культивирования клеток к условиям *in vivo*. Эти утверждения справедливы и для культивирования панкреатических клеток *in vitro* и их доставки *in vivo*.

Высевание клеток на пористый матрикс увеличивает их жизнеспособность и функции изолированных оЛ *in vitro*, улучшает результаты трансплантаций. Например, островковые клетки ПЖ крысы были почти вдвое более жизнеспособны и секретировали в 4 раза больше инсулина при культивировании на пористом матриксе из полигликолевой кислоты, чем при 2D-культивировании [182]. При культивировании инсулинпродуцирующих клеток линии RIN-m5F на созданном методом электроспиннинга матриксе из сополимера молочной и гликолевой кислот PLGA с порами, заполненными коллагеном типа I, секреция инсулина повышалась вдвое [183].

Еще одно преимущество пористых матриксов – возможность кокультивирования нескольких типов клеток для создания условий, повторяющих нативные структуры ткани. Так, кокультивирование островковых клеток мыши, клеток эндотелия пупо-

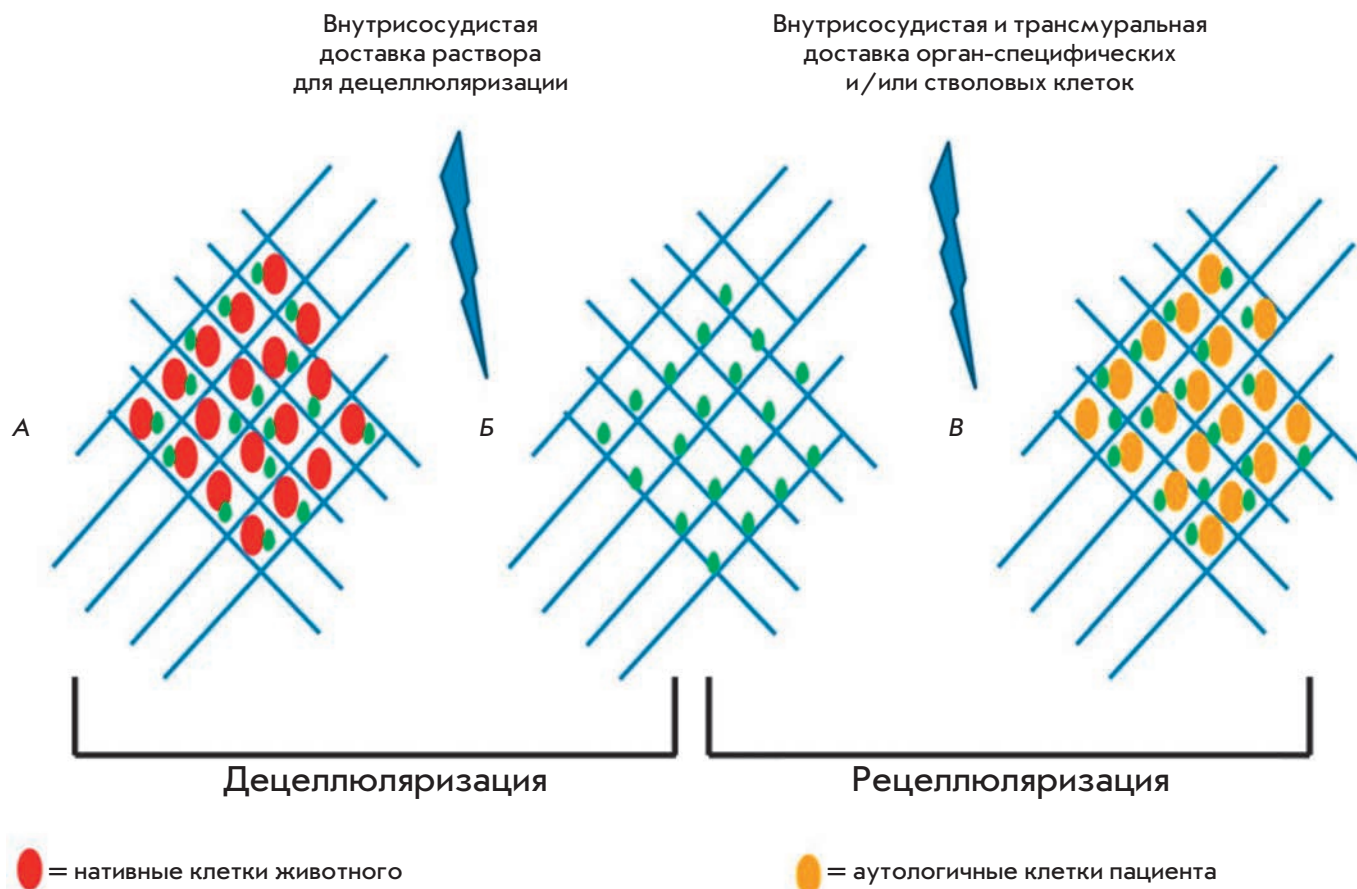
вины человека и фибробластов крайней плоти человека на матриксе из PLLA/PGLA увеличило выживаемость островковых клеток на 75%. Кроме того, включение фибробластов и эндотелиальных клеток увеличило экспрессию таких маркеров, как Gcg, Pdx1, Nkx6.1 и Glut2. В полтора раза увеличилась секреция инсулина [184].

Очевидно, что биоматериалы создают трехмерную структуру для культивирования клеток, однако все больше говорят о фундаментальном влиянии нативного межклеточного матрикса (МКМ) на состояние клеток. Его роль заключается не только в механической поддержке: МКМ влияет на адгезию клеток, молекулярный состав, клеточные взаимодействия и связывание факторов роста. Кроме того, его механическая жесткость и деформируемость вносят существенный вклад в процессы дифференцировки, пролиферации, выживания, полярности и миграции клеток [185].

Наиболее полно охарактеризованы такие компоненты МКМ, как ламинины – семейство из 15–20 гликопротеинов [186], каждый из которых независимо усиливает секрецию инсулина [187]. Ламинины влияют на клетки, связываясь с интегринами – белками клеточной мембраны, отвечающими за адгезию и передачу внешних сигналов цитоскелету [188]. 3D-структура нативного МКМ определяет топографию эндокринных клеток, что, как показано, влияет на секреторную активность [189]. Более того, составляющие элементы, такие, как коллагены, гликопротеины, гликозаминогликаны независимо предотвращают апоптоз  $\beta$ -клеток, вызванный потерей клеточной адгезии [189–195]. Обнаружено, что компоненты МКМ усиливают секрецию инсулина, даже в отсутствие глюкозы [196]. МКМ способен связывать, запасать и регулировать активность факторов роста, включая TGF- $\beta 1$ , который влияет на развитие, функционирование и регенерацию оЛ [197, 198].

При разработке материалов для создания искусственных 3D-матрикса их поверхность модифицируют прикреплением молекул, составляющих часть нативного МКМ. Однако на данный момент более перспективным считают использование децеллюляризации МКМ (рис. 2) [200–204]. Современные подходы позволяют удалить клеточный материал, ДНК и поверхностные антигены при сохранении структурной целостности МКМ [205]. Получена децеллюляризованная свиная ПЖ с сохранением всех важных структурных компонентов, включая различные типы коллагена, эластина, фибронектина и ламинина [206]. Децеллюляризованная ткань служит матриксом для посадки клеток с целью восстановления клеточной части органа. На данный момент удалось успешно рецеллюляризовать МКМ таких органов,





**Рис. 2.** Схема технологии децеллюляризации-рецеллюляризации. А – интактный орган, состоящий из клеточного компонента (красные эллипсы) и МКМ (синяя сеть), а также факторов роста (зеленые точки). Б – ацеллюлярный орган после освобождения от клеточного материала. В – рецеллюляризованный аутологичными клетками орган (желтые эллипсы) (по [199])

как печень [207], дыхательные пути [208], мочевой пузырь [209], молочная железа [210]. Это позволяет надеяться на положительный результат и в случае ПЖ.

### ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Современные методы лечения при СД1Т ограничены и не элиминируют долговременные осложнения. Заметен прогресс в исследованиях, связанных с попытками восстановления инсулинпродуцирующей функции ПЖ. Классические методы трансплантации сталкиваются с нехваткой доноров и рисками, связанными с необходимостью иммуносупрессии. Последние могут быть преодолены с помощью технологий инкапсуляции, однако нерешенными остаются такие проблемы, как недостаточная продолжительность жизни клеток и совмещение достаточного числа клеток для обеспечения нормогликемии с раз-

мерами трансплантата, не вызывающими затруднений в движении или какого-либо дискомфорта. Способность некоторых типов клеток, например МСК и гемопоэтических клеток, к регулировке иммунитета может оказаться весьма полезной для предотвращения повторного аутоиммунного уничтожения  $\beta$ -клеток.

Тщательного анализа требует выбор типа клеток. ЭСК и ИПСК могут дифференцироваться в панкреатические клетки-предшественники и/или инсулинпродуцирующие клетки. Использование аллогенных ЭСК, однако, также требует иммуносупрессии либо инкапсулирования. Применение аутологичных ИПСК ограничивается экономической целесообразностью получения своей линии для каждого отдельного пациента и сложностью дифференцировочных протоколов. Кроме того, велика вероятность последующего рецидива, связанного с отторжением, вызван-

ного аутоиммунным механизмом, который и привел к появлению СД1Т. Остается нерешенным и вопрос туморогенной активности оставшихся в трансплантате недифференцированных ПСК.

На данный момент перспективным кажется совмещение различных подходов: полученные от будущего реципиента ИПСК дифференцируют до панкреатических клеток-предшественников, которые затем культивируют в 3D-условиях с элементами МКМ и аутологичными МСК. Или для «перезагрузки» иммунной системы пациента используют гемопоэтические стволовые клетки, а новые инсулинпродуцирующие клетки получают с помощью прямого перепрограммирования. Однако применение этих подходов требует тщательного анализа и оценки возможных рисков, связанных с биологической безопасностью методик и туморогенной активностью используемых клеток.

Многообещающим современным методом является прямое перепрограммирование клеток. Однако недостаточное изучение безопасности этого способа получения инсулинпродуцирующих клеток пока

не позволяет говорить о переносе прямого перепрограммирования в практическую плоскость.

Положительный эффект культивирования в трехмерных условиях описан в многочисленных работах. Кроме того, возможность кокультивирования клеток позволяет получить трансплантаты, наиболее близкие к нативному органу. Перспективным выглядит использование децеллюляризованного МКМ, однако для понимания эффектов использования данных структур в организме необходимы опыты *in vivo*.

Коммитированные клетки пока не удается с достаточной эффективностью приблизить к фенотипу  $\beta$ -клеток *in vitro*. Таким образом, основной задачей клеточной биологии остается поиск доступного источника клеток, способных к эффективной дифференцировке в инсулинпродуцирующие клетки и глюкозозависимой секреции инсулина. ●

*Исследование выполнено за счет гранта  
Российского научного фонда  
(проект № 14-50-00029).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Githens S., Schexnayder J.A., Moses R.L., Denning G.M., Smith J.J., Frazier M.L. // *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 1994. V. 30A. P. 622–635.
- Lammert E., Cleaver O., Melton D. // *Science*. 2001. V. 294. P. 564–567.
- Field H.A., Dong P.D.S., Beis D., Stainier D.Y. // *Dev. Biol.* 2003. V. 261. P. 197–208.
- Hebrok M., Kim S.K., Melton D.A. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 1705–1713.
- Kumar M., Jordan N., Melton D., Grapin-Botton A. // *Dev. Biol.* 2003. V. 259. P. 109–122.
- Riedel M.J., Asadi A., Wang R., Ao Z., Warnock G.L., Kieffer T.J. // *Diabetologia*. 2012. V. 55. № 2. P. 372–381.
- Jennings R.E., Berry A.A., Kirkwood-Wilson R., Roberts N.A., Hearn T., Salisbury R.J., Blaylock J., Piper Hanley K., Hanley N.A. // *Diabetes*. 2013. V. 62. № 10. P. 3514–3522.
- Pan F.C., Wright C. // *Dev. Dyn.* 2011. V. 240. P. 530–565.
- Villasenor A., Chong D.C., Henkemeyer M., Cleaver O. // *Development*. 2010. V. 137. P. 4295–4305.
- Bhushan A., Itoh N., Kato S., Thiery J.P., Czernichow P., Bellusci S., Scharfmann R. // *Development*. 2001. V. 128. P. 5109–5117.
- Landsman L., Nijagal A., Whitchurch T.J., VanderLaan R.L., Zimmer W.E., MacKenzie T.C., Hebrok M. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. e1001143.
- McClenaghan N.H. // *Exp. Physiol.* 2007. V. 92. № 3. P. 481–496.
- Peck A.B., Cornelius J.G., Schatz D., Ramiya V.K. // *J. Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*. 2002. V. 9. № 6. P. 704–709.
- Teitelman G., Alpert S., Polak J.M., Martinez A., Hanahan D. // *Development*. 1993. V. 118. № 4. P. 1031–1039.
- Herrera P.L., Huarte J., Sanvito F., Meda P., Orci L., Vassalli J.D. // *Development*. 1991. V. 113. № 4. P. 1257–1265.
- Shao S., Fang Z., Yu X., Zhang M. // *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 384. № 4. P. 401–404.
- Prasadan K., Tulachan S., Guo P., Shiota C., Shah S., Gittes G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 396. № 4. P. 1036–1041.
- Kordowich S., Mansouri A., Collombat P. // *Mol. Cell Endocrinol.* 2010. V. 323. № 1. P. 62–69.
- Seymour P.A., Freude K.K., Tran M.N., Mayes E.E., Jense J., Kis R., Schere G., Sande M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 6. P. 1865–1870.
- Seymour P.A., Freude K.K., Dubois C.L., Shih H.P., Patel N.A., Sander M. // *Dev. Biol.* 2008. V. 323. № 1. P. 19–30.
- Lynn F.C., Smith S.B., Wilson M.E., Yang K.Y., Nekrep N., German M.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 25. P. 10500–10505.
- Ohlsson H., Karlsson K., Edlund T. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 4251–4259.
- Stoffers D.A., Heller R.S., Miller C.P., Habener J.F. // *Endocrinology*. 1999. V. 140. P. 5374–5381.
- Guz Y., Montminy M.R., Stein R., Leonard J., Gamer L.W., Wright C.V., Teitelman G. // *Development*. 1995. V. 121. P. 11–18.
- Gu G., Brown J.R., Melton D.A. // *Mech. Dev.* 2003. V. 120. P. 35–43.
- Offield M.F., Jetton T.L., Labosky P.A., Ray M., Stein R.W., Magnuson M.A., Hogan B.L., Wright C.V. // *Development*. 1996. V. 122. P. 983–995.
- Ahlgren U., Jonsson J., Jonsson L., Simu K., Edlund H. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 1763–1768.
- Holland A.M., Gonez L.J., Naselli G., Macdonald R.J., Harrison L.C. // *Diabetes*. 2005. V. 54. P. 2586–2595.
- Gannon M., Ables E.T., Crawford L., Lowe D., Offield M.F., Magnuson M.A., Wright C.V. // *Dev. Biol.* 2008. V. 314. P. 406–417.
- Gradwohl G., Dierich A., Lemeur M., Guillemot F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 1607–1611.
- Jenny M., Uhl C., Roche C., Duluc I., Guillermin V., Guillemot F., Jensen J., Kedinger M., Gradwohl G. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 6338–6347.

32. Wang S., Jensen J.N., Seymour P.A., Hsu W., Dor Y., Sander M., Magnuson M.A., Serup P., Gu G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 24. P. 9715–9720.
33. Schwitzgebel V.M., Scheel D.W., Connors J.R., Kalamaras J., Lee J.E., Anderson D.J., Sussel L., Johnson J.D., German M.S. // *Development*. 2000. V. 127. P. 3533–3542.
34. Heremans Y., van De Casteele M., In't Veld P., Gradwohl G., Serup P., Madsen O., Pipeleers D., Heimberg H. // *J. Cell. Biol.* 2002. V. 159. P. 303–312.
35. Apelqvist A., Li H., Sommer L., Beatus P., Anderson D.J., Honjo T., Hrabe De Angelis M., Lendahl U., Edlund H. // *Nature*. 1999. V. 400. P. 877–881.
36. Grapin-Botton A., Majithia A.R., Melton D.A. // *Genes Dev*. 2001. V. 15. P. 444–454.
37. Villasenor A., Chong D.C., Cleaver O. // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. P. 3270–3279.
38. Pictet R.L., Clark W.R., Williams R.H., Rutter W.J. // *Dev. Biol.* 1972. V. 29. P. 436–467.
39. Johansson K.A., Dursun U., Jordan N., Gu G., Beermann F., Gradwohl G., Grapin-Botton A. // *Dev. Cell*. 2007. V. 12. P. 457–465.
40. Gierl M.S., Karoulias N., Wende H., Strehle M., Birchmeier C. // *Genes Dev*. 2006. V. 20. P. 2465–2478.
41. Mellitzer G., Bonne S., Luco R.F., van De Casteele M., Lenne-Samuel N., Collombat P., Mansouri A., Lee J., Lan M., Pipeleers D., et al. // *EMBO J*. 2006. V. 25. P. 1344–1352.
42. Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Torres M., Oliver G., Gruss P. // *Nature*. 1997. V. 386. P. 399–402.
43. Collombat P., Mansouri A., Hecksher-Sorensen J., Serup P., Krull J., Gradwohl G., Gruss P. // *Genes Dev*. 2003. V. 17. P. 2591–2603.
44. Collombat P., Hecksher-Sorensen J., Broccoli V., Krull J., Ponte I., Mundiger T., Smith J., Gruss P., Serup P., Mansouri A. // *Development*. 2005. V. 132. P. 2969–2980.
45. Prado C.L., Pugh-Bernard A.E., Elghazi L., Sosa-Pineda B., Sussel L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 2924–2929.
46. Sussel L., Kalamaras J., Hartigan-O'Connor D.J., Meneses J.J., Pedersen R.A., Rubenstein J.L., German M.S. // *Development*. 1998. V. 125. P. 2213–2221.
47. Sander M., Sussel L., Connors J., Scheel D., Kalamaras J., Dela Cruz F., Schwitzgebel V., Hayes-Jordan A., German M. // *Development*. 2000. V. 127. P. 5533–5540.
48. Oster A., Jensen J., Edlund H., Larsson L.I. // *J. Histochem. Cytochem.* 1998. V. 46. P. 717–721.
49. Henseleit K.D., Nelson S.B., Kuhlbrodt K., Hennings J.C., Ericson J., Sander M. // *Development*. 2005. V. 132. P. 3139–3149.
50. Pedersen J.K., Nelson S.B., Jorgensen M.C., Henseleit K.D., Fujitani Y., Wright C.V., Sander M., Serup P. // *Dev. Biol.* 2005. V. 288. P. 487–501.
51. St-Onge L., Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Mansouri A., Gruss P. // *Nature*. 1997. V. 387. P. 406–409.
52. Sander M., Neubüser A., Kalamaras J., Ee H.C., Martin G.R., German M.S. // *Genes Dev*. 1997. V. 11. № 13. P. 1662–1673.
53. Zhao L., Guo M., Matsuoka T.A., Hagman D.K., Parazoli S.D., Poutout V., Stein R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 11887–11894.
54. Matsuoka T.A., Zhao L., Artner I., Jarrett H.W., Friedman D., Means A., Stein R. // *Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 6049–6062.
55. Aramata S., Han S.L., Yasuda K., Kataoka K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1730. P. 41–46.
56. Matsuoka T.A., Artner I., Henderson E., Means A., Sander M., Stein R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 2930–2933.
57. Zhang C., Moriguchi T., Kajihara M., Esaki R., Harada A., Shimohata H., Oishi H., Hamada M., Morito N., Hasegawa K., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 4969–4976.
58. Artner I., Hang Y., Guo M., Gu G., Stein R. // *J. Endocrinol.* 2008. V. 198. P. 271–279.
59. Frank A., Deng S., Huang X., Velidedeoglu E., Bae Y.S., Liu C., Abt P., Stephenson R., Mohiuddin M., Thambipillai T., et al. // *Ann. Surg.* 2004. V. 240. № 4. P. 631–640.
60. Блюмкин В.Н., Скалецкий Н.Н., Попов В.Л., Шальнев Б.И., Данилов М.И. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 1983. № 5. С. 89–91.
61. Scharp D.W., Lacy P.E., Santiago J.V., McCullough C.S., Weide L.G., Falqui L., Marchetti P., Gingerich R.L., Jaffe A.S., Cryer P.E. // *Diabetes*. 1990. V. 39. № 4. P. 515–518.
62. Shapiro A.M., Ricordi C., Hering B.J., Auchincloss H., Lindblad R., Robertson R.P., Secchi A., Brendel M.D., Berney T., Brennan D.C. // *N. Engl. J. Med.* 2006. V. 355. № 13. P. 1318–1330.
63. Ryan E.A., Lakey J.R., Rajotte R.V., Korbitt G.S., Kin T., Imes S., Rabinovitch A., Elliott J.F., Bigam D., Kneteman N.M., et al. // *Diabetes*. 2001. V. 50. № 4. P. 710–719.
64. Дедов И.И., Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. // *Сахарный диабет*. 2004. № 2. С. 34–41.
65. Shamooh H., Duffy H., Fleischer N., Engel S., Saenger P., Strelzyn M., Litwak M., Wylie-Rosett J., Farkash A., Geiger D., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1993. V. 329. № 14. P. 977–986.
66. Bellin M.D., Barton F.B., Heitman A., Harmon J.V., Kandaswamy R., Balamurugan A.N., Sutherland D.E., Alejandro R., Hering B.J. // *Am. J. Transplant.* 2012. V. 12. № 6. P. 1576–1583.
67. Shapiro A.M. // *Curr. Diab. Rep.* 2011. V. 11. № 5. P. 345–354.
68. Calafiore R., Basta G. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2013. № 4. P. 67–68:84–92.
69. O'Connell P.J., Cowan P.J., Hawthorne W.J., Yi S., Lew A.M. // *Curr. Diab. Rep.* 2013. V. 13. № 5. P. 687–694.
70. Graham M.L., Schuurman H.J. // *Xenotransplantation*. 2013. V. 20. № 1. P. 5–17.
71. Burman K.D., Cunningham E.J., Klachko D.M., Burns T.W. // *Mol. Med.* 1973. V. 70. № 6. P. 363–366.
72. Skinner S.J.M., Tan P.L.J., Garkavenko O., Muzina M., Escobar L., Elliott R.B. // *InTech*. 2011. V. 11. P. 391–408.
73. Elliott R.B., Escobar L., Tan P.L., Muzina M., Zwaan S., Buchanan C. // *Xenotransplantation*. 2007. V. 14. № 2. P. 157–161.
74. Elliott R.B., Technologies L.C. // *Curr. Opin. Organ Transplant*. 2011. V. 16. № 2. P. 195–200.
75. Soon-Shiong P. // *Drug Deliv. Rev.* 1999. V. 35. P. 259–270.
76. Tuch B.E., Keogh G.W., Williams L.J., Wu W., Foster J.L., Vaithilingam V., Philips R. // *Diabetes Care*. 2009. V. 32. P. 1887–1889.
77. Basta G., Montanucci P., Luca G., Boselli C., Noya G., Barbaro B., Qi M., Kinzer K.P., Oberholzer J., Calafiore R. // *Diabetes Care*. 2011. V. 34. P. 2406–2409.
78. Strautz R.L. // *Diabetologia*. 1970. V. 6. P. 306–312.
79. De Vos P., Hamel A.F., Tatarkiewicz K. // *Diabetologia*. 2002. V. 45. P. 159–173.
80. Soon-Shiong P., Heintz R.E., Merideth N., Yao Q.X., Yao Z., Zheng T., Murphy M., Moloney M.K., Schmehl M., Harris M., et al. // *Lancet*. 1994. V. 343. P. 950–951.
81. De Vos P., De Haan B., van Schilfgaarde R. // *Biomaterials*. 1997. V. 18. P. 273–278.
82. De Vos P., De Haan B.J., Wolters G.H., Strubbe J.H., van Schilfgaarde R. // *Diabetologia*. 1997. V. 40. P. 262–270.
83. De Vos P., van Straaten J.F., Nieuwenhuizen A.G., de Groot M., Ploeg R.J., De Haan B.J., van Schilfgaarde R. // *Diabetes*. 1999. V. 48. P. 1381–1388.
84. Duvivier-Kali V.F., Omer A., Parent R.J., O'Neil J.J., Weir G.C. // *Diabetes*. 2001. V. 50. P. 1698–1705.
85. Strand B.L., Ryan T.L., In't Veld P., Kulseng B., Rokstad



- A.M., Skjak-Brek G., Espevik T. // *Cell Transplant.* 2001. V. 10. P. 263–275.
86. King A., Sandler S., Andersson A. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2001. V. 57. P. 374–383.
87. Yao V., McCauley R., Cooper D., Platell C., Hall J.C. // *Surg. Infect.* 2004. V. 5. P. 229–236.
88. Dufrane D., Steenberghe M.Y., Goebbels R.M., Saliez A., Guiot Y., Gianello P. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 3201–3208.
89. Vêriter S., Mergen J., Goebbels R.M., Aouassar N., Grégoire C., Jordan B., Levêque P., Gallez B., Gianello P., Dufrane D. // *Tissue Eng. Part A.* 2010. V. 16. P. 1503–1513.
90. Thomson J.A., Marshall V.S. // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1998. V. 38. P. 133–165.
91. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell.* 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
92. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., et al. // *Science.* 2007. V. 318. P. 1917–1920.
93. Rao M., Condit M.L. // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. P. 1–10.
94. Maehr R., Chen S., Snitow M., Ludwig T., Yagasaki L., Goiland R., Leibel R.L., Melton D.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 15768–15773.
95. Zhang D., Jiang W., Liu M., Sui X., Yin X., Chen S., Shi Y., Deng H. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 429–438.
96. Jiang J., Au M., Lu K., Eshpeter A., Korbitt G., Fisk G., Majumdar A.S. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. P. 1940–1953.
97. Chen S., Borowiak M., Fox J.L., Maehr R., Osafune K., Davidson L., Lam K., Peng L.F., Schreiber S.L., Rubin L.L., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. P. 258–265.
98. Tateishi K., He J., Taranova O., Liang G., D'Alessio A.C., Zhang Y. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 31601–31607.
99. Kroon E., Martinson L.A., Kadoya K., Bang A.G., Kelly O.G., Eliazar S., Young H., Richardson M., Smart N.G., Cunningham J., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 443–452.
100. D'Amour K.A., Agulnick A.D., Eliazar S., Kelly O.G., Kroon E., Baetge E.E. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1534–1541.
101. Mfopou J.K., Chen B., Mateizel I., Sermon K., Bouwens L. // *Gastroenterology.* 2010. V. 138. P. 2233–2245.
102. Johansson M., Ståhlberg A., Ameri J., Sand F.W., Norrman K., Semb H. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 3. e4794.
103. D'Amour K.A., Bang A.G., Eliazar S., Kelly O.G., Agulnick A.D., Smart N.G., Moorman M.A., Kroon E., Carpenter M.K., Baetge E.E. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 1392–1401.
104. McLean A.B., D'Amour K.A., Jones K.L., Krishnamoorthy M., Kulik M.J., Reynolds D.M., Sheppard A.M., Liu H., Xu Y., Baetge E.E., et al. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. P. 29–38.
105. Shim J.H., Kim S.E., Woo D.H., Kim S.K., Oh C.H., McKay R., Kim J.H. // *Diabetologia.* 2007. V. 50. P. 1228–1238.
106. Kubo A., Shinozaki K., Shannon J.M., Kouskoff V., Kennedy M., Woo S., Fehling H.J., Keller G. // *Development.* 2004. V. 131. P. 1651–1662.
107. Takeuchi H., Nakatsuji N., Suemori H. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4488.
108. Kunisada Y., Tsubooka-Yamazoe N., Shoji M., Hosoya M. // *Stem Cell Res.* 2012. V. 8. P. 274–284.
109. Borowiak M., Maehr R., Chen S., Chen A.E., Tang W., Fox J.L., Schreiber S.L., Melton D.A. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. P. 348–358.
110. Bose B., Shenoy S.P., Konda S., Wangikar P. // *Cell Biol. Internat.* 2012. V. 36. P. 1013–1020.
111. Gage B.K., Webber T.D., Kieffer T.J. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e82076.
112. Basford C.L., Prentice K.J., Hardy A.B., Sarangi F., Micallef S.J., Li X., Guo Q., Elefanty A.G., Stanley E.G., Keller G., et al. // *Diabetologia.* 2012. V. 55. P. 358–371.
113. Micallef S.J., Li X., Schiesser J.V., Hirst C.E., Yu Q.C., Lim S.M., Nostro M.C., Elliott D.A., Sarangi F., Harrison L.C., et al. // *Diabetologia.* 2012. V. 55. P. 694–706.
114. Rezanian A., Bruin J.E., Riedel M.J., Mojibian M., Asadi A., Xu J., Gauvin R., Narayan K., Karanu F., O'Neil J.J., et al. // *Diabetes.* 2012. V. 61. P. 2016–2029.
115. Rezanian A., Bruin J.E., Xu J., Narayan K., Fox J.K., O'Neil J.J., Kieffer T.J. // *Stem Cells.* 2013. V. 31. P. 2432–2442.
116. Schulz T.C., Young H.Y., Agulnick A.D., Babin M.J., Baetge E.E., Bang A.G., Bhoumik A., Cepa I., Cesario R.M., Haakmeester C., et al. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e37004.
117. Kirk K., Hao E., Lahmy R., Itkin-Ansari P. // *Stem Cell Res.* 2014. V. 12. P. 807–814.
118. Bruin J.E., Rezanian A., Xu J., Narayan K., Fox J.K., O'Neil J.J., Kieffer T.J. // *Diabetologia.* 2013. V. 56. P. 1987–1998.
119. Pagliuca F.W., Millman J.R., Gürtler M., Segel M., Van Dervort A., Ryu J.H., Peterson Q.P., Greiner D., Melton D.A. // *Cell.* 2014. V. 159. № 2. P. 428–439.
120. Xie R., Everett L.J., Lim H.W., Patel N.A., Schug J., Kroon E., Kelly O.G., Wang A., D'Amour K.A., Robins A.J., et al. // *Stem Cell.* 2013. V. 12. P. 224–237.
121. Blum B., Hrvatin S.S., Schuetz C., Bonal C., Rezanian A., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 30. P. 261–264.
122. Noguchi H., Kaneto H., Weir G.C., Bonner-Weir S. // *Diabetes.* 2003. V. 52. P. 1732–1737.
123. Koya V., Lu S., Sun Y.P., Purich D.L., Atkinson M.A., Li S.W., Yang L.J. // *Diabetes.* 2008. V. 57. № 3. P. 757–769.
124. Noguchi H., Xu G., Matsumoto S., Kaneto H., Kobayashi N., Bonner-Weir S., Hayashi S. // *Cell Transplant.* 2006. V. 15. № 10. P. 929–938.
125. Kopinke D., Murtaugh L.C. // *BMC Dev. Biol.* 2010. V. 10. № 38. doi:10.1186/1471-213X-10-38.
126. Okuno M., Minami K., Okumachi A., Miyawaki K., Yokoi N., Toyokuni S., Seino S. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007. V. 292. P. 158–165.
127. Lardon J., Huyens N., Rooman I., Bouwens L. // *Virchows Arch.* 2004. V. 444. P. 61–65.
128. Lipsett M., Finegood D.T. // *Diabetes.* 2002. V. 51. P. 1834–1841.
129. Desai B.M., Oliver-Krasinski J., De Leon D.D., Farzad C., Hong N., Leach S.D., Stoffers D.A. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. P. 971–977.
130. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. // *Nature.* 2008. V. 455. № 7213. P. 627–632.
131. Cabrera O., Berman D.M., Kenyon N.S., Ricordi C., Berggren P.O., Caicedo A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 7. P. 334–339.
132. Konstantinova I., Nikolova G., Ohara-Imaizumi M., Meda P., Kucera T., Zarbalis K., Wurst W., Nagamatsu S., Lammert E. // *Cell.* 2007. V. 129. № 2. P. 359–370.
133. Zhang T., Saunee N.A., Breslin M.B., Song K., Lan M.S. // *J. Cell Physiol.* 2012. V. 227. № 6. P. 2470–2479.
134. Lima M.J., Muir K.R., Docherty H.M., Drummond R., McGowan N.W., Forbes S., Heremans Y., Houbracken I., Ross J.A., Forbes S.J., et al. // *Diabetes.* 2013. V. 62. № 8. P. 2821–2833.
135. Wang A.Y., Ehrhardt A., Xu H., Kay M.A. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 2. P. 255–263.
136. Collombat P., Xu X., Ravassard P., Sosa-Pineda B., Dussaud S., Billestrup N., Madsen O.D., Serup P., Heimberg H., Mansouri A. // *Cell.* 2009. V. 138. P. 449–462.
137. Yang Y.P., Thorel F., Boyer D.F., Herrera P.L., Wright C.V. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. P. 1680–1685.
138. Chung C.H., Hao E., Piran R., Keinan E., Levine F. // *Stem Cells.* 2010. V. 28. P. 1630–1638.
139. Thorel F., Nepote V., Avril I., Kohno K., Desgraz R., Chera S., Herrera P.L. // *Nature.* 2010. V. 464. P. 1149–1154.



140. Nir T, Melton D.A., Dor Y. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. P. 2553–2561.
141. Fujikawa T, Oh S.-H., Pi L., Hatch H.M., Shupe T, Petersen B.E. // *Am. J. Pathol.* 2005. V. 166. P. 1781–1791.
142. Enseñat-Waser R., Santana A., Vicente-Salar N., Cigudosa J.C., Roche E., Soria B., Reig J.A. // *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2006. V. 42. P. 115–123.
143. Fernandes K.J., McKenzie I.A., Mill P., Smith K.M., Akhavan M., Barnabé-Heider F., Biernaskie J., Junek A., Kobayashi N.R., Toma J.G. // *Nat. Cell Biol.* 2004. V. 6. P. 1082–1093.
144. Toma J.G., McKenzie I.A., Bagli D., Miller F.D. // *Stem Cells.* 2005. V. 23. P. 727–737.
145. Bi D., Chen F.G., Zhang W.J., Zhou G.D., Cui L., Liu W., Cao Y. // *BMC Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 46.
146. Kim B., Yoon B.S., Moon J.-H., Kim J., Jun E.K., Lee J.H., Kim J.S., Baik C.S., Kim A., Whang K.Y. // *Exp. Mol. Med.* 2012. V. 44. P. 26–35.
147. Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J., Barnabé-Heider F., Sadikot A., Kaplan D.R., Miller F.D. // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. P. 778–784.
148. Bakhtiari M., Mansouri K., Sadeghi Y., Mostafaie A. // *Cell Prolif.* 2012. V. 45. P. 148–157.
149. Mehrabi M., Mansouri K., Hosseinkhani S., Yarani R., Yari K., Bakhtiari M., Mostafaie A. // *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2015. V. 51. № 6. P. 595–603.
150. Da Silva M.L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. № 11. P. 2204–2213.
151. Trounson A // *BMC Med.* 2009. V. 7. P. 29.
152. Kang H.M., Kim J., Park S., Kim J., Kim H., Kim K.S., Lee E.J., Seo S.I., Kang S.G., Lee J.E., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. № 8. P. 1999–2008.
153. Le Douarin N.M., Cruzet S., Couly G., Dupin E. // *Development.* 2004. V. 131. № 19. P. 4637–4650.
154. Huang C.Y., Peláez D., Domínguez-Bendala J., Garcia-Godoy F., Cheung H.S. // *Regen. Med.* 2009. V. 4. № 6. P. 809–821.
155. Prabakar K.R., Domínguez-Bendala J., Molano R.D., Pileggi A., Villate S., Ricordi C., Inverardi L. // *Cell Transplant.* 2012. V. 21. № 6. P. 1321–1339.
156. Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 10. P. 2648–2659.
157. Ball S.G., Shuttleworth C.A., Kielty C.M. // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. V. 11. № 5. P. 1012–1030.
158. Ferber S., Halkin A., Cohen H., Ber I., Einav Y., Goldberg I., Barshack I., Seiffers R., Kopolovic J., Kaiser N., Karasik A. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 5. P. 568–572.
159. Horb M.E., Shen C.N., Tosh D., Slack J.M. // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. № 2. P. 105–115.
160. Li W.C., Horb M.E., Tosh D., Slack J.M. // *Mech. Dev.* 2005. V. 122. № 6. P. 835–847.
161. Bonner-Weir S., Li W.C., Ouziel-Yahalom L., Guo L., Weir G.C., Sharma A. // *Diabetes.* 2010. V. 59. P. 2340–2348.
162. Gianani R., Putnam A., Still T., Yu L., Miao D., Gill R.G., Beilke J., Supon P., Valentine A., Iveson A., et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006. V. 91. P. 1855–1861.
163. Dor Y., Melton D.A. // *Cell.* 2008. V. 132. P. 183–184.
164. Li Y., Peng M., Gong G. // *Exp. Ther. Med.* 2014. V. 7. P. 131–136.
165. Basta G., Racanicchi L., Mancuso F., Guido L., Luca G., Macchiarulo G., Brunetti P., Calafiore R. // *Transplant. Proc.* 2004. V. 36. P. 2857–2863.
166. Liu T., Wang C.Y., Yu F., Gou S.M., Wu H.S., Xiong J.X., Zhou F. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. P. 5232–5237.
167. Anastasi E., Ponte E., Gradini R., Bulotta A., Sale P., Tiberti C., Okamoto H., Dotta F., Di Mario U. // *Eur. J. Endocrinol.* 1999. V. 141. P. 644–652.
168. Higuchi Y., Herrera P., Muniesa P., Huarte J., Belin D., Ohashi P., Aichele P., Orci L., Vassalli J.D., Vassalli P. // *J. Exp. Med.* 1992. V. 176. P. 1719–1731.
169. Gu D., Arnush M., Sawyer S.P., Sarvetnick N. // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 269. P. 1089–1094.
170. Kritzik M.R., Jones E., Chen Z., Krakowski M., Krahl T., Good A., Wright C., Fox H., Sarvetnick N. // *J. Endocrinol.* 1999. V. 163. P. 523–530.
171. Tanaka S., Kobayashi T., Nakanishi K., Okubo M., Murase T., Hashimoto M., Watanabe G., Matsushita H., Endo Y., Yoshizaki H., et al. // *Diabetes Care.* 2001. V. 24. P. 1661–1667.
172. Baeyens L., Lemper M., Leucx G., De Groef S., Bonfanti P., Stangé G., Shemer R., Nord C., Scheel D.W., Pan F.C., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. № 1. P. 76–83.
173. Egéa J.C., Hirtz C., Gross R., Lajoix A.D., Traskawka E., Ribes G., de Périère D.D. // *Eur. J. Oral. Sci.* 2000. V. 108. № 4. P. 292–296.
174. Smith P.H., Patel D.G. // *Diabetes.* 1984. V. 33. № 7. P. 661–666.
175. Shubnikova E.A., Pogodina L.S. // *Ontogenez.* 2000. V. 31. № 6. P. 476–480.
176. Gvazava I.G., Vasiliev A.V., Balan O.V., Terskikh V.V. // *Tsitologiya.* 2011. V. 53. № 2. P. 129–134.
177. Okumura K., Nakamura K., Hisatomi Y., Nagano K., Tanaka Y., Terada K., Sugiyama T., Umeyama K., Matsumoto K., Yamamoto T., et al. // *Hepatology.* 2003. V. 38. P. 104–113.
178. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. // *Hepatology.* 2004. V. 39. № 3. P. 667–675.
179. Sato A., Okumura K., Matsumoto S., Hattori K., Hattori S., Shinohara M., Endo F. // *Cloning Stem Cells.* 2007. V. 9. № 2. P. 191–205.
180. Baek H., Noh Y.H., Lee J.H., Yeon S.I., Jeong J., Kwon H. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2014. V. 8. № 9. P. 717–727.
181. Vacanti J.P., Langer R. // *Lancet.* 1999. V. 354. P. 32–34.
182. Chun S., Huang Y., Xie W.J., Hou Y., Huang R.P., Song Y.M., Liu X.M., Zheng W., Shi Y., Song C.F. // *Transplant. Proc.* 2008. V. 40. P. 1658.
183. Kawazoe N., Tateishi T. // *J. Bioact. Compat. Polym.* 2009. V. 24. P. 25.
184. Kaufman-Francis K., Koffler J., Weinberg N., Dor Y., Levenberg S. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e40741.
185. Hynes R.O. // *Science.* 2009. V. 326. № 5957. P. 1216–1219.
186. Otonkoski T., Banerjee M., Korsgren O., Thornell L.E., Virtanen I. // *Diabetes Obes. Metab.* 2008. V. 10. № 4. P. 119–127.
187. Edamura K., Nasu K., Iwami Y., Ogawa H., Sasaki N., Ohgawara H. // *Cell Transplant.* 2003. V. 12. № 4. P. 439–446.
188. Stendahl J.C., Kaufman D.B., Stupp S.I. // *Cell Transplant.* 2009. V. 18. № 1. P. 1–12.
189. Montesano R., Mouron P., Amherdt M., Orci L. // *J. Cell Biol.* 1983. V. 97. № 3. P. 935–939.
190. Weber L.M., Hayda K.N., Anseth K.S. // *Tissue Eng. Part A.* 2008. V. 14. № 12. P. 1959–1968.
191. Wang R.N., Rosenberg L. // *J. Endocrinol.* 1999. V. 163. № 2. P. 181–190.
192. Rosenberg L., Wang R., Paraskevas S., Maysinger D. // *Surgery.* 1999. V. 126. № 2. P. 393–398.
193. Meda P., Hooghe-Peters E.L., Orci L. // *Diabetes.* 1980. V. 29. № 6. P. 497–500.
194. Rabinovitch A., Russell T., Mintz D.H. // *Diabetes.* 1979. V. 28. № 12. P. 1108–1113.
195. Thivolet C.H., Chatelain P., Nicoloso H., Durand A., Bertrand J. // *Exp. Cell Res.* 1985. V. 159. № 2. P. 313–322.
196. Lucas-Clerc C., Massart C., Champion J.P., Launois B., Nicol M. // *Mol. Cell Endocrinol.* 1993. V. 94. № 1. P. 9–20.

197. Han B., Qi S., Hu B., Luo H., Wu J. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 10. P. 5833–5844.
198. Crisera C.A., Maldonado T.S., Kadison A.S., Li M., Alkasab S.L., Longaker M.T., Gittes G.K. // *Differentiation.* 2000. V. 65. № 5. P. 255–259.
199. Salvatori M., Katari R., Patel T., Peloso A., Mugweru J., Owusu K., Orlando G. // *J. Diabetes Sci. Technol.* 2014. V. 8. № 1. P. 159–169.
200. Song J.J., Ott H.C. // *Trends Mol. Med.* 2011. V. 17. № 8. P. 424–432.
201. Orlando G., Baptista P., Birchall M., De Coppi P., Farney A., Guimaraes-Souza N.K., Opara E., Rogers J., Seliktar D., Shapira-Schweitzer K., et al. // *Transpl. Int.* 2011. V. 24. № 3. P. 223–232.
202. Orlando G., Wood K.J., Stratta R.J., Yoo J.J., Atala A., Soker S. // *Transplantation.* 2011. V. 91. № 12. P. 1310–1317.
203. Orlando G., Wood K.J., De Coppi P., Baptista P.M., Binder K.W., Bitar K.N., Breuer C., Burnett L., Christ G., Farney A., et al. // *Ann. Surg.* 2012. V. 255. № 5. P. 867–880.
204. Badylak S.F., Weiss D.J., Caplan A., Macchiarini P. // *Lancet.* 2012. V. 379. № 9819. P. 943–952.
205. Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. № 19. P. 3675–3683.
206. Mirmalek-Sani S.H., Orlando G., McQuilling J.P., Pareta R., Mack D.L., Salvatori M., Farney A.C., Stratta R.J., Atala A., Opara E.C., et al. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 22. P. 5488–5495.
207. Baptista P.M., Siddiqui M.M., Lozier G., Rodriguez S.R., Atala A., Soker S. // *Hepatology.* 2011. V. 53. № 2. P. 604–617.
208. Song J.J., Kim S.S., Liu Z., Madsen J.C., Mathisen D.J., Vacanti J.P., Ott H.C. // *Ann. Thorac. Surg.* 2011. V. 92. № 3. P. 998–1006.
209. Loai Y., Yeger H., Coz C., Antoon R., Islam S.S., Moore K., Farhat W.A. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2010. V. 94. № 4. P. 1205–1215.
210. Wicha M.S., Lowrie G., Kohn E., Bagavandoss P., Mahn T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 10. P. 3213–3217.

УДК 602.7

# Тканевая инженерия опухолей с использованием биореакторных технологий

А. Е. Гуллер<sup>1-4\*</sup>, П. Н. Гребенюк<sup>5\*</sup>, А. Б. Шехтер<sup>3</sup>, А. В. Звягин<sup>1-4</sup>, С. М. Деев<sup>4,6,7</sup>

<sup>1</sup>Macquarie University, Sydney, 2109, New South Wales, Australia

<sup>2</sup>ARC Centre of Excellence for Nanoscale BioPhotonics, Macquarie University, Sydney, 2109, New South Wales, Australia

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Институт регенеративной медицины, 119992, Москва, ул. Трубецкая, 8, Россия

<sup>4</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23, Россия

<sup>5</sup>Inetex LTD, Plaut St. no. 10, Rehovot, 76706, Israel

<sup>6</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Россия

<sup>7</sup>Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 30, Россия

\*E-mail: anna.guller@mq.edu.au

\*Авторы, внесшие равный вклад в представленную работу.

Поступила в редакцию 09.06.2016

**РЕФЕРАТ** Обзор посвящен проблеме моделирования злокачественных опухолей с использованием технологий тканевой инженерии. Тканевая инженерия опухолей (ТИО) – новый метод трехмерного (3D) моделирования злокачественных новообразований, основанный на создании комплексных тканеинженерных конструкций (ТИК), включающих в себя малигнизированные клетки, клеточные носители-скаффолды, играющие роль внеклеточного матрикса, а также другие компоненты опухолевого микроокружения. В ряде случаев ТИК могут трансплантироваться в организм лабораторных животных, однако специфической задачей ТИО является максимально реалистичное воспроизведение и длительное поддержание свойств моделируемой опухоли *in vitro*, прежде всего, с целью изучения биологии рака и разработки новых методов терапии и диагностики неоплазий. Успех реализации этой трудной задачи во многом зависит от технологического прогресса в области создания биореакторов – устройств, обеспечивающих оптимизацию условий культивирования и управление развитием опухолевых ТИК. В обзоре рассмотрены возможности использования основных типов биореакторов в ТИО.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** биореакторы, моделирование, рак, тканевая инженерия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 2D – двумерный – культура клеток и тканей в монослое (двумерная культура); 3D – трехмерный; БР – биореактор; ДЦЛ – децеллюляризация; ДЦЛ-матрикс, ДЦЛ-ткань, ДЦЛ-орган – децеллюляризованный матрикс, децеллюляризованная ткань и децеллюляризованный орган соответственно; РЦЛ – рецеллюляризация; ТИ – тканевая инженерия; ТИК – тканеинженерная конструкция; ТИО – тканевая инженерия опухолей; ТМО – тканеинженерная модель опухоли; SCID – лабораторные мыши с врожденным тяжелым комбинированным иммунодефицитом (severe combined immunodeficiency mice).

Аббревиатуры, используемые в англоязычной литературе для обозначения роторных биореакторов различных типов: RWV – rotating-wall vessels, rotating-wall bioreactors (биореакторы с вращающимися стенками); RCCS – rotary cell culture systems (роторные системы для культивирования клеток); HARV – high aspect reactor vessels (биореактор с высоким соотношением линейных размеров, вертикальный цилиндрический роторный биореактор); STLV – slow turning lateral vessels (роторные биореакторы с медленно вращающимися стенками); RWPV – rotating-wall perfusion vessels (роторно-перфузионный биореактор); NASA bioreactor – общее название роторных биореакторов, разработанных NASA, как правило, RWV, HARV или STLV.

## ВВЕДЕНИЕ

Метод культуры клеток и тканей *in vitro* является традиционным инструментом исследований в области биологии рака и создания новых методов профилактики, диагностики и лечения этого класса заболеваний. Первичные и линейные клетки опухолей человека и животных представляют собой чрезвычайно удобный объект для изучения молекулярных и клеточных механизмов злокачественного роста и оценки эффектов лекарств. Однако около 95% препаратов, проявивших хороший противоопухолевый эффект в экспериментах на клеточных культурах и лабораторных животных, во время клинических испытаний обнаруживают недостаточную эффективность или неприемлемую токсичность [1]. Возможным и правдоподобным объяснением является недостаточная релевантность существующих *in vitro* и *in vivo* моделей рака по отношению к сложным по структуре, гетерогенным по клеточному составу и постоянно изменяющимся во времени реальным опухолям человека [1–3].

К числу важнейших факторов, сопровождающих эксперименты на традиционных культурах клеток в монослое (2D), относятся селекция специфического, адаптированного к росту на культуральном пластике фенотипа клеток из первоначально крайне гетерогенной опухолевой клеточной популяции, аномальная поляризация клеток, связанная с ограниченной экспозицией поверхности клеток к культуральной среде, резкое сокращение клеточно-клеточных контактов, отсутствие клеточно-матриксных взаимодействий и метаболических градиентов [4–6]. В совокупности это приводит к невозможности воспроизведения в 2D-культуре таких критически значимых в биологии рака явлений [7], как гетерогенность клеточных популяций, формирующих опухоль, взаимодействие опухоли с ее микроокружением и организмом в целом (рис. 1).

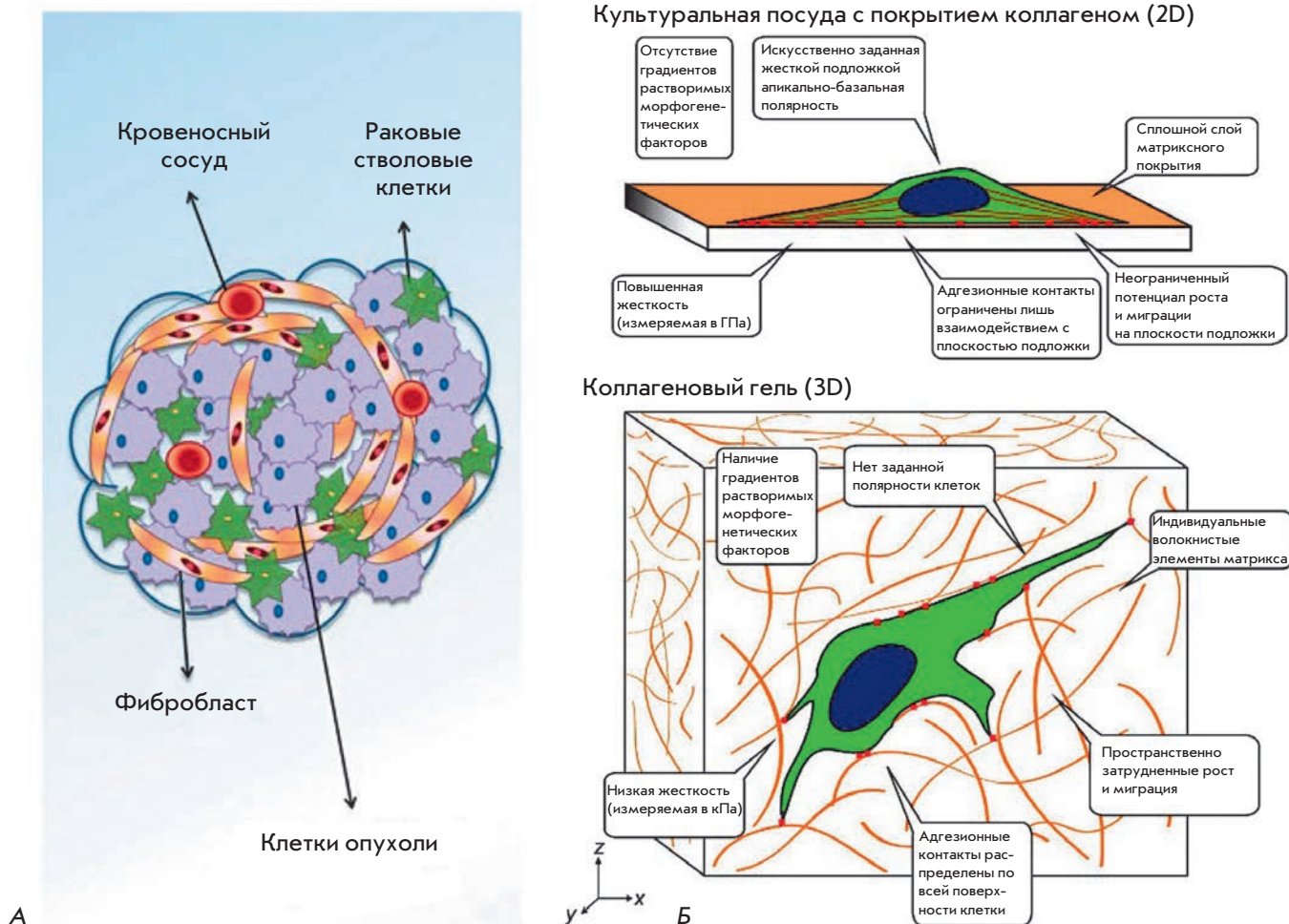
Модели рака на лабораторных животных также не лишены недостатков. Так, при использовании одного из наиболее популярных подходов – моделировании человеческих опухолей на мышцах путем имплантации клеточных аллографтов – гистологические особенности неоплазий человека воспроизводятся не вполне точно или не могут быть воспроизведены вообще (рис. 2А–Г). Кроме того, срок жизни лабораторных животных, как правило, меньше периода возникновения метастазов [8]. Относительно приближенной к реальности моделью опухолей человека являются ксенографты, полученные из опухолевой ткани пациентов и трансплантируемые мышцам с подавленной иммунной системой (*nude*, *SCID*) [10, 11]. Такие модели относительно адекватно отражают структуру и функционирование опухоли человека

на тканевом уровне (рис. 2Д,Е), а организм-носитель выполняет такую же роль, которая отводится питательной среде в культурах *in vitro*. В то же время физиология бестимусных или *SCID* мышей значительно отличается от человеческой, а значительная стоимость и низкая воспроизводимость моделей ограничивают возможности их применения.

Стремление более точно воссоздать гистологическое строение и поведение опухолей привело к разработке технологий сокультивирования клеток различных типов и созданию трехмерных (3D) моделей опухолей. К числу последних относятся многоклеточные сфероиды, а также культуры раковых клеток на матрицах различного состава и строения (гелевых, волокнистых и др.). Один из наиболее перспективных подходов – тканевая инженерия опухолей (ТИО) – новый метод 3D-моделирования злокачественных новообразований, основанный на создании комплексных конструкций, включающих в себя малигнизированные клетки, плотные пористые или волокнистые клеточные носители-скаффолды, играющие роль внеклеточного матрикса, а также другие компоненты опухолевого микроокружения. Тканеинженерные модели опухолей (ТМО) предназначены для изучения биологии рака и разработки методов диагностики и терапии злокачественных новообразований. Основные принципы ТИО, ее преимущества, ограничения и реализованные модели подробно обсуждаются в нескольких обзорах [8, 13–19].

Как следует из приведенного выше определения, ТИО базируется на принципах тканевой инженерии (ТИ) нормальных тканей в части комбинирования определенных клеток и скаффолдов с последующим управлением ходом развития полученных тканеинженерных конструкций (ТИК) [20], но служит для решения не лечебных, а исследовательских задач. В общем случае тканеинженерная модель *здоровой ткани* представляет собой 3D-культуру *нормальных клеток* на скаффолде – ТИК, которая «собирается» и «созревает» *in vitro* и затем имплантируется в организм пациента для замещения поврежденных или утраченных тканей или органов. После этого должно произойти приживание реконструированной структуры, обеспечивающее ее жизнеспособное состояние и выполнение поставленной функциональной задачи. Очень часто ТИК, применяемые в регенеративной медицине, представляют собой временные функциональные тканевые или органые протезы, которые впоследствии должны подвергаться биорезорбции и полному замещению собственными тканями организма. Раковые ТИК, напротив, должны включать, в первую очередь, *малигнизированные клетки*, длительно существовать и обладать струк-

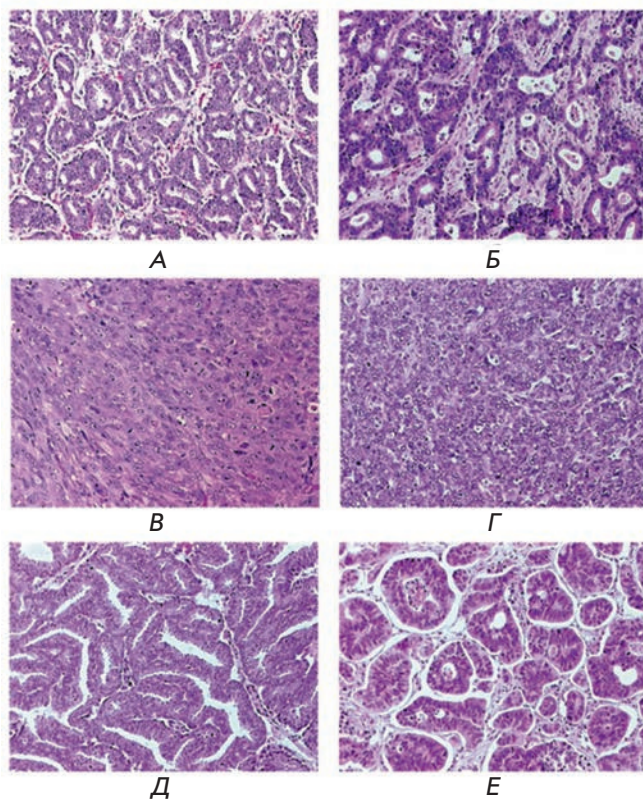




**Рис. 1.** Схема строения злокачественной опухоли человека (А) и изменения, происходящие при 2D- и 3D-культивировании клеток *in vitro* (Б). А – опухоль является объемным образованием, внутри которого в силу местных особенностей кровообращения, механических условий и иннервации формируются метаболические градиенты, в свою очередь, усиливающие генетическую нестабильность малигнизированных клеток, преимущественную селекцию определенных фенотипов, а также обуславливающие динамические ответы пула раковых стволовых клеток. В состав опухоли входят также резидентные клетки пораженного органа и клетки воспалительного инфильтрата (в основном, макрофаги и лимфоциты, в ряде случаев, нейтрофилы, эозинофильные и плазматические клетки). Внеклеточный матрикс, сосуды и участки соединительной ткани составляют второй обязательный компонент – строму опухоли. Степень развития стромы в различных видах злокачественных новообразований варьирует и существенно влияет на динамику развития заболевания и лекарственную устойчивость. В структуре опухоли могут присутствовать одновременно как участки с активным ростом, так и зоны некроза, участки геморрагий и гнойного расплавления тканей [8]. Б – изменения, вызванные культивированием в 2D-условиях, обусловлены селекцией специфических клеточных фенотипов и искажением взаимоотношений клеток с микро- и макроокружением [9]

турным и функциональным сходством с моделируемыми опухолями уже в условиях *in vitro*, поскольку именно на этом этапе они могут быть использованы в качестве объектов исследований. Опухолевые ТИК также могут быть имплантированы в организм лабораторных животных, например, с целью изучения ангиогенного, инвазивного и метастатического

потенциала, однако, использование подобных биологических тканей *in vitro* представляется наиболее привлекательным с точки зрения возможности улучшения воспроизводимости результатов, создания высокопроизводительных тест-систем для фармакологических тестов, а также сокращения объема экспериментов на животных.



**Рис. 2.** Сравнение гистологического строения рака предстательной железы (А, В, Д) и толстого кишечника (Б, Г, Е) в биоптатах первичных опухолей человека (А, Б) со структурой моделей этих же опухолей, воспроизводимых на мышах (В–Е). Модели, полученные путем культивирования *in vitro* и последующей имплантации мышам аллографтов из линейных клеток РС-3М (В) и Colo205 (Г), имеют гомогенную организацию, в которой утрачены патогномичные glandularные элементы из клеток опухоли, а стромальный компонент практически отсутствует. При подкожной имплантации мышам SCID ксенографтов, полученных из фрагментов интраоперационных биоптатов соответствующих первичных опухолей человека, наблюдаются выраженные искажения опухолево-стромальных соотношений (Д, Е). По материалам [12]

Различия в скорости роста, дифференцировке и обмене веществ между нормальными и раковыми клетками позволяют обойти типичную для регенеративной медицины проблему наращивания клеточной популяции в составе ТИК (например, в ходе управляемой дифференцировки стволовых клеток). С другой стороны, эти обстоятельства обуславливают необходимость создания новых методов и систем 3D-культивирования, позволяющих формировать и поддерживать объемные, метаболически активные тканевые структуры вне организма, а значит, в от-

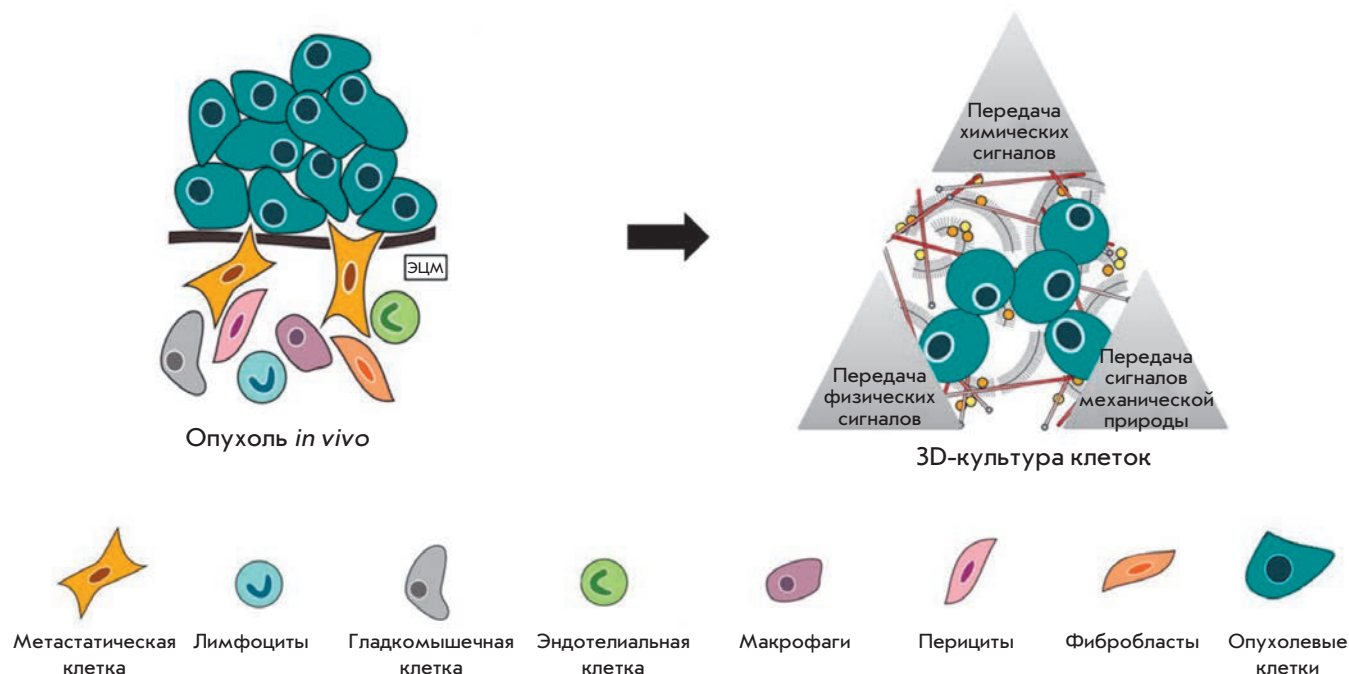
сутствие нормальных систем гомеостаза. Подобная по сложности задача в определенной мере решается в современных системах временного хранения и жизнеобеспечения донорских органов.

В тканевой инженерии для выращивания ТИК и их поддержания в жизнеспособном состоянии до имплантации используются биореакторы (БР) [21] – инженерные системы, предназначенные для автоматизации процессов культивирования клеток и тканей *in vitro* и обеспечивающие оптимальные для развития ТИК физико-химические условия. Задачей настоящего обзора является анализ современного состояния тканеинженерного моделирования злокачественных опухолей с использованием биореакторных технологий.

### КОМПОНЕНТЫ ОПУХОЛЕВЫХ ТИК

Главными компонентами ТИК являются клетки и скаффолды (рис. 3). Клетки могут быть представлены одним или несколькими типами одновременно (например, гепатоцитами и фибробластами при моделировании печени), однако, тканевую специфичность ТИК определяет наиболее многочисленная клеточная популяция. В частности, основу клеточного компонента опухолевых ТИК могут составлять как первичные клетки, выделенные из биопсийных фрагментов опухоли (из исходного или метастатического очага), так и линейные раковые клетки, полученные путем специальных процедур селекции и культивирования. Могут подбираться клетки различной степени дифференцировки, а также с различным метастатическим потенциалом. Помимо опухолевых клеточных популяций, в состав ТМО также могут включаться стромальные элементы (фибробласты, перициты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки), основные клетки резидентного органа (например, гепатоциты при моделировании опухолевого поражения печени или остеобласты и клетки костного мозга при исследовании неопластических процессов в костях), клетки воспалительного инфильтрата (макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы, плазматические клетки, эозинофилы) [22].

Скаффолды, представляющие собой биоактивные матрицы, выполняющие роль внеклеточного матрикса, не только служат механической опорой для клеток, но также влияют на их адгезию и подвижность (что включает серию сигнальных путей, чувствительных к организации цитоскелета), обеспечивают механическую и биохимическую интеграцию конструкции, стимулируют необходимую дифференцировку (в ТИК нормальных тканей) или поддерживают заданный фенотип и функциональную активность клеток. Архитектура скаффолдов обеспечивает формирование градиентов сигнальных молекул и кис-



**Рис. 3.** Принципы создания опухолевых ТИК. Для создания биомиметических опухолевых ТИК требуется включение в состав конструкции ключевых компонентов опухоли (как минимум, опухолевых клеток и скаффолда, представляющего внеклеточный матрикс (ЭЦМ)), а также воспроизведение условий их существования (включение значимых физических и химических сигнальных факторов). Адаптировано из [23]

лорода в ТИК, дает возможность изучения роли клеточно-матриксных взаимодействий в регуляции канцерогенеза с учетом взаимного влияния механических факторов, нанорельефа, геометрии матрикса и адгезии клеток [24].

Для создания скаффолдов используются волокнистые и пористые материалы, изготовленные из синтетических полимеров (например, полилактата, поликапролактона, полилактогликолида) или материалов натурального происхождения (коллагена, хитозана, гиалуроновой кислоты) [17], а также специальным образом обработанные натуральные ткани и органы [25, 26]. Важнейшим преимуществом синтетических скаффолдов, создаваемых с помощью инженерных методов, таких, как электроспиннинг, 3D-печать и т.п., является высокая степень определенности химического состава и возможность тонкого контроля пространственной организации и механических свойств, что позволяет изучать влияние единичных сигнальных факторов на морфогенез ткани. Однако зачастую подобные скаффолды без дополнительной модификации не поддерживают в необходимой степени адгезию и продолжительную пролиферацию клеток. Кроме того, они обладают лишь отдаленным сходством с оригинальной моделируе-

мой тканью и, в сущности, являются, пусть и существенно улучшенным, 3D-аналогом культуральных емкостей. Скаффолды, изготавливаемые из полимеров натурального происхождения, характеризуются высокой биосовместимостью, но при этом возможности точного контроля их состава, управления их геометрией и биомеханическими свойствами лимитированы [17].

Альтернативный подход предполагает обработку натуральных тканей или органов с удалением всех клеточных элементов и максимальным сохранением состава и структуры внеклеточного матрикса. Этот процесс называется децеллюляризацией (ДЦЛ), а получаемые скаффолды – децеллюляризованными тканями, или бесклеточными матриксами, тканями или органами (ДЦЛ-матрикс, ДЦЛ-ткань, ДЦЛ-орган) [26, 27]. Таким образом, ДЦЛ обеспечивает получение скаффолдов, весьма близко к реальности воспроизводящих естественное микроокружение клеток в составе ткани или органа. Современные методы ДЦЛ позволяют создавать скаффолды, содержащие не только компоненты внеклеточного матрикса, такие, как, например, коллагеновые и эластические волокна, но также и поддерживать целостность базальных мембран кровеносных со-



судов, что обеспечивает формирование единой сети «протососудов» (децеллюляризованных стенок кровеносных сосудов различного калибра), которые позднее могут быть использованы для питания создаваемой биоинженерной ткани. Эта возможность принципиально важна, поскольку проблема питания внутренних областей ТИК является одной из наиболее сложных в тканевой инженерии в целом и критически значимой для ТИО.

### **ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ «СБОРКИ» И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ, ТРЕБУЮЩИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОРЕАКТОРОВ**

Биореакторы – это замкнутые системы, в которых биологические процессы протекают при строго контролируемых условиях [28]. Эта концепция не является чем-то принципиально новым и не ограничивается тканевой инженерией. Биотехнологи давно используют БР (хемостаты, ферментеры) для выращивания культур микроорганизмов и получения различных клеточных продуктов. Типичная биореакторная система включает в себя емкость, изолированную от влияния внешней среды (колбу, сосуд, камеру), исполнительные устройства (насосы, двигатели и т.д.), датчики, а также, очень часто, специальные контроллеры и программное обеспечение для управления биотехнологическим процессом или слежения за его ходом. В БР, предназначенных для ТИ, выращивают клетки и ТИК, а также исследуют влияние биохимических и биомеханических факторов на развитие клеток и тканей. В процессе «сборки» опухолевых ТИК и их дальнейшего культивирования *in vitro* можно выделить несколько ключевых проблем, оптимальное решение которых требует использования биореакторных технологий.

#### **Наращивание клеточных популяций**

Размеры ТМО могут варьировать от нескольких кубических миллиметров до масштаба целого органа человека или животного, но в любом случае число необходимых клеток всегда многократно превышает объем типовых клеточных культур в монослое. Поэтому первым шагом при создании опухолевой ТИК является наращивание необходимого количества клеток заданных типов, что требует значительной площади поверхности, на которой они могут расти. Для сокультивирования нескольких типов клеток часто необходима их одновременная экспансия в разных условиях. В ряде случаев клеточные популяции для создания ТИК выращиваются в форме многоклеточных сфероидов, что также требует специальных условий культивирования. Роль БР при решении этих задач состоит в автоматизации и улучшенном контроле процесса культивирования клеток.

#### **Рецеллюляризация скаффолдов**

Второй шаг в создании ТИК состоит в заселении 3D-скаффолдов клетками – рецеллюляризации (РЦЛ) [29, 30]. Базовая методика статического культивирования предполагает нанесение клеток на скаффолд с помощью пипеток («раскапывание»), после чего клеточная популяция распределяется в матрице под действием силы тяжести, а также в результате самостоятельного движения клеток. Однако для создания сложных тканей и конструкций большого объема этот метод малоэффективен: он не позволяет добиться равномерного распределения клеток по объемной структуре, а значит, однородного и контролируемого развития ткани.

#### **Обеспечение питания и метаболизма ТИК**

Третий шаг – доставка веществ, необходимых для роста и функционирования клеток, и удаление продуктов метаболизма. Именно обеспечение контролируемого и оптимального по характеру воздействия на ткань массопереноса является самой важной целью биореакторных технологий [28]. В статической культуре *in vitro* это достигается периодической заменой питательной среды, но данный способ подходит лишь для экспериментов с небольшими по объему объектами культивирования (клетками в монослое или суспензии, тонкими срезами тканей). Известно, что диффузионный предел для кислорода в тканях организма человека составляет примерно 100–200 мкм [31]. При формировании ТИК без постоянного перемешивания или «прокачивания» среда достигает клеток лишь путем диффузии, а потому центральная часть конструкции получает недостаточно кислорода и питательных веществ, а удаление продуктов метаболизма происходит слишком медленно, что приводит к гипоксии, ацидозу и гибели клеток. Улучшают массоперенос конвекционные потоки жидкости, поэтому предпочтение должно быть отдано динамическим системам. Однако слишком активная динамика питательной среды может вызвать повреждение клеток и скаффолда вследствие сдвигового напряжения [32] из-за неравномерной динамики разных слоев жидкости. Соответственно важно соблюдать баланс между диффузионным и конвекционным транспортом, с одной стороны, и биомеханическими свойствами и метаболическими потребностями выращиваемых структур, с другой. Перспективным подходом к решению задачи транспорта кислорода в ТИК представляется использование БР со встроенными системами перфузии. Учитывая сложность работы с ТМО, процесс постоянной подачи свежей культуральной среды к ТИК и удаления продуктов метаболизма желательно автоматизировать и, в идеальном случае, контролиро-



вать в масштабе реального времени с помощью контуров обратной связи по биохимическим параметрам культуральной среды.

### **Контроль параметров состояния содержимого культуральной камеры БР**

Длительное поддержание стерильности критически важно для ТИО. Поскольку созревание модельной ткани может продолжаться в течение нескольких месяцев, контаминация ТИК практически однозначно означает потерю результатов длительной работы. Кроме того, материалы культуральной камеры БР должны быть биосовместимыми и биоинертными, т.е. не воздействовать на культивируемую ткань. В то же время эти материалы должны быть рассчитаны на применение во влажной среде при температуре 37°C, а при необходимости повторного использования выдерживать стерилизацию путем автоклавирования, радиационной или химической обработки. Изготовление камеры БР из прозрачного материала обеспечивает возможность визуального контроля и использования оптического имиджинга ТИК [21, 33, 34].

Контроль над физико-химическими параметрами среды, формирующейся в культуральной камере, и управление ими важны, с одной стороны, для поддержания жизнеспособности ТИК, а, с другой, для моделирования условий, характерных для внутренней среды опухолей, таких, как ацидоз, гипоксия и повышенное тканевое давление [35, 36]. Для исследовательских целей может возникнуть необходимость в регуляции температуры, рН и газового состава среды в культуральной камере, могут потребоваться внесение/удаление тех или иных сигнальных молекул, дозируемое механическое воздействие на формирующиеся ткани (давление, растяжение, изгиб и др.), создание особой электромагнитной среды или электрической стимуляции ТИК и др. [37].

### **ТИПЫ БИОРЕАКТОРОВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В ТИО**

Большинство БР влияют на ТИК через воздействие на культуральную среду. Выделяют шесть типов БР (табл. 1): 1) БР со статическими системами культивирования, 2) перемешивающие, 3) роторные, 4) пористо-волоконные, 5) перфузионные или 6) микрофлюидные БР. Кроме того, имеется особый класс БР, воздействующих на компоненты ТИК непосредственно – механически, с помощью электромагнитных и иных стимулов (они рассмотрены ниже в соответствующем разделе).

Ниже рассмотрены примеры использования различных типов БР в ТИО. Мы сочли необходимым в качестве дополнительных ключевых слов привести англоязычные названия типов биореакторов и их

конструктивных элементов из-за отсутствия соответствующих общепринятых терминов в русском языке.

### **СТАТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ТИО**

Первыми в тканевой инженерии начали использовать статические БР – обычные чашки Петри, флаконы и планшеты, в которых объекты культивирования и культуральная среда находятся в неподвижном состоянии. Культуральные емкости могут быть дополнены пористыми и волокнистыми скаффолдами, а также специальными сетчатыми вставками с определенным размером пор, что позволяет изучать эффекты сигнальных факторов с заданным размером молекул/носителей, миграционную и инвазионную активность клеток. В планшетах со специальными низкоадгезивными покрытиями или «гравитационными ловушками» можно получать многоклеточные сфероиды. Однако общей чертой статических систем культивирования является то, что массообмен в них происходит исключительно под действием силы тяжести и диффузии. Существенное преимущество статических БР – их коммерческая доступность и простота использования. Такие комплексы особенно востребованы при проведении высокопроизводительного скрининга фармакологических композиций.

С помощью статических БР созданы тканеинженерные модели рака молочной железы, легких и кишечника, саркомы Юинга, метастатического рака предстательной железы и ряда других неоплазий (табл. 2). Однако в отсутствие активного движения культуральной среды обычно удается поддерживать ТИК только на мембраноподобных скаффолдах толщиной до 1 мм. В более толстых матрицах рост клеток происходит преимущественно на поверхности скаффолда. Например, мы наблюдали такой эффект при статическом культивировании опухолевых клеток и нормального эпителия на срезах ДЦЛ-органа (почки) кролика [39] толщиной 3–4 мм, а также при РЦЛ трубчатой бесклеточной сосудистой матрицы [40] и гибридных скаффолдов [41] клетками буккального эпителия.

Преодолеть многие ограничения, характерные для статических схем культивирования, позволяют БР, в которых культуральная среда находится в движении (динамические культуральные методики).

### **ПЕРЕМЕШИВАЮЩИЕ БИОРЕАКТОРЫ**

Перемешивающие БР (spinner-flask bioreactor, spinner vessel, stirred tank) обеспечили качественный скачок в улучшении массообмена между клетками и культуральной средой. БР такого типа чаще всего представляет собой емкость со встроенным вращающимся элементом – спиннером (длинной ло-

Таблица 1. Сравнительная характеристика биореакторов с воздействием на ТИК, опосредованным через культуральную среду\*

Типы БР	Условия применения	Механизм массообмена	Сдвиговое напряжение	Специализация применительно к задачам опухолевой тканевой инженерии	Дискуссионные вопросы
Статические системы культивирования (традиционные культуральные емкости – планшеты, флаконы и т.п.)	Порционная замена культуральной среды	Диффузия	Очень слабое	Наращивание клеточной массы, получение многоклеточных сфероидов	Преодоление ограничений массообмена (создание гибридных конструкций типа перфузионных планшетов); автоматизация операций
Перемешивающие	Перемешивание среды при помощи специальных мешалок; встряхивание или вращение культуральных емкостей	Конвекция (высокая)	Высокое	ДЦЛ тканей и органов, получение сфероидов, РЦЛ ТИК	Баланс между массообменом и сдвиговым напряжением
Роторные	Перемешивание среды за счет движения стенок культуральной камеры, уменьшение сдвигового стресса путем создания микрогравитации, оксигенация среды через специальную мембрану	Конвекция (высокая)	Слабое	Получение сфероидов, 3D-культур клеток на микроносителях	Рабочие режимы (в том числе скорость вращения), особенно, при выращивании ТИК большого объема
БР на пористых волокнах	Поток среды по искусственным пористым полупроницаемым волокнам, имитирующим сосуды и пронизывающим ТИК, оксигенация среды через специальную мембрану	Конвекция (средняя) и диффузия (высокая)	Очень слабое	Наращивание клеток, имеющих высокие метаболические потребности	Неразрушающий контроль и извлечение ТИК из БР
Перфузионные	Поток среды вокруг или сквозь ТИК, в том числе по естественным или моделируемым сосудистым сетям; оксигенация среды с помощью специального устройства	Диффузия (высокая) и конвекция (средняя)	Среднее	ДЦЛ тканей и органов, РЦЛ плотных скаффолдов, поддержание 3D-культур на плотных скаффолдах, создание специфических условий культивирования в соответствии с задачами эксперимента	Оптимизация параметров перфузии, равномерность РЦЛ, засеивание скаффолдов клетками и клеточная адгезия
Микрофлюидные	Статическая культура или строго ламинарный поток среды, непосредственно через клеточную массу или ТИК, или взаимодействие клеток со средой через полупроницаемые барьеры/мембраны	Диффузия (высокая) и конвекция (средняя)	Регулируемое	3D-культуры на гидрогелевых матриксах, моделирование ангиогенеза, инвазии опухолевых клеток, сокультивирование разных типов клеток, исследование эффектов движения потоков жидкости через ткань; получение сфероидов; высокопроизводительный скрининг фармпрепаратов	Оптимизация дизайна микрофлюидных чипов и биологическая валидность моделей

\*По материалам [38] с изменениями.

Таблица 2. Тканеинженерные модели опухолей, полученные с использованием статических биореакторов

Вид опухоли	Скаффолд	Клетки	Результат	Ссылка
Рак молочной железы (РМЖ)	ДЦЛ-матрикс жировой ткани человека	MCF-7, BT-474, SKBR3	Фенотипическое сходство с биопсийными образцами РМЖ в 3D-культуре на ДЦЛ-матриксе выше, чем при культивировании на «Матригеле»	[42]
	Фиброин шелка	MDA-MB-231	Чувствительность к противоопухолевым препаратам в 3D-модели рака снижена по сравнению с 2D	[43]
Рак легких, РМЖ, рак кишечника, рак поджелудочной железы, тератоканцинома яичника, фиброзно-кистозная мастопатия	ДЦЛ-матрикс, синтезированный <i>in vitro</i> эмбриональными фибробластами мыши (линия NIH3T3)	NCI-H460; PA-1; PA-1/E6; HCT116; HCT116/p53-; SW620; COLO 205; PANC-1; MCF7; HS 578T; MCF10A	Исследовали роль и механизмы интегрин-опосредованных сигнальных каскадов в клеточной резистентности к действию противоопухолевых средств (таксола). Указано на перспективность использования клеточно-синтезированных ДЦЛ-скаффолдов для тестирования лекарственных препаратов	[44]
Рак легких, метастазы РМЖ, рака прямой кишки и плоскоклеточного рака пищевода в легкое	ДЦЛ-матрикс рака легких человека, синтезированный <i>in vivo</i> клетками рака легких A549 (клеточный ксенорафт, имплантированный мышам)	A549; MCF-7; SW-480; KYSE-510	Влияние способа ДЦЛ, механических свойств и пористости полученного матрикса на скорость роста клеток, их жизнеспособность, прорастание в толщу матрикса и секрецию факторов роста	[45]
Метастазы рака легких в кишечник	ДЦЛ-матрикс слизистой оболочки тонкого кишечника свиньи (в форме растянутой мембраны)	HCC827; A549	Только поверхностное проникновение клеток в скаффолд. Показано влияние 3D-матрикса на пролиферацию, апоптоз, инвазию в сравнении с культурой в 2D. Распределение белков и морфология клеток в 3D-культуре были сходны с реальными опухолями. Разная чувствительность клеток к gefитинибу в зависимости от наличия рецепторов фактора роста эпителия EGFR (не проявляется в 2D-культуре). На модели показана ранняя стадия инвазии	[46]
Саркома Юинга	Пористо-волоконный скаффолд из поликапролактона	TC-71	Повышение лекарственной резистентности опухолевых клеток на 3D-матриксе по сравнению с культурой в монослое. Существенные различия между 3D- и 2D-культурами в экспрессии инсулиноподобного фактора роста 1 (IGFR-1, мишень рапамицина)	[47]
	ДЦЛ-кость, заселенная мезенхимальными стволовыми клетками человека	HTB-10, HTB-166	На ДЦЛ-матриксе клетки, утратившие специфический фенотип в 2D-культуре, восстанавливают профиль геной экспрессии. Выделены гены, которые могут быть таргетными для терапии	[48]
Метастазы рака предстательной железы в кость	Тканеинженерная кость: поликапролактоновый скаффолд, «завернутый» в клеточный пласт остеобластов	PC-3; LNCaP	Повышенный уровень матриксных металлопротеиназ и других маркеров активации метастатического фенотипа	[49]
		LNCaP (в PEG-геле)	Остеобласты вызывают паракринные эффекты, которые могут способствовать развитию остеомимикрии опухолевых клеток и модулировать экспрессию отвечающих на андрогены генов в клетках LNCaP	[50]

паточкой), создающим вихревые потоки жидкости, обеспечивая динамическое перемешивание среды и массообмен между ней и тканью или скаффолдом. К перемешивающим БР можно отнести и системы, в которых перемещение среды вокруг скаффолда, ткани или ТИК создается движением самих культуральных емкостей. Примером могут служить роллерные флаконы (roller bottles) и классические культуральные сосуды, помещенные на качающиеся, встряхиваемые или вращающиеся автоматические платформы (шейкеры). В перемешивающих БР клеточные слои, фрагменты тканей, скаффолды или ТИК размещаются либо на специальных иглах, либо непосредственно на внутренних поверхностях культуральных сосудов. При этом ткани/скаффолды могут быть полностью погружены в жидкость, находиться на границе раздела жидкой и газовой фаз или попеременно погружаться в культуральную среду и газовую фазу.

Сейчас перемешивающие БР используются преимущественно для наращивания клеточной массы (гораздо более эффективного, чем в монослое [51]), в том числе в форме культур на микроносителях и в виде многоклеточных сфероидов. За счет лучшего питания клеток можно получить крупные сфероиды [52]. Интересны также работы по получению гетеросфероидов – сокультур опухолевых и нормальных клеток. Так, с помощью перемешивающего БР получены гетеросфероиды, состоящие из клеток плоскоклеточного рака головы и шеи и мононуклеарных клеток периферической крови [53]. Исследование фармакологических эффектов Катумаксомаба на моделях в форме сфероидов адекватно отражает свойства микрометастазов этих опухолей. Сфероиды, полученные из клеток опухолей мозга человека, глиомы и астроцитомы, высевали на пористо-волоконистые скаффолды из полимолочной кислоты и культивировали в планшетах на орбитальном шейкере в условиях гипоксии [54]. Оказалось, что в 3D-среде клетки приобретают повышенную устойчивость к проапоптотическим факторам. Гипоксия способствовала усилению резистентности к действию цитостатиков и в монослойных культурах, но молекулярные противоапоптотические механизмы в 2D- и 3D-культурах были различными. С помощью гибридной системы «планшет-на-шейкере» удалось обнаружить активацию сигнальных путей регуляции ангиогенеза и уменьшение чувствительности клеток к химиотерапевтическим противоопухолевым препаратам в 3D-культурах, помещенных в комплексный скаффолд из полилактогликолевой кислоты и матригеля [55]. Использование перемешивающего БР в эксперименте с клетками остеосаркомы позволило получить убедительные доказательства пре-

имуществ сложных ТМО на плотных скаффолдах (fibrous-bed) перед культурами опухолевых клеток на микроносителях, по-видимому, из-за уменьшения эффектов сдвигового напряжения [56]. ТИК из клеток остеосаркомы и пористо-волоконистого носителя были стабильными в культуре более 1 месяца. На 4-е сутки деление клеток останавливалось, но доля апоптотических клеток не превышала 15%.

Перемешивающие БР также применяются для ДЦЛ и РЦЛ. Как правило, в БР данного типа осуществляется ДЦЛ небольших тканевых фрагментов. В нашей недавней работе [39] мы показали, что системы типа «флакон-на-шейкере» также могут применяться и для ДЦЛ целых органов лабораторных животных. Эффективность перемешивающих БР в отношении заселения и питания клеток выше, чем у статических, но по-прежнему недостаточна для ТИК значительного объема. Кроме того, культуральная среда все же не очень хорошо проникает внутрь конструкции, поэтому, вследствие диффузионных ограничений, клетки в основном распределяются по периферии скаффолда. Возможность увеличения вклада конвекции за счет скорости вращения спиннера или самого культурального сосуда ограничена, поскольку это приводит к повреждениям тканей при росте сдвиговых напряжений ( $> 15$  дин/см<sup>2</sup>) [51, 57].

Потенциал применения перемешивающих БР в тканевой инженерии опухолей пока не реализован в полной мере, хотя эти системы имеют ряд важных преимуществ. Среди них – вариабельность объема культуры, работа с разными типами моделей, наличие гидродинамических расчетных моделей [34], возможность взятия проб культуральной среды и наблюдения за состоянием ТИК.

### РОТОРНЫЕ БИОРЕАКТОРЫ

Роторные БР (rotating-wall bioreactors, NASA bioreactors; RWV; RCCSTM; HARV; STLV; RWPV), первоначально разработанные NASA для экспериментов в космосе, представляют собой полностью заполненные культуральной средой цилиндрические емкости с вращающимися стенками. Горизонтальный (RWV) [58] и вертикальный (HARV) [59] роторные БР вращаются вокруг горизонтальной или вертикальной центральной оси, тогда как кислород подается через неподвижную осевую мембрану или аналогичную мембрану в основании цилиндра соответственно. В этих реакторах питательная среда заменяется вручную через технологические отверстия. В роторном БР с перфузией (RWPV или STLV) культуральная среда циркулирует в замкнутом контуре и заменяется непрерывно, что позволяет на протяжении многих месяцев автоматически поддерживать необ-



ходимый уровень кислорода, кислотности и температуры. RWPV состоит из двух цилиндров, причем внутренний, одновременно представляющий собой газообменную мембрану, также может вращаться. Питательная среда и ТИК находятся в кольцевом пространстве между цилиндрами [60].

В роторных БР скаффолды или ТИК свободно перемещаются в культуральной камере, полностью заполненной питательной средой. Скорость вращения цилиндров (примерно 15–40 об/мин) подобрана так, чтобы обеспечить баланс между гравитацией и силой гидродинамического сопротивления, действующими на скаффолды/ТИК, благодаря чему последние постоянно находятся в состоянии свободного падения. Динамическое ламинарное (а не турбулентное, как в перемешивающих БР) течение культуральной среды позволяет эффективно обходить диффузионные ограничения на доставку питательных веществ и удаление отходов. Роторные системы обеспечивают более однородное распределение клеток, чем статическая культура, и лучший обмен веществ, чем перемешивающий БР. Для компенсации массы растущей ткани скорость вращения постепенно увеличивают, чтобы уравновесить силу гравитации и гарантировать пребывание ТИК в «подвешенном» состоянии.

С помощью роторного БР обнаружили глобальные различия в воздействии 2D- и 3D-микроокружения на экспрессию генов гепатоцеллюлярной карциномы. В многоклеточных сфероидов, достигавших за 72 ч диаметра 100 мкм, а при длительном культивировании выраставших до 1 мм, клетки линии HepG2 демонстрировали усиление экспрессии метаболических и синтетических генов, тогда как в 2D наблюдалась активация генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса, цитоскелета и молекул клеточной адгезии. Кроме того, в сфероидов клетки рака печени долго сохраняли высокую активность цитохрома P450 и продуцировали альбумин, а в монослойной культуре эти признаки быстро деградировали [61].

Интересные результаты получены при работе с сокультурами опухолевых и нормальных клеток с использованием роторного БР. Так, клетки аденокарциномы кишечника (линии HT29 и HT29KM) в монокультуре формировали сфероиды, а в присутствии нормальных фибробластов конкурировали с ними за субстрат прикрепления, и их рост сначала ограничивался. Затем клетки опухоли начинали усиленно делиться и формировали объемные тканевые массы размером до 1.5 см, по строению напоминающие крипты здорового кишечника. Слой клеток, непосредственно контактирующих с поверхностью микроносителя, был образован юными мезенхимальными клетками. Некротические изменения в таких 3D-культурах практически не отсутствовали [62]. При сокульту-

вировании в роторном БР клеток рака молочной железы (линии UACC-893, BT-20 и MDA-MB-453) с фибробластами наблюдалось формирование гистидов – многоклеточных сфероидов из фибробластов с инвазивным вращением раковых клеток [63]. Особо крупные гетеросфероиды (диаметром до 1 см) удалось получить в роторном БР HARV из иммортализованных нормальных кератиноцитов кожи человека HaCaT и клеток разных линий меланомы (B16-F10 мыши и SKMEL-5 человека) [64]. На этой биомиметической 3D-модели меланомы продемонстрирована техника трансфекции клеток плазмидами, кодирующими GFP и IL-15, обеспечивающая высокую воспроизводимость результатов доставки генов. С помощью ротационного БР изучали также взаимодействие клеток рака предстательной железы, остеоцитов и стромы костной ткани в 3D-модели [65].

Эксперимент по получению с использованием роторного БР сфероидов из клеток рака предстательной железы разной степени зрелости позволил выявить значительные различия в их пространственной организации и пролиферативной активности в зависимости от количественного соотношения данных клеточных типов [66]. Это, как полагают авторы, указывает на влияние дифференцировки клеток на плотность упаковки в сфероидов и, как следствие, на эффективность массопереноса между клеточным агрегатом и культуральной средой.

Потенциальные ограничения использования роторных БР связаны с генерацией потокового сдвигового напряжения (диапазон 0.5–2 дин/см<sup>2</sup>) [67]. Эффективность и безопасность роторных БР можно повысить, комбинируя их с реакторами, работающими на других принципах [68].

### ПЕРФУЗИОННЫЕ (ПРОТОЧНЫЕ) БИОРЕАКТОРЫ

Перфузионные БР (perfusion bioreactors) позволяют наиболее точно воссоздавать процессы массопереноса в живом организме. Типичный перфузионный БР состоит из насоса и инкубационной камеры, соединенных гибкими трубками в систему с открытым или закрытым контуром. Насос создает небольшое избыточное давление, обеспечивая постоянный ток жидкой среды через ткани и скаффолды. Перфузионные БР могут использоваться как для ДЦЛ, так и для РЦЛ. При перфузионной ДЦЛ растворы детергентов или других веществ, способствующих отделению, разрушению и удалению собственных клеток ткани, поступают через естественные кровеносные сосуды, которые подключаются к проточному контуру.

В ходе РЦЛ клеточная суспензия подается через децеллюляризованные сосудистые сети обрабатываемой ткани/ТИК или через иные пустоты скафф-

фолда. При этом достигаются более гомогенное распределение клеток в матрице и лучший транспорт жидкостей, чем с использованием перемешивающих и роторных устройств [69–72], что позволяет создавать и длительно поддерживать более крупные ТИК [72, 73]. Выживаемость клеток на скаффолдах, перфузируемых с помощью БР данного типа, существенно выше, чем в статической культуре или перемешивающем БР [74]. Изменение скорости тока среды в БР позволяет контролировать как сдвиговые напряжения, связанные с движением жидкости, так и локальное распределение кислорода в ТИК [75]. В то же время, хотя перфузионные БР контролируют массообмен лучше прочих, проблема неоднородной доставки необходимых веществ до конца не решена. Это особенно характерно для скаффолдов с порами, размер которых варьирует в широком диапазоне, а также для тканей с неравномерной скоростью роста, в результате чего некоторые участки получают недостаточное питание, а другие избыточное [70].

Перфузионные БР критически важны для целоорганной тканевой инженерии – создания ТИК в масштабе целых органов [30, 76] путем последовательных процессов ДЦЛ и РЦЛ. К таким реакторам предъявляются особенно строгие требования по обеспечению контроля над параметрами тока культуральной среды/клеточной суспензии, стерильности, температурного режима и возможности мониторинга обработки органа и формирования органной ТИК [76–80].

Перфузионные БР активно используются для реконструкции нормальных тканей и органов, но создание с их помощью ТМО только начинается. Так, предложена модель колоректального рака, полученная с помощью коммерчески доступного перфузионного БР [81]. Клетки линии HT-29 культивировали традиционным способом в монослое либо высевали на коллагеновые губки и поддерживали в статической 3D-культуре или перфузионном БР. Дополнительный контроль обеспечивали опухолевые ксенографты, полученные на бестимусных мышцах с использованием той же линии клеток. В перфузионной культуре клетки характеризовались гораздо более высокой скоростью пролиферации и значительно более однородным распределением, чем в статической объемной культуре. Морфологически и фенотипически получаемые ТИК были подобны опухолям, развившимся из имплантированных клеток. Сильная корреляция между перфузионными 3D-культурами и опухолевыми ксенографтами наблюдалась и в профилях экспрессии генов, регулирующих апоптоз и ответ на гипоксию. Сравнение эффектов 5-фторурацила и АВТ-199, ингибитора антиапоптотического гена *BCL-2*, показало принци-

пальное различие клеточных ответов в 2D и 3D ТИК. В той же статье описано получение ТИК на коллагеновых скаффолдах с использованием клеток рака прямой кишки (SW480 и DLD-1), предстательной железы (PC-3), немелкоклеточного рака легкого A549 и рака молочной железы (BT-474).

Сложная ТИ-модель шванномы (нейрофибросаркомы) была создана немецкими учеными с применением специально сконструированного БР [82]. Выделенный фрагмент кишечника свиньи подвергали чередующейся перфузионной ДЦЛ через брыжечную артерию и просвет кишки и иммерсионной ДЦЛ на качающейся платформе, а затем полученный матрикс стерилизовали гамма-излучением. Потом ДЦЛ-матрикс фрагмента кишечника разрезали вдоль длинной оси, а полученную мембрану натягивали между двумя металлическими кольцами и помещали в камеру перфузионного БР. На скаффолд высевали первичные кожные фибробласты и линейные опухолевые клетки шванномы S462 (на апикальную поверхность) и эндотелиальные клетки микрососудов (на базолатеральную поверхность кишечного сегмента). ТИК в перфузионной культуре поддерживали около 2 недель при постоянном или пульсирующем токе культуральной среды.

Недавно с помощью технологий перфузионной ДЦЛ-РЦЛ органов была получена ТИ-модель рака легких [83]. Разные виды линейных клеток рака легких (A549, H460, H1299) высевали путем перфузии клеточной суспензии на децеллюляризованный целоорганной скаффолд, полученный из легких мыши. Целоорганные ТИК перфузировали оксигенированной культуральной средой и поддерживали *ex vivo* до 2 недель. Показано формирование макроскопических опухолевых узлов, имеющих собственную кровеносную сеть, развитие типичных клеточно-клеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, формирование типичной структуры и динамику роста опухоли, сходные с реальными фрагментами ткани рака легкого человека.

### БИОРЕАКТОРЫ НА ПОРИСТЫХ ВОЛОКНАХ

БР на пористых волокнах (hollow-fiber bioreactor) – это замкнутый сосуд, заполненный клеточной суспензией в культуральной среде, проницаемыми для среды скаффолдом или комплексной ТИК, в которых располагается пучок взаимно параллельных полупроницаемых полых волокон, имитирующих кровеносные сосуды и обеспечивающих доставку к клеткам питательных веществ и удаление отходов. Основное преимущество таких БР – возможность доставки питательных веществ в толщу растущих тканей. Сейчас они успешно применяются в экспериментах по культивированию очень чувствительных

типов клеток с высоким уровнем метаболизма, таких, как гепатоциты [84], но попытки использовать подобную систему для создания 3D-конструкций пока не увенчались успехом. Выяснилось, что при больших плотностях клеток или твердых матриц массообмен и диффузия кислорода в ней весьма затруднены. Это приводит к гибели клеток, находящихся на большом расстоянии от волокон, и к утрате структурной однородности ткани [85]. Для решения задачи была предложена коаксиальная схема БР на полых вставленных друг в друга волокнах, образующих независимые компартменты для выращивания клеток [84, 86]. Коаксиальная схема значительно улучшала массообмен, но еще одним серьезным недостатком данных систем является невозможность извлечения ТИК из БР для последующего использования без разрушения сформированной ткани.

В экспериментальной онкологии БР на пористых волокнах применяли для наращивания массы клеток, получения специфических клеточных продуктов и мониторинга метаболизма опухолевых тканей. Например, культивировали Т-лимфоциты, выделенные из воспалительного инфильтрата операционных биопсий рака яичников [87]. В коммерчески доступном БР получали сфероиды из клеток рака молочной железы (MCF-7) и изучали эффекты разных концентраций  $\delta$ -токоферола [88]. Предложена методика мониторинга клеточной плотности и концентрации кислорода в сфероидах с использованием контрастно-усиленной МРТ [88]. Также с помощью МРТ и БР на пористых волокнах выявлен механизм изменения кажущегося коэффициента диффузии воды (важного диагностического признака) в ишемизированной ткани мозга, моделью которой служила 3D-культура клеток глиомы крыс [89, 90].

### МИКРОФЛЮИДНЫЕ БИОРЕАКТОРЫ

Микрофлюидные платформы (microfluidic chips, microfluidic bioreactors) можно считать особой разновидностью перфузионной схемы конструирования и изучения биологических объектов с количеством клеток порядка  $10^2$ – $10^3$ . На стеклянную основу по многостадийной технологии наносится слой биосовместимого кремнийорганического вещества (полидиметилсилоксана), организованный в форме микроканалов и микроемкостей. Преимущество этого полимера перед традиционным для культуральных работ полистиролом – сочетание высокой проницаемости для кислорода и других газов с практически полной непроницаемостью воды [91]. В микрофлюидных БР массообмен с клетками, растущими в микроемкостях, заполненными гидрогелем или непосредственно в элементах чипа, осуществляется за счет перфузии культуральной среды через микроканалы.

Вариативность и адаптируемость микрофлюидных систем к решению самых разных задач обуславливают активное развитие технологий «орган-на-чипе», «система органов-на-чипе» и «лаборатория-на-чипе» (“organ-on-a-chip”, “lab-on-a-chip”). Важное преимущество таких БР – точный контроль над параметрами потоков питательных сред и возможность оптического имиджинга *in situ* в реальном времени [92]. Микрофлюидные системы применяют для изучения реакций клеток на действие сигнальных молекул, метаболических и физических градиентов, роли интерстициальных потоков жидкости в жизнедеятельности ткани, в том числе опухолевой, а также для прецизионной количественной оценки проницаемости ТИК для лекарственных препаратов и наночастиц [28, 93–96]. Кроме того, можно моделировать кинетику клеточных популяций, прогрессию, ангиогенез, инвазию и разные этапы метастазирования [97–103].

### БИОРЕАКТОРЫ С НЕПОСРЕДСТВЕННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА СКАФФОЛД/ТИК

Конструкция БР может предусматривать дозированное воздействие физических факторов на скаффолд или ТИК. Например, объект ТИ может подвергаться действию механических сил, электрических импульсов или разным видам облучения. Наибольшее развитие получили биореакторные технологии, связанные с биомеханическими исследованиями.

### КОМПРЕССИОННЫЕ БИОРЕАКТОРЫ

Компрессионные БР (compression bioreactors) широко используются в тканевой инженерии, особенно при изготовлении хрящевых структур. Такие БР состоят из двигателя, системы, обеспечивающей линейное смещение, и механизма управления. Нагрузка обычно передается на засеянные клетками скаффолд посредством плоских валиков [104] и обеспечивает специфическую механическую нагрузку на клетки и усиление тока жидкости через ТИК. В ТИО компрессионные БР могут быть востребованы для моделирования механизмов формирования костной метастатической ниши. В настоящее время практически не известно, как отвечает метастатическая раковая ткань на механическую нагрузку [105]. При исследовании на 3D-культурах клеток рака молочной железы (MDA-MB-231) и глиобластомы (U87, HGL21) в компрессионном БР показано усиление экспрессии генов, ответственных за ферментативный лизис белков внеклеточного матрикса, адгезию и миграцию в ответ на повышенную статическую компрессию, что соответствует росту метастатического потенциала [106].

### БИОРЕАКТОРЫ С МЕХАНИЧЕСКИМ НАТЯЖЕНИЕМ

БР с контролируемым механическим натяжением (strain bioreactors) конструктивно похожи на компрессионные и отличаются от них лишь способом передачи силы на образец. Скаффолды/ТИК закрепляют так, чтобы к ним можно было применить силу натяжения, например, размещают их на резиновой мембране с последующей ее деформацией [107]. В ТИО недавно предложена модель изучения роли механического напряжения внеклеточного матрикса в индукции инвазии 3D-органOIDов, полученных путем культивирования трансформированных эпителиальных клеток в коллагеновом геле разных концентраций. Гель с включенными в него клеточными агрегатами, ковалентно связанный с полидиметилсилоксановой основой, помещали в микрофлюидный чип с устройством для натяжения этого участка культуральной камеры. Выявлена положительная корреляция между инвазивностью клеток и жесткостью геля, установлено влияние концентрации путем изменения среднего размера пор [108].

### БИОРЕАКТОРЫ С ГИДРОСТАТИЧЕСКИМ ДАВЛЕНИЕМ

В БР с гидростатическим давлением (hydrostatic pressure bioreactors) механическое сжатие скаффолдов или ТИК опосредовано периодическим сокращением объема культуральной камеры при постоянстве объема культуральной среды [109]. Использование БР данного типа пока не получило развития в ТИО, однако, это направление видится нам чрезвычайно перспективным для модернизации важнейшей особенности физиологии солидных опухолей – повышенного интерстициального давления [36].

### БИОРЕАКТОРЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

БР для электрической стимуляции (electrical stimulation bioreactors), как правило, используются для моделирования возбудимых тканей. По нашим данным, массового использования таких БР для создания 3D-моделей рака пока не было, но появились единичные сообщения о культивировании опухолевых клеток в гидрогеле в условиях воздействия слабыми электрическими полями (при интенсивности 1.1 В/см и переменной частоте 150 и 200 кГц) в гибридном устройстве, созданном на основе микрофлюидного чипа [110]. Наблюдали изменение морфологических характеристик клеток рака легкого (линия A549) и рака молочной железы (линия MDA-MB-231), уменьшение скорости пролиферации обеих линий опухолевых клеток и признаки снижения метастатического потенциала клеток A549, тогда как активность нормальных эндотелиальных клеток

человека (HUVEC) под действием электрических стимулов не изменялась.

### КОМБИНИРОВАННЫЕ БИОРЕАКТОРЫ

Созданы многочисленные комбинации БР, позволяющие выращивать ткани в лабораторных условиях, как можно более точно соответствующих природным. В большинстве случаев эти комбинации заключаются в добавлении разных методов механического воздействия на ткани в стандартный БР перфузионного цикла или роторный БР. Так, объединение БР с контролируемым механическим натяжением, БР с гидростатическим давлением или компрессионного БР с перфузионным или роторным позволяет сочетать преимущества улучшенного обмена при перфузии или ротации и механическую стимуляцию ТИК.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ применения биореакторных технологий при создании биомиметических моделей злокачественных опухолей показывает, что в настоящее время в ТИО по-прежнему чаще всего используются статические системы и перемешивающие БР на основе традиционных культуральных сосудов, помещенных на шейкеры. Однако эта область активно развивается. Все большее внимание привлекают микрофлюидные системы. По-видимому, для максимально правдоподобной реконструкции раковых опухолей потребуется применение не одного типа БР, а последовательной комбинации устройств, действующих на основе различных механизмов, или же создание универсальных комбайнов, обеспечивающих автоматизацию операций, контроль и стандартизацию условий культивирования.

Мы полагаем, что создание новых видов БР для ТИО, а также разработка общих принципов их конструирования имеют ключевое значение для углубленного понимания биологии рака. Одновременно с этим эксперименты с использованием БР открывают концептуальные возможности для тестирования перспективных поколений противоопухолевых соединений на основе рекомбинантных молекул [111–118], многофункциональных наноконструкций [119–126], а также для оценки потенциала новых клеточных и тканеинженерных технологий [25, 39–41, 127, 128] и репрограммирования раковых клеток [129, 130]. ●

*Авторы благодарят А.З. Винарова, Д.В. Бутнару, А.В. Лузину, А.С. Титова (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова) за поддержку в организации и проведении хирургических экспериментов, Е.В. Петерсен и И.А. Корниенко (Московский физико-технический институт) за помощь в разработке технологии получения бесклеточных*



органных скаффолдов. Мы также хотели бы принести наши извинения тем исследователям, чьи оригинальные работы мы не имели возможности процитировать непосредственно, а не через обзорные публикации, ввиду ограниченного объема статьи.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-24-00106). Автор (А.Г.) также выражает благодарность Macquarie University за предоставление исследовательской стипендии iMQRes.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hickman J.A., Graeser R., de Hoogt R., Vidic S., Brito C., Gutekunst M., van der Kuip H., Consortium I.P. // *Biotechnol. J.* 2014. V. 9. № 9. P. 1115–1128.
2. Breslin S., O'Driscoll L. // *Drug Discov. Today*. 2013. V. 18. № 5–6. P. 240–249.
3. Aggarwal B.B., Danda D., Gupta S., Gehlot P. // *Biochem. Pharmacol.* 2009. V. 78. № 9. P. 1083–1094.
4. Yamada K.M., Cukierman E. // *Cell*. 2007. V. 130. № 4. P. 601–610.
5. Huttmacher D.W., Loessner D., Rizzi S., Kaplan D.L., Mooney D.J., Clements J.A. // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 28. № 3. P. 125–133.
6. Носенко М.А., Друцкая М.С., Мойсенович М.М., Недоспасов С.А. // *Acta Naturae*. 2016. T. 8. № 2. С. 51–66.
7. Hanahan D., Weinberg R.A. // *Cell*. 2011. V. 144. № 5. P. 646–674.
8. Ricci C., Moroni L., Danti S. // *OA Tissue Engineering*. 2013. V. 1. № 1. P. 4. <http://dx.doi.org/10.13172/2052-9643-1-1-607>.
9. Baker B.M., Chen C.S. // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. Pt 13. P. 3015–3024.
10. Tentler J.J., Tan A.C., Weekes C.D., Jimeno A., Leong S., Pitts T.M., Arcaroli J.J., Messersmith W.A., Eckhardt S.G. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012. V. 9. № 6. P. 338–350.
11. Siolas D., Hannon G.J. // *Cancer Res.* 2013. V. 73. № 17. P. 5315–5319.
12. Weinberg R.A. *The biology of cancer*. N.Y.: Garland Sci., 2007. 960 p.
13. Huttmacher D.W., Horch R.E., Loessner D., Rizzi S., Sieh S., Reichert J.C., Clements J.A., Beier J.P., Arkudas A., Bleiziffer O. // *J. Cell. Mol. Med.* 2009. V. 13. № 8a. P. 1417–1427.
14. Burdett E., Kasper F.K., Mikos A.G., Ludwig J.A. // *Tissue Eng. Part B Rev.* 2010. V. 16. № 3. P. 351–359.
15. Ghajar C.M., Bissell M.J. // *Tissue Eng. Part A*. 2010. V. 16. № 7. P. 2153–2156.
16. Fong E.L., Santoro M., Farach-Carson M.C., Kasper F.K., Mikos A.G. // *Curr. Opin. Chem. Eng.* 2014. V. 3. P. 112–117.
17. Gill B.J., West J.L. // *J. Biomech.* 2014. V. 47. № 9. P. 1969–1978.
18. Xu W., Hu X., Pan W. // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2014. V. 13. № 2. P. 149–159.
19. Seib F.P., Berry J.E., Shiozawa Y., Taichman R.S., Kaplan D.L. // *Biomaterials*. 2015. V. 51. P. 313–319.
20. Langer R., Vacanti J.P. // *Science*. 1993. V. 260. № 5110. P. 920–926.
21. Martin I., Wendt D., Heberer M. // *Trends Biotechnol.* 2004. V. 22. № 2. P. 80–86.
22. Pietras K., Ostman A. // *Exp. Cell Res.* 2010. V. 316. № 8. P. 1324–1331.
23. Alemany-Ribes M., Semino C.E. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014. V. 79–80. P. 40–49.
24. Nelson C.M., Bissell M.J. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006. V. 22. P. 287–309.
25. Шехтер А.Б., Гуллер А.Е., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Бутнару Д.В., Винаров А.З., Захаркина О.Л., Курков А.В., Кантимеров Д.Ф., Антонов Е.Н. и др. // *Архив патологии*. 2015. T. 77. № 6. С. 29–38.
26. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. // *Biomaterials*. 2011. V. 32. № 12. P. 3233–3243.
27. Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 19. P. 3675–3683.
28. Martin Y., Vermette P. // *Biomaterials*. 2005. V. 26. № 35. P. 7481–7503.
29. Fu R.H., Wang Y.C., Liu S.P., Shih T.R., Lin H.L., Chen Y.M., Sung J.H., Lu C.H., Wei J.R., Wang Z.W., et al. // *Cell Transplant.* 2014. V. 23. № 4. P. 621–630.
30. Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2011. V. 13. P. 27–53.
31. Mehta G., Hsiao A.Y., Ingram M., Luker G.D., Takayama S. // *J. Control Release*. 2012. V. 164. № 2. P. 192–204.
32. Korossis S., Bolland F., Kearney J., Fisher J., Ingham E. // *Topics Tissue Eng.* 2005. V. 2. № 8. P. 1–23.
33. Wendt D., Riboldi S.A., Cioffi M., Martin I. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2009. V. 112. P. 1–27.
34. Hansmann J., Groeber F., Kahlig A., Kleinhans C., Walles H. // *Biotechnol. J.* 2013. V. 8. № 3. P. 298–307.
35. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. // *Cancer Res.* 1989. V. 49. № 23. P. 6449–6465.
36. Jain R.K. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. № 12. P. 3039–3051.
37. Stylianopoulos T., Martin J.D., Chauhan V.P., Jain S.R., Diop-Frimpong B., Bardeesy N., Smith B.L., Ferrone C.R., Hornicek F.J., Boucher Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 38. P. 15101–15108.
38. Salehi-Nik N., Amoabediny G., Pouran B., Tabesh H., Shokrgozar M.A., Haghhighipour N., Khatibi N., Anisi F., Mottaghy K., Zandieh-Doulabi B. // *Biomed. Res. Int.* 2013. V. 2013. P. 762132.
39. Guller A., Trusova I., Petersen E., Shekhter A., Kurkov A., Qian Y., Zvyagin A. // *SPIE Micro+Nano Materials, Devices, and Systems*. 2015. V. 96684G. doi: 10.1117/12.2202473.
40. Глыбочко П.В., Аляев Ю.Г., Николенко В.Н., Шехтер А.Б., Винаров А.З., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Абянц Р.К., Ляндуп А.В., Гуллер А.Е. и др. // *Урология*. 2014. № 6. С. 41–46.
41. Глыбочко П.В., Аляев Ю.Г., Шехтер А.Б., Винаров А.З., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Абянц Р.К., Ляндуп А.В., Крашенинников М.Е., Гуллер А.Е. и др. // *Урология*. 2015. № 6. С. 5–13.
42. Dunne L.W., Huang Z., Meng W., Fan X., Zhang N., Zhang Q., An Z. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 18. P. 4940–4949.
43. Talukdar S., Mandal M., Huttmacher D.W., Russell P.J., Soekmadji C., Kundu S.C. // *Biomaterials*. 2011. V. 32. № 8. P. 2149–2159.
44. Serebriiskii I., Castello-Cros R., Lamb A., Golemis E.A., Cukierman E. // *Matrix Biol.* 2008. V. 27. № 6. P. 573–585.
45. Lü W.-D., Zhang L., Wu C.-L., Liu Z.-G., Lei G.-Y., Liu J., Gao W., Hu Y.-R. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 7. P. e103672.
46. Stratmann A.T., Fecher D., Wangorsch G., Göttlich C., Walles T., Walles H., Dandekar T., Dandekar G., Nietzer S.L. // *Mol. Oncol.* 2014. V. 8. № 2. P. 351–365.

47. Fong E.L., Lamhamedi-Cherradi S.E., Burdett E., Ramamoorthy V., Lazar A.J., Kasper F.K., Farach-Carson M.C., Vishwamitra D., Demicco E.G., Menegaz B.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 16. P. 6500–6505.
48. Villasante A., Marturano-Kruik A., Vunjak-Novakovic G. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 22. P. 5785–5794.
49. Sieh S., Lubik A.A., Clements J.A., Nelson C.C., Hutmacher D.W. // *Organogenesis*. 2010. V. 6. № 3. P. 181–188.
50. Sieh S., Taubenberger A.V., Lehman M.L., Clements J.A., Nelson C.C., Hutmacher D.W. // *Bone*. 2014. V. 63. P. 121–131.
51. Tandon N., Marolt D., Cimetta E., Vunjak-Novakovic G. // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. № 7. P. 1020–1031.
52. Sutherland R.M., Sordat B., Bamat J., Gabbert H., Bourrat B., Mueller-Klieser W. // *Cancer Res*. 1986. V. 46. № 10. P. 5320–5329.
53. Hirschhaeuser F., Leidig T., Rodday B., Lindemann C., Mueller-Klieser W. // *J. Biomol. Screen*. 2009. V. 14. № 8. P. 980–990.
54. Kim J.W., Ho W.J., Wu B.M. // *Anticancer Res*. 2011. V. 31. № 10. P. 3237–3245.
55. Fischbach C., Chen R., Matsumoto T., Schmelzle T., Brugge J.S., Polverini P.J., Mooney D.J. // *Nat. Methods*. 2007. V. 4. № 10. P. 855–860.
56. Chen C., Chen K., Yang S.T. // *Biotechnol. Prog.* 2003. V. 19. № 5. P. 1574–1582.
57. Sucusky P., Osorio D.F., Brown J.B., Neitzel G.P. // *Biotechnol. Bioeng*. 2004. V. 85. № 1. P. 34–46.
58. Freshney R.I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 4th Ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2000. 624 p.
59. Portner R., Nagel-Heyer S., Goepfert C., Adamietz P., Meenen N.M. // *J. Biosci. Bioeng*. 2005. V. 100. № 3. P. 235–245.
60. Schwarz R.P., Wolf D.A., Trinh T.T. Horizontally rotated cell culture system with a coaxial tubular oxygenator. Patent USA US5026650 A, Grant. 1991.
61. Chang T.T., Hughes-Fulford M. // *Tissue Eng. Part A*. 2009. V. 15. № 3. P. 559–567.
62. Goodwin T.J., Jessup J.M., Wolf D.A. // *In Vitro Cell Dev Biol*. 1992. V. 28A. № 1. P. 47–60.
63. Kaur P., Ward B., Saha B., Young L., Groshen S., Tychy G., Lu Y., Atkinson R., Taylor C. R., Ingram M., et al. // *J. Histochem. Cytochem*. 2011. V. 59. № 12. P. 1087–1100.
64. Marrero B., Heller R. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 10. P. 3036–3046.
65. Wang R., Xu J., Juliette L., Castilleja A., Love J., Sung S.Y., Zhau H.E., Goodwin T.J., Chung L.W. // *Semin. Cancer Biol*. 2005. V. 15. № 5. P. 353–364.
66. Song H., David O., Clejan S., Giordano C.L., Pappas-Lebeau H., Xu L., O'Connor K.C. // *Tissue Eng*. 2004. V. 10. № 7–8. P. 1266–1276.
67. Spatz J.M., Wein M.N., Gooi J.H., Qu Y., Garr J.L., Liu S., Barry K.J., Uda Y., Lai F., Dedic C., et al. // *J. Biol. Chem*. 2015. V. 290. № 27. P. 16744–16758.
68. Song K., Yan X., Zhang Y., Song F., Lim M., Fang M., Shi F., Wang L., Liu T. // *Bioprocess Biosyst. Eng*. 2015. V. 38. № 8. P. 1527–1540.
69. Goldstein A.S., Juarez T.M., Helmke C.D., Gustin M.C., Mikos A.G. // *Biomaterials*. 2001. V. 22. № 11. P. 1279–1288.
70. Yu X., Botchwey E.A., Levine E.M., Pollack S.R., Laurencin C.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 31. P. 11203–11208.
71. Насрединов А.С., Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Пузанов М.В., Курапеев Д.И. // *Цитология*. 2014. Т. 56. № 12. С. 926–932.
72. Wendt D., Stroebel S., Jakob M., John G., Martin I. // *Biorheology*. 2006. V. 43. № 3–4. P. 481–488.
73. Wendt D., Marsano A., Jakob M., Heberer M., Martin I. // *Biotechnol. Bioeng*. 2003. V. 84. № 2. P. 205–214.
74. Barash Y., Dvir T., Tandeitnik P., Ruvinov E., Guterman H., Cohen S. // *Tissue Eng. Part C Methods*. 2010. V. 16. № 6. P. 1417–1426.
75. Cioffi M., Kuffer J., Strobel S., Dubini G., Martin I., Wendt D. // *J. Biomech*. 2008. V. 41. № 14. P. 2918–2925.
76. Ott H.C., Matthiesen T.S., Goh S.K., Black L.D., Kren S.M., Netoff T.I., Taylor D.A. // *Nat. Medicine*. 2008. V. 14. № 2. P. 213–221.
77. Soto-Gutierrez A., Zhang L., Medberry C., Fukumitsu K., Faulk D., Jiang H., Reing J., Gramignoli R., Komori J., Ross M., et al. // *Tissue Eng. Part C Methods*. 2011. V. 17. № 6. P. 677–686.
78. Bijonowski B.M., Miller W.M., Wertheim J.A. // *Curr. Opin. Chem. Eng*. 2013. V. 2. № 1. P. 32–40.
79. Price A.P., England K.A., Matson A.M., Blazar B.R., Panoskalsis-Mortari A. // *Tissue Eng Part A*. 2010. V. 16. № 8. P. 2581–2591.
80. Panoskalsis-Mortari A. // *Curr. Transplant. Rep*. 2015. V. 2. № 1. P. 90–97.
81. Hirt C., Papadimitropoulos A., Muraro M.G., Mele V., Panopoulos E., Cremonesi E., Ivanek R., Schultz-Thater E., Droeser R.A., Mengus C., et al. // *Biomaterials*. 2015. V. 62. P. 138–146.
82. Moll C., Reboredo J., Schwarz T., Appelt A., Schurlein S., Walles H., Nietzer S. // *J. Vis. Exp*. 2013. № 78. doi: 10.3791/50460.
83. Mishra D.K., Thrall M.J., Baird B.N., Ott H.C., Blackmon S.H., Kurie J.M., Kim M.P. // *Ann. Thorac. Surg*. 2012. V. 93. № 4. P. 1075–1081.
84. Jasmund I., Bader A. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 2002. V. 74. P. 99–109.
85. Birla R. // *Introduction to Tissue Engineering*. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, Inc., 2014. P. 193–236.
86. Piret J.M., Cooney C.L. // *Biotechnol. Bioeng*. 1991. V. 37. № 1. P. 80–92.
87. Freedman R.S., Ioannides C.G., Mathioudakis G., Platsoucas C.D. // *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1992. V. 167. № 5. P. 1470–1478.
88. Bartusik D., Tomanek B., Siluk D., Kaliszan R., Fallone G. // *Anal. Biochem*. 2009. V. 387. № 2. P. 315–317.
89. Trouard T.P., Harkins K.D., Divijak J.L., Gillies R.J., Galons J.P. // *Magn. Reson. Med*. 2008. V. 60. № 2. P. 258–264.
90. Harkins K.D., Galons J.P., Divijak J.L., Trouard T.P. // *Magn. Reson. Med*. 2011. V. 66. № 3. P. 859–867.
91. Berthier E., Young E.W., Beebe D. // *Lab. Chip*. 2012. V. 12. № 7. P. 1224–1237.
92. Lee J., Kohl N., Shanbhang S., Parekkadan B. // *Technology (Singap World Sci)*. 2015. V. 3. № 4. P. 179–188.
93. Ng C.P., Pun S.H. // *Biotechnol. Bioeng*. 2008. V. 99. № 6. P. 1490–1501.
94. Elliott N.T., Yuan F. // *Biotechnol. Bioeng*. 2012. V. 109. № 5. P. 1326–1335.
95. Albanese A., Lam A.K., Sykes E.A., Rocheleau J.V., Chan W.C.W. // *Nature Comm*. 2013. T. 4. P. 2718. doi: 10.1038/ncomms3718.
96. Buchanan C., Rylander M.N. // *Biotechnol. Bioeng*. 2013. V. 110. № 8. P. 2063–2072.
97. Ma H., Xu H., Qin J. // *Biomicrofluidics*. 2013. V. 7. № 1. P. 11501. doi: 10.1063/1.4774070.
98. Song H.H., Park K.M., Gerecht S. // *Adv. Drug. Deliv. Rev*. 2014. V. 79–80. P. 19–29. doi: 10.1016/j.addr.2014.06.002.
99. Kim S., Lee H., Chung M., Jeon N.L., Kim S., Lee H., Chung M., Jeon N.L. // *Lab. Chip*. 2013. V. 13. № 8. P. 1489–1500.
100. Sung K.E., Beebe D.J. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2014. V. 79–80. P. 68–78. doi: 10.1016/j.addr.2014.07.002.

101. Haessler U., Teo J.C., Foretay D., Renaud P., Swartz M.A. // *Integr. Biol. (Camb.)*. 2012. V. 4. № 4. P. 401–409.
102. Bersini S., Jeon J.S., Dubini G., Arrigoni C., Chung S., Charest J.L., Moretti M., Kamm R. D. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 8. P. 2454–2461.
103. Huang C.P., Lu J., Seon H., Lee A.P., Flanagan L.A., Kim H.Y., Putnam A.J., Jeon N.L. // *Lab. Chip*. 2009. V. 9. № 12. P. 1740–1748.
104. Thorpe S.D., Buckley C.T., Vinardell T., O'Brien F.J., Campbell V.A., Kelly D.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 377. № 2. P. 458–462.
105. Lynch M.E., Brooks D., Mohanan S., Lee M.J., Polamraju P., Dent K., Bonassar L.J., van der Meulen M.C., Fischbach C. // *J. Bone Miner. Res.* 2013. V. 28. № 11. P. 2357–2367.
106. Demou Z.N. // *Ann. Biomed. Eng.* 2010. V. 38. № 11. P. 3509–3520.
107. Garvin J., Qi J., Maloney M., Baner A.J. // *Tissue Eng.* 2003. T. 9. № 5. P. 967–979.
108. Cassereau L., Miroshnikova Y.A., Ou G., Lakins J., Weaver V.M. // *J. Biotechnol.* 2015. V. 193. P. 66–69.
109. Darling E.M., Athanasiou K.A. // *Ann. Biomed. Eng.* 2003. V. 31. № 9. P. 1114–1124.
110. Pavesi A., Adriani G., Tay A., Warkiani M.E., Yeap W.H., Wong S.C., Kamm R.D. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 26584. doi: 10.1038/srep26584.
111. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russ. Chem. Rev.* 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
112. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics*. 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
113. Деев С.М., Лебеде́нко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. V. 1. № 1. P. 32–50.
114. Stepanov A.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
115. Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 31. P. 30919–30928.
116. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Biochimie*. 2015. V. 118. P. 116–122.
117. Lebedenko E., Balandin T., Edelweiss E., Georgiev O., Moiseeva E., Petrov R., Deyev S. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007. V. 414. № 1. P. 120–123.
118. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Gene*. 2006. V. 366. № 1. P. 97–103.
119. Liang L., Care A., Zhang R., Lu Y., Packer N.H., Sunna A., Qian Y., Zvyagin A.V. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2016. V. 8. № 19. P. 11945–11953.
120. Razali W.A., Sreenivasan V.K., Goldys E.M., Zvyagin A.V. // *Langmuir*. 2014. V. 30. № 50. P. 15091–15101.
121. Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. // *Nat. Nanotechnol.* 2014. V. 9. № 9. P. 716–722.
122. Grebenik E.A., Nadort A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Sreenivasan V.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Popov A.P., Sokolov V.I., Akhmanov A.S., et al. // *J. Biomed. Opt.* 2013. V. 18. № 7. P. 76004. doi: 10.1117/1.JBO.18.7.076004.
123. Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. // *Nanomedicine (Lond.)*. 2011. V. 6. № 2. P. 195–209.
124. Generalova A.N., Kochneva I.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Guller A.E., Nechaev A.V., Shekhter A.B., Zubov V.P., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *Nanoscale*. 2015. V. 7. № 5. P. 1709–1717.
125. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Krutova I.V., Brilkina A.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *J. Biophotonics*. 2012. V. 5. № 11–12. P. 860–867.
126. Nadort A., Liang L., Grebenik E., Guller A., Lu Y., Qian Y., Goldys E., Zvyagin A. // *SPIE Micro+Nano Materials, Devices, and Systems*. 2015. V. 96683Y. doi:10.1117/12.2202449.
127. Петерсен Е., Трусова И., Зурина И., Кошелева Н., Горкун А., Гуллер А., Пулин А., Сабурин И., Репин В., Шехтер А. // *Пластическая хирургия и косметология*. 2012. № 4. С. 615–625.
128. Shekhter A.B., Rudenko T.G., Istranov L.P., Guller A.E., Borodulin R.R., Vanin A.F. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015. V. 78. P. 8–18.
129. Trosko J.E. // *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2014. V. 297. № 1. P. 161–173.
130. Ingber D.E. // *Semin. Cancer Biol.* 2008. V. 18. № 5. P. 356–364.

УДК 577.3

# Гиалуроновая кислота в сосудистом и иммунном гомеостазе при физиологической беременности и преэклампсии

М. М. Зиганшина<sup>1\*</sup>, С. В. Павлович<sup>1</sup>, Н. В. Бовин<sup>2</sup>, Г. Т. Сухих<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: mmz@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2015

Принята к печати 26.04.2016

**РЕФЕРАТ** Преэклампсия (ПЭ) – мультисистемное патологическое состояние, клинически проявляющееся после 20-й недели беременности и характеризующееся высокой частотой материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. Согласно современным представлениям основным патогенетическим фактором развития ПЭ является нарушение инвазии трофобласта в спиральные артерии матери, что ведет к развитию ишемии в тканях плаценты. Ишемические повреждения инициируют развитие системного воспалительного ответа (СВО) и эндотелиальной дисфункции, основных причин развития полиорганной недостаточности при ПЭ. Опубликованы единичные данные о значении гликанов, формирующих эндотелиальный гликокаликс и внеклеточный матрикс (ВКМ), для морфогенеза плаценты, а также их роли в регуляции сосудистой проницаемости и тонуса сосудов при гипертензивных расстройствах и ПЭ в частности. Поскольку интактный гликокаликс и ВКМ считаются основными факторами, обеспечивающими физиологический тонус сосудов и адекватные межклеточные взаимодействия, то их значение в патогенезе ПЭ явно недооценено. В настоящем обзоре в качестве ключевого гликана, обеспечивающего организацию и стабилизацию структуры ВКМ и гликокаликса, рассмотрена гиалуроновая кислота (ГК), ее распределение в ткани при патологии плаценты и в норме. Обсуждается также регуляторная роль ГК разной молекулярной массы в различных физиологических и патофизиологических процессах. Обобщение существующих данных позволит расширить представление о патогенезе ПЭ, акцентируя внимание на гликопатологии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** внеклеточный матрикс, гиалуроновая кислота, гликокаликс, гликопатология, преэклампсия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВКМ – внеклеточный матрикс; ВМВ-ГК, НМВ-ГК – высокомолекулярная и низкомолекулярная гиалуроновая кислота соответственно; ГК – гиалуроновая кислота; ММП-1 – матриксная металлопротеиназа 1; ММП-2 – матриксная металлопротеиназа 2; О-ГК – олигомерные молекулы гиалуроновой кислоты; ПЭ – преэклампсия; СВО – системный воспалительный ответ; ФПС – фетоплацентарная система.

## ВВЕДЕНИЕ

Основной фактор, определяющий успешное протекание беременности, – формирование полноценной фетоплацентарной системы (ФПС), которая отвечает потребностям развивающегося плода и регулирует гемодинамическую нагрузку на материнскую сердечно-сосудистую систему. Ключевым моментом формирования ФПС – трансформация маточных спиральных артерий в маточно-плацентарные сосуды,

образованные в результате инвазии трофобласта в стенку спиральных артерий матери. Инвазия сопровождается ремоделированием тканей, при котором происходит лизис эластично-мышечных компонентов радиальных артерий, замена их фибриноидом, формирование широких спиралевидных полостей, адаптированных к возрастающему кровотоку [1, 2]. Адекватное формирование ФПС осуществляется благодаря способности трофобласта



дифференцироваться в клеточные популяции, обладающие различными инвазивными и локомоторными свойствами. Инвазивный (вневорсинчатый) трофобласт в период плацентации приобретает свойства псевдоопухолевых клеток с высоким пролиферативным, инвазивным и миграционным потенциалом и особенностью экспрессии поверхностных маркеров, что обеспечивает формирование ФПС и способствует феномену неотторжения [3]. Патогенез ПЭ связывают с нарушением пролиферации и инвазии трофобласта в спиральные артерии матки, морфологически проявляющейся в развитии мелкоклеточной инвазии и отсутствии ремоделирования спиральных артерий, что особенно выражено при «ранней» ПЭ (манifestация клинических симптомов до 34 недель гестации) [4, 5]. Другой фактор, патогенетически значимый как для «ранней», так и для «поздней» ПЭ (манifestация клинических симптомов после 34 недель гестации), чрезмерный системный воспалительный ответ (СВО), развитие которого приводит к эндотелиальной активации/дисфункции и иммунной дезадаптации [6]. Клинические проявления ПЭ – высокое артериальное давление и протеинурия – обусловлены этими факторами.

Инвазия осуществляется благодаря адгезивным взаимодействиям между клетками и ВКМ и регулируется эндогенными и экзогенными факторами: экспрессией генов и биомодуляторами. Клетки трофобласта, с одной стороны, обладают некоторыми свойствами опухолевых клеток, с другой, их инвазия строго детерминирована сроками гестации и допустимой глубиной инвазии. Способность к инвазии определяется как свойствами самих клеток (их дифференцировкой, синтезом протеолитических ферментов и цитокинов), так и свойствами матрикса: его структурой (формирует ячеистую рамку для клеток) и регуляторной функцией (содержит биологически активные молекулы и функциональные группы).

На гистологию и функциональные свойства ВКМ влияет выраженность СВО, степень которого считается одним из ведущих факторов, определяющих, с одной стороны, возможности ремоделирования ткани (физиологическое ремоделирование при нормальной беременности и патологическое при патологии беременности или онкотрансформации), а с другой, возможности межклеточных коммуникаций (экспонированные гликаны и гликоконъюгаты меняются при действии медиаторов воспаления, что проявляется в изменении функций клеток и органов).

Информация о роли ВКМ и молекул, его формирующих, в патогенезе ПЭ весьма ограничена. В представленном обзоре рассмотрена гиалуроновая кислота (ГК), ее функции в составе ВКМ и эндотелиального гликокаликса, распределение в структурах

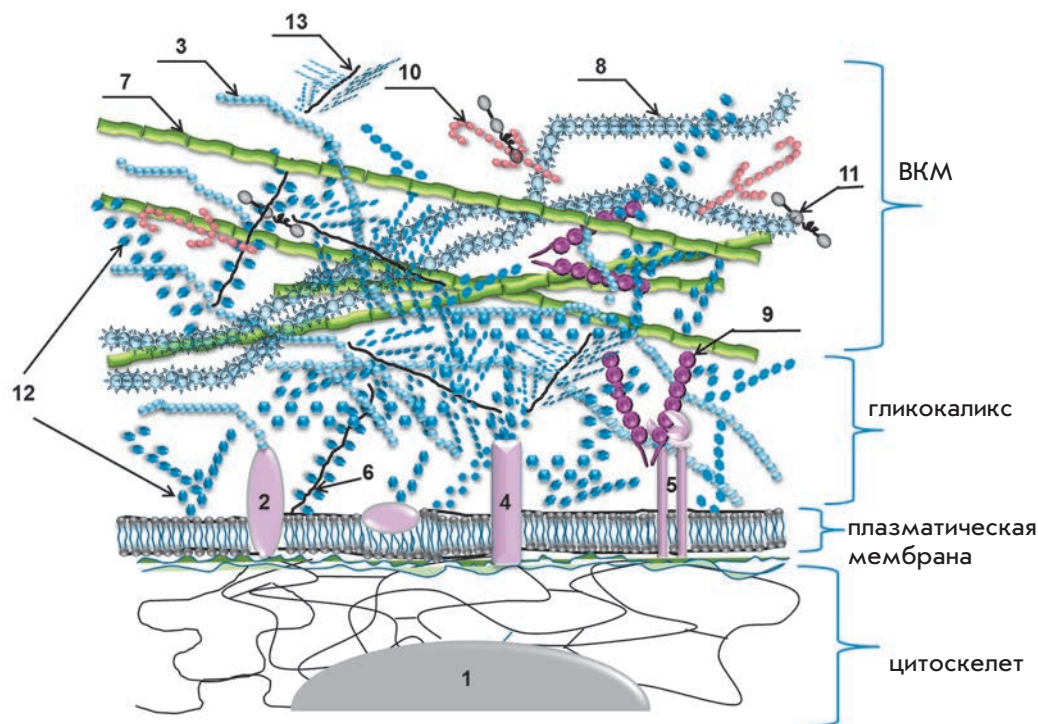
плаценты, а также регуляторное действие ГК в процессах инвазии и воспаления.

### **ФУНКЦИИ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА**

Внеклеточный матрикс образован структурными и фибриллярными белками, протеогликанами и гликозаминогликанами (рис. 1). Один из основных компонентов ВКМ и эндотелиального гликокаликса клетки – ГК, по химическому строению относится к линейным, несulfатированным гликозаминогликанам. Структурной единицей ГК является повторяющийся дисахарид, состоящий из остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина (рис. 2), т.е. ГК – это регулярный полисахарид. В условиях *in vivo* ГК представлена в основном высокомолекулярной (нативной) формой ГК (ВМВ-ГК); в условиях СВО преобладает низкомолекулярная ГК (НМВ-ГК) (табл. 1) [7]. ГК обнаруживается во внутриклеточных компартаментах, а также локализуется на поверхности клеток, в перичеллюлярном и внеклеточном матриксе. Значительные ее количества содержатся в тканях с высоким пролиферативным потенциалом и инвазивной способностью [8]. Стабилизация трехмерной структуры ВКМ происходит за счет нековалентных взаимодействий ГК с малыми протеогликанами, в результате чего формируется трехмерная решетчатая структура, окружающая клетки [9], которая выполняет функции фильтра и служит первой линией межклеточного взаимодействия: адгезии, миграции и последующей функциональной активности. Организующее и стабилизирующее действие ГК в составе решетчатой структуры имеет ключевое значение для физиологии ВКМ и гликокаликса клетки [10, 11].

### **ФУНКЦИИ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В СОСТАВЕ ГЛИКОКАЛИКСА**

На люминальной поверхности эндотелия находится поверхностный слой (endothelial surface layer – ESL), включающий гликокаликс – комплексную структуру, состоящую из заякоренных в мембране протеогликанов и гликопротеинов, содержащих большое количество сиалированных и сульфатированных остатков, образующих общий отрицательный заряд поверхности эндотелиальных клеток (рис. 3). ГК присутствует в слое, который находится в постоянном динамическом взаимодействии с кровью и образован секретлируемыми и циркулирующими молекулами (ГК, альбумин и  $\alpha$ 1-кислый гликопротеин) [12, 13]. Эндотелиальному гликокаликсу в настоящее время отводится ключевая роль в регуляции физиологических и патофизиологических процессов в сосудистом



**Рис. 1.** Состав и строение внеклеточного матрикса (ВКМ\*). 1 – ядро клетки; 2 – гиаладгерин; 3 – гиалуроновая кислота (ГК); 4 – гликопротеин; 5 – интегрин; 6 – синдекан; 7 – эластан; 8 – коллаген; 9 – фибронектин; 10 – ламинин; 11 – нидоген; 12 – гельформирующие полисахариды; 13 – малый растворимый протеогликан. \*ВКМ – внеклеточный комплекс гликозаминогликанов и белков как связанных с мембраной, так и интегрированных в состав комплекса за счет углевод-белковых и углевод-углеводных взаимодействий. Имеет ячеистое строение, формирует каркас для клеток и образует основу соединительной ткани. Благодаря ВКМ обеспечивается механическая поддержка клеток в составе ткани, межклеточные контакты, транспорт, миграция клеток. Для клеток в составе ткани граница между ВКМ и гликокаликсом достаточно условная. Считается, что углеводный слой, непосредственно прилегающий к плазмолемме, – гликокаликс; слой гликозаминогликанов, расположенный над ним и включающий белковые молекулы, – ВКМ. Повреждение ВКМ ведет к нарушению организации ткани с изменением функции органа

русле: проницаемости, тонуса, свертываемости крови, воспалительного процесса [14]. Поскольку потеря контроля над регуляцией этих процессов значима для патогенеза ПЭ, то можно предположить, что эндотелиальный гликокаликс может быть центральной мишенью приложения факторов, дестабилизирующих гомеостаз (при ПЭ это плацентарная ишемия и развитие чрезмерного СВО), вследствие чего развиваются клинические проявления различной степени выраженности.

Согласно современным представлениям, регуляция сосудистого тонуса складывается из клеточной механики и регуляции механических стимулов. Механические стимулы являются внешними факторами, которые вызывают процесс механотрансдукции, т.е. изменения экспрессии генов и фенотипа клетки вследствие напряжения сдвига (тангенциальное давление кровотока на эндотелиальные клетки), напряжения сосудистой стенки, гидростатического дав-

ления крови, межклеточных контактов [15]. Клеточная механика эндотелиальных клеток включает свойства отдельных субклеточных компартментов (гликокаликса, клеточной мембраны, цитоплазмы и ядра), которые регулируются как механическими стимулами, так и биологически активными молекулами [16, 17]. Структуры, определяющие механику эндотелиальных клеток, взаимосвязаны: кортикальный слой, расположенный под плазматической мембраной, образован пучками микрофиламентов, контактирующих со стресс-фибриллами, микротрубочками и промежуточными филаментами; все компоненты организованы в сеть, заполняющую цитоплазму, и связаны с ядром клетки (рис. 3) [18]. Функция гликокаликса в этой связи заключается в преобразовании биомеханических и биохимических сигналов, исходящих из кровотока в эндотелиальную клетку [15], а эффективность ее выполнения определяется интактностью эндотелиального поверхностного слоя.

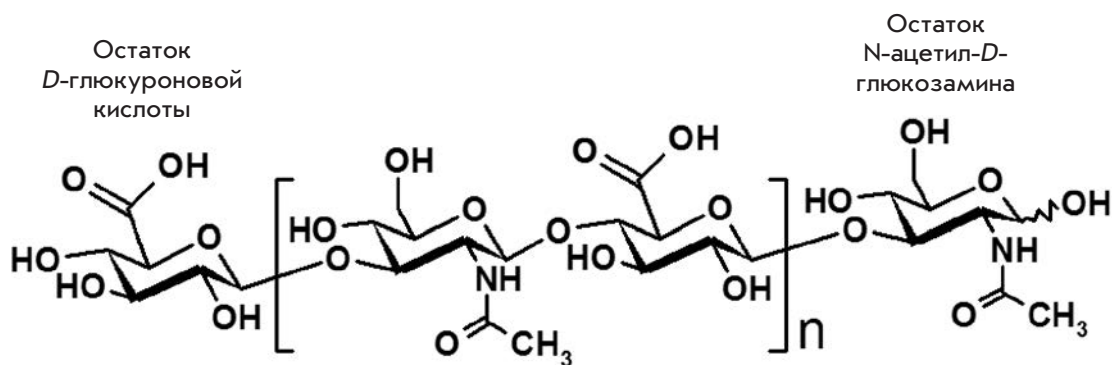


Рис. 2. Химическое строение гиалуроновой кислоты

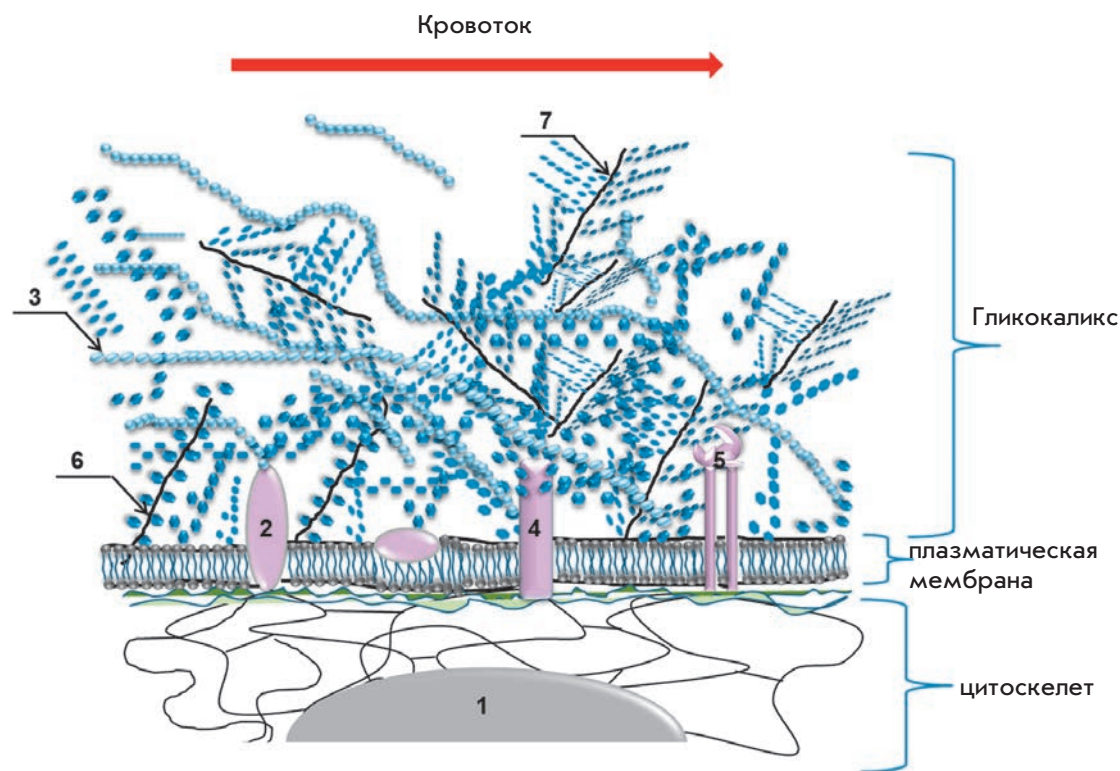
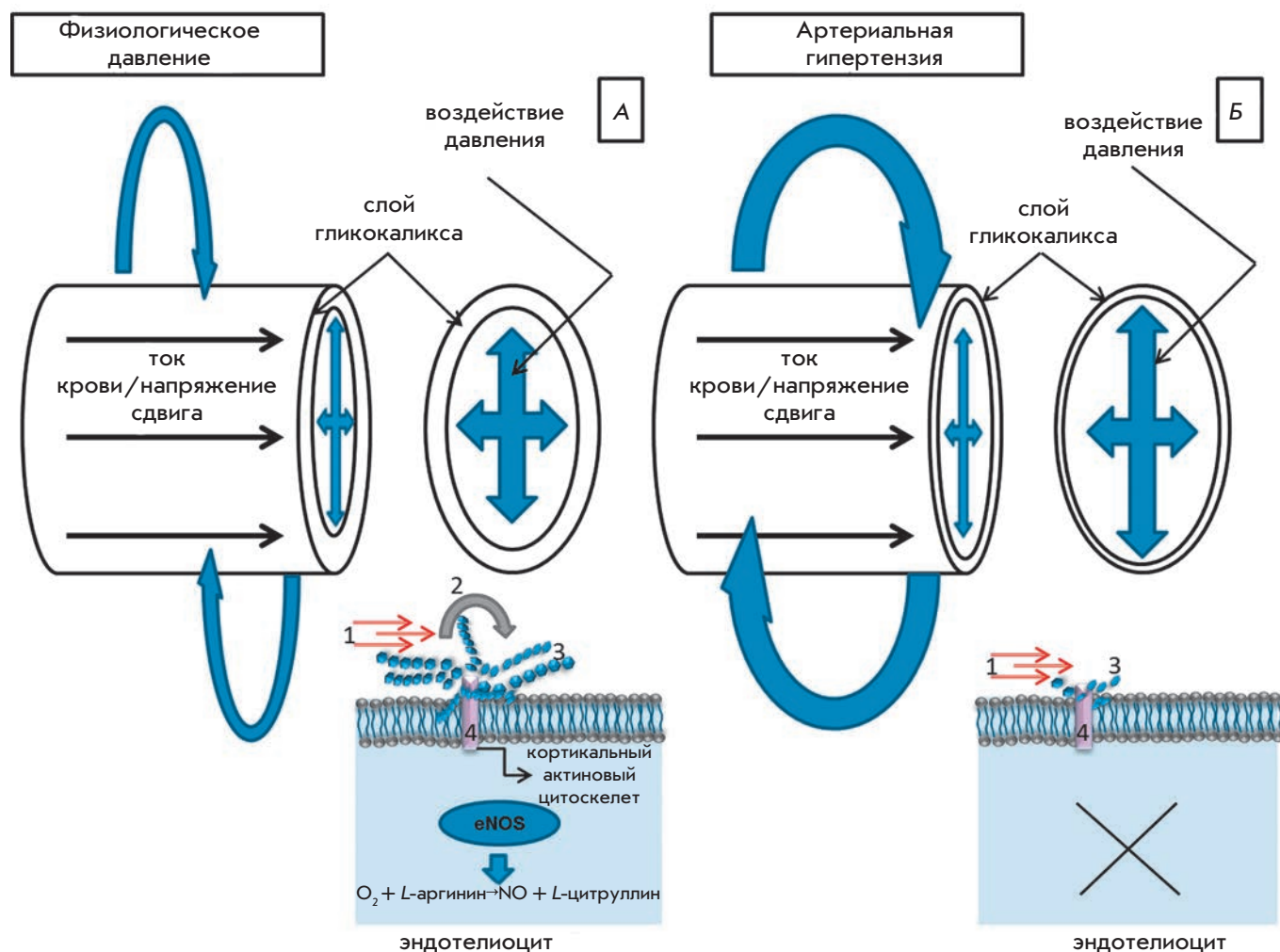


Рис. 3. Состав и строение эндотелиального гликокаликса\*. 1 – ядро клетки; 2 – гиаладгерин; 3 – гиалуроновая кислота (ГК); 4 – гликопротеин; 5 – интегрин; 6 – синдекан; 7 – малый растворимый протеогликан. \*Гликокаликс – внешняя, ассоциированная с мембраной углеводная оболочка клетки, представляющая собой полисахаридный гель. У циркулирующих клеток и клеток, находящихся в соприкосновении с биологическими жидкостями организма, гликокаликс выполняет рецепторную, защитную функцию, а также функцию преобразователя внешних сигналов. При сдвигании гликокаликса меняется рецепторный аппарат клетки

Воздействие физиологического напряжения сдвига на интактный гликокаликс вызывает ответ механически чувствительных клеточных компонентов: ионных каналов, кавеол, интегринов, кадгеринов, рецепторов ростовых факторов, структур цитоскелета, и активирует сигнальные пути, включенные в процесс механотрансдукции [19, 20]. Основным итогом этого воздействия – постоянная продукция эндотелиальной NO-синтазы (eNO-синтаза), регулирующей

образование эндогенного оксида азота, фактора, поддерживающего физиологические значения артериального давления в системе кровообращения. В условиях повышенных значений напряжения сдвига на эндотелиальные клетки, наблюдаемых при возросшем объеме и скорости кровотока при беременности, адекватный гликокаликс способствует повышенной активации eNO-синтазы, что компенсирует гемодинамическую нагрузку [21]. Дестабилизация





**Рис. 4.** Роль гликокаликса в регуляции сосудистого тонуса. А – регуляция тонуса сосудов при физиологических условиях. Физиологический (интактный) гликокаликс является проводником-преобразователем на эндотелиоцит механических воздействий: напряжения сдвига (1), действующего параллельно стенке сосуда (создает внутреннее напряжение, реализующееся в виде активации сигнальных систем, регулирующих тонус сосудов и проницаемость), и кровяного давления, действующего перпендикулярно стенке сосуда и оказывающего растягивающее воздействие на все компоненты сосуда и ВКМ. Гликокаликс принимает на себя механическую нагрузку в виде локального крутящегося момента (2), рассеивает ее и передает сигнал через цепи протеогликанов (3) на так называемые коровые (заякоренные в мембране) белки (4). Основным итогом является активация eNOS, синтез эндогенного NO, оказывающего вазодилатирующий эффект, и реорганизация актинового цитоскелета, обеспечивающая адаптацию межклеточных контактов к механической нагрузке [15, 21, 134]. Б – регуляция тонуса сосудов при артериальной гипертензии. Сокращение или полное отсутствие слоя гликокаликса при патофизиологических процессах реализуется в воздействии механической нагрузки непосредственно на апикальную мембрану клетки и подавлению продукции эндогенного NO клетками эндотелия. Результатом является увеличение кровяного давления и нарушение межклеточных контактов [21, 134]. X – синтез эндогенного NO отсутствует

и сдувание гликокаликса критически меняет ответ эндотелиальных клеток на механические стимулы. Сокращение слоя гликокаликса снижает механическую чувствительность клеток эндотелия, что в условиях увеличения кровотока оказывает сосудосуживающий эффект (рис. 4).

Сокращение слоя гликокаликса проявляется также в нарушении барьерной функции эндотелия, поскольку гликокаликс играет ключевую роль в регуляции сосудистой проницаемости. Показано, что ГК (ВМВ-ГК) связывает и ингибирует активность внеклеточной сериновой протеазы – фермента, вы-



зывающего деградацию ВКМ и гликокаликса [7]. Фрагменты ГК разной молекулярной массы взаимодействуют с разными вариантами рецептора CD44. ВМВ-ГК негативно регулирует сосудистую проницаемость, активируя сигнальные пути, связанные с формированием кортикального слоя актиновых микрофиламентов и образованием плотных межклеточных контактов. НМВ-ГК позитивно регулирует проницаемость сосудов, вызывая активацию рецептора, активируемого протеазой (PAR) эндотелиоцитов, что способствует формированию актиновых стресс-фибрилл и нарушению межклеточных контактов [22, 23].

С интактностью гликокаликса связывают и адекватное функционирование гломерулярного барьера [12]. Ферментативное удаление ГК с эндотелия гломерулярных капилляров у мышей ведет к нарушению проницаемости гломерулярного фильтра и появлению белка в моче [24].

Предполагается, что интактность гликокаликса опухолевых клеток определяет их инвазивные свойства, поскольку напряжение сдвига интерстициальной жидкости воздействует на механорецепторы клетки [25, 26]. При экспериментальном моделировании инвазивных свойств опухолевых клеток (карцинома почки человека: клеточные линии SN12L1 и SN12C с высоким и низким метастатическим потенциалом соответственно) в трехмерной модели интерстициального потока жидкости показано, что воздействие гиалуронидазы и гепариназы на клетки блокирует экспрессию ММП-1 и ММП-2, обуславливаемую давлением интерстициальной жидкости, сокращая инвазивный потенциал клеток. Деградация гликокаликса, в частности разрушение ГК, блокирует опухолевую инвазию и негативно регулирует инвазивные и миграционные свойства клеток [27].

Дестабилизации и шеддингу компонентов гликокаликса способствуют гипергликемия, эндотоксемия, септический шок, окисленные липопротеины низкой плотности, цитокины, натрийуретический пептид, аномальное напряжение сдвига, процессы ишемии-реперфузии, а также развитие СВО, разная степень выраженности которого сопровождается любой патологический процесс [28, 29]. Сокращение/дестабилизация слоя гликокаликса вследствие шеддинга или направленного удаления ГК гиалуронидазами ухудшает механочувствительный ответ эндотелиальных клеток [30].

### БИОСИНТЕЗ И МЕТАБОЛИЗМ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

При физиологических условиях процессы биосинтеза и деградации гликокаликса уравновешены [28,

31] и обусловлены активностью гиалуронатсинтаз (HAS1, HAS2, HAS3) и гиалуронидаз (Hyal1, Hyal2, PH-20/SPAM1) [9, 32–34]. Гены *Hyal3*, *Hyal4* и *Hyalp1* имеют высокую степень гомологии с генами, кодирующими гиалуронидазы Hyal1, Hyal2 и PH-20, но Hyal3 и Hyal4 не проявляют гиалуронидазной активности, а *Hyalp1* является псевдогеном [35].

### Гиалуронатсинтазы и нарушения синтеза гиалуроновой кислоты

HAS1 синтезирует ГК с широким диапазоном молекулярных масс (500–2000 кДа), HAS2 – высокомолекулярную ГК (ВМВ-ГК), HAS3 – низкомолекулярную ГК (НМВ-ГК) с массой менее 500 кДа [33, 34]. Ферментативная активность HAS2 и HAS3 выше, чем HAS1 [36].

Активность гиалуронатсинтаз человека регулируется генами *HAS1*, *HAS2* и *HAS3*, локализованными на разных аутосомах. Исследования эмбриогенеза мыши показали, что *HAS1* экспрессируется в течение гастрюляции и ранней нейруляции, *HAS2* – в структурах сердца и скелета раннего эмбрионального периода, экспрессия *HAS3* ограничена зачатками зубов и волосяных фолликулов [34, 37, 38], что предполагает наличие разных регуляторных элементов, контролирующих транскрипцию. Нарушение экспрессии *HAS2* при эмбриогенезе ведет к гибели эмбриона; у эмбрионов *HAS2*-null обнаружены дефекты эндокардиальной подушки, желточного мешка и васкулогенеза, а также нарушение эпителиально-мезенхимальной трансформации [34, 35, 39, 40]. Делеция *HAS2* ведет к нарушению формирования конечностей эмбриона, в том числе суставов [35]. У мышей *HAS1*<sup>-/-</sup> наблюдается хроническое воспаление суставов с повреждением суставного хряща; при этом содержание ГК в ВКМ у мышей с нокаутом и мышей дикого типа было одинаковым. Предполагается, что *HAS1* важен для метаболизма ГК при воспалении [41]. Мыши с нокаутом генов *HAS1* или *HAS3* были жизнеспособными и фертильными. При двойном нокауте этих генов отмечено усиление воспаления на фоне регенерации раны кожи у мыши [36]. Однако есть сообщения о сокращении размеров мозга и приступах эпилепсии у мышей с нокаутом генов *HAS*, причем эпилепсия наиболее выражена при нокауте гена *HAS3* [42]. У млекопитающих все гены *HAS* экспрессируются в эмбриональных тканях и тканях взрослых особей, но экспрессия *HAS3* более выражена во взрослых тканях [35]. При канцерогенезе возрастает экспрессия всех генов *HAS*, особенно *HAS2* [37].

Повышенная активность гиалуронатсинтаз у собак породы шар-пей фенотипически проявляется утолщением кожи, появлением кожных складок, повыше-

нием ГК в коже и аномально высокой концентрацией ГК в крови [43]. Содержание ГК повышено в коже голого землекопа (*Heterocephalus glaber*), небольшого роющего грызуна семейства землекоповых, особенностью которого является высокая продолжительность жизни (около 30 лет) и устойчивость к канцерогенезу. Фибробласты, выделенные из кожи голого землекопа, продуцируют высокий уровень ВМВ-ГК. У них также найдена необычная форма HAS2 (замены Ser на Asn в двух консервативных участках полипептидной цепи) и сниженный уровень фермента Hyal2, деградирующего ГК [35]. Млекопитающие этого вида служат моделью для изучения устойчивости к болезням и старению, в частности ([www.naked-mole-rat.org](http://www.naked-mole-rat.org)). Примечательно, что для собак породы шар-пей и голого землекопа характерна высокая степень инбридинга.

В целом, нарушения биосинтеза ГК более изучены *in vitro* на клетках и на животных моделях. Весьма ограниченные данные указывают на связь мутации в гене *HAS2* с развитием дефекта межжелудочковой перегородки у детей в китайской популяции [44]. Показано также, что экспрессия *HAS2* повышена при синдроме Дауна [45].

#### Гиалуронидазы и нарушения метаболизма гиалуроновой кислоты

Экспрессия *Hyal1*, *Hyal2* и *Hyal3* обнаружена в соматических тканях, *SPAM1* в тканях яичка (*SP-20* необходим для фертилизации), *Hyal4* – в скелетных мышцах и плаценте [35, 44, 46–48]. Деградация ГК может происходить как внутри клетки в лизосомах, так и внеклеточно. *Hyal1* активна в лизосомах, гиалуронидаза РН-20 функционирует на клеточной поверхности как GPI – якорный белок, *Hyal2* расщепляет ГК как в лизосомах, так и во внеклеточном пространстве [34]. Для каждой из гиалуронидаз характерна своя локализация в различных клетках и определенный диапазон рН, в пределах которого они проявляют активность, что ведет к генерации разных по молекулярной массе гиалуроновых кислот [7].

С недостаточностью ферментов, разрушающих ГК, связаны единичные случаи мукополисахаридоза типа IX – генетически детерминированного заболевания соединительной ткани. Биохимически мукополисахаридоз типа IX проявляется накоплением ГК в тканях, в большей степени в лизосомах макрофагов, в меньшей – в лизосомах фибробластов, а также повышением концентрации ГК в крови при полном отсутствии фермента [35, 49, 50]. Клинически мукополисахаридоз типа IX проявляется черепно-лицевым дисморфизмом, задержкой роста, отечностью, болезненностью су-

ставов и ювенильным идиопатическим артритом. Неврологический статус и интеллектуальное развитие больных остается в пределах нормы [35]. Генетический анализ показал гомозиготность и мутации в гене *Hyal1*, однако отсутствие выраженных аномалий свидетельствует о компенсации функции *Hyal1* другими гиалуронидазами [35].

Показано, что в тканях мышей *Hyal1*<sup>-/-</sup> не происходит генерализованного накопления ГК, но выражены дегенеративные изменения хряща коленного сустава. Мыши *Hyal2*<sup>-/-</sup> характеризуются аномалиями скелета, гемолитической анемией, тромботической микроангиопатией, тяжелой сердечно-легочной недостаточностью и высокой летальностью [51–53]. Последствия ишемически-реперфузионного повреждения почки у мышей с нокаутом были более тяжелыми, чем у мышей дикого типа. У мышей с нокаутом отмечен высокий уровень накопления ГК в поврежденной почке, более выраженное воспаление и фиброз почки [54].

Наиболее изучена на сегодняшний день связь между экспрессией генов ферментов обмена ГК и инвазивными свойствами клеток, а также прогрессией заболевания. Экспрессия гена *HAS1* выявлена на низком уровне в большинстве нормальных клеток, *HAS2* – преимущественно в эмбриогенезе. Экспрессия *HAS1* значительно увеличена при канцерогенезе, а *HAS2* и *HAS3* при агрессивных формах рака [37]. Наиболее агрессивными свойствами обладают клетки, экспрессирующие *HAS2*. Изучение экспрессии гиалуронатсинтаз/гиалуронидаз на панели клеточных линий рака молочной железы человека с разными инвазивными свойствами показало, что высокоинвазивные клетки экспрессируют преимущественно изоформы *HAS2* и *Hyal2*, а менее инвазивные – *HAS3* и *Hyal3* [55]. Трансфекция клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, иммортализованных кератиноцитов человека линии HaCat и клеток первичной культуры эпидермальных кератиноцитов мыши *HAS3*-содержащими конъюгатами показала, что увеличенный синтез ГК вызывает образование на поверхности клеток множественных протрузий типа микроворсинок, функция которых, по-видимому, состоит в образовании сайтов для контактов, прикрепления и миграции клеток [56]. В этой связи, важной представляется экспрессия в области микроворсинок рецептора *erbB2* (*HER-2/neu*) [57]. Предполагается, что ГК может иметь ключевое значение в опухолевой инвазии, поскольку существует прямая связь между увеличением экспрессии ГК и *erbB2*, что способствует активации *erbB2*-зависимой сигнализации и свидетельствует о важности ГК для манифестации инвазивного клеточного фенотипа [56].

Таблица 1. Биологическая роль ГК разной молекулярной массы

Фракции ГК		
<b>ВМВ-ГК (высокомолекулярная ГК)</b> молекулярная масса более 500 кДа, в среднем $10^6$ – $10^7$ Да (~2000–25000 дисахаридных звеньев) [9, 73, 74]	<b>НМВ-ГК (низкомолекулярная ГК)</b> молекулярная масса <500 кДа (~1000 дисахаридных звеньев и меньше) [74, 80]	<b>О-ГК (олигомерные молекулы)</b> молекулярная масса 0.75–10 кДа (2–20 дисахаридных звеньев) [75]
Формирование и стабилизация структуры ВКМ и гликокаликса клетки; иммунологически инертен [75, 76]; связывает рецепторы клетки, препятствует иммунному распознаванию; иммуносупрессорное действие [77]; индукция экспрессии Foxp3, увеличение численности индуцибельных регуляторных Т-клеток [77, 78]; сохранение барьерной функции гломерулярного барьера и эндотелия [7]; подавление синтеза ГК [74]	Несет функцию «сигнала опасности» (danger-associated molecular patterns) [9]; усиливает проницаемость лимфатических капилляров [81], увеличивает сосудистую проницаемость [7]	Могут как позитивно, так и негативно регулировать различные процессы, ингибируют эндогенную продукцию гиалуронана [9]
Противовоспалительное действие, ингибирование фагоцитоза [77]	Провоспалительное действие [33]	
Антиангиогенное действие, препятствует трансэндотелиальной миграции [77]	Проангиогенное действие, стимуляция пролиферации эндотелиальных клеток, адгезии, формирования капилляров [33]	Стимуляция/ингибирование ангиогенеза, адгезии [9, 80]
Синтез иммуносупрессорных цитокинов [77]	Синтез провоспалительных цитокинов [33]	
Стимулирует пролиферацию и ингибирует апоптоз децидуальных стромальных клеток в ранней беременности [79]	Стимулирует апоптоз децидуальных стромальных клеток в ранней беременности [79]	Стимуляция пролиферации/апоптоза опухолевых клеток [74]
Препятствует адгезии и инвазии опухолевых клеток [77]	Стимуляция инвазии и миграции опухолевых клеток, а также инвазии вневорсинчатого трофобласта [82]	

**РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИМЕРОВ ГК РАЗНОГО РАЗМЕРА**

В незначительных количествах ГК выявляют в крови здоровых лиц [28, 31], тогда как высокий уровень ГК обнаруживается при хронической болезни почек [58], сердечно-сосудистых заболеваниях [59], легочной гипертензии [60], циррозе печени [61, 62], раке [63]. Имеются также данные о повышенном содержании ГК в крови при ПЭ [64, 65] и HELLP-синдроме [66]. Также при ПЭ повышен уровень антител к ГК и ее структурному дисахариду [67, 68]. Источник ГК в крови при ПЭ не ясен – предполагается, что ГК появляется в крови в результате дисфункции эндотелия матери [69], другим источником ГК может быть плацента [64, 70].

В физиологических условиях преобладает ВМВ-ГК, при воспалительном ответе и тканевом повреждении – НМВ-ГК [71]. Воспалительный ответ ведет к деградации ГК и образованию фрагментов разного размера, которые оказывают разнонаправленный эффект на функции клеток, органов и систем [29]. Взаимодействие ВМВ-ГК и НМВ-ГК с мембранными рецепторами клетки индуцирует различные сигналь-

ные пути, позитивно/негативно регулирующие одни и те же процессы [72]. Характеристика ГК различной массы представлена в *табл. 1*

**РЕЦЕПТОРЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Функциональные свойства ГК проявляются через взаимодействие с ее рецепторами – гиалуронан-связывающими белками, или «гиаладгеринами». Специфические взаимодействия ГК с рецепторами регулируют межклеточную адгезию, миграцию клеток, дифференцировку, клиренс ГК, проведение сигнала в клетку и воспалительный ответ [83–85]. Наиболее важными рецепторами ГК являются: RНАММ – первый из идентифицированных рецепторов, обнаруженный как на поверхности клеток, так и внутри (в цитоплазме и ядре), и CD44 – основной рецептор ГК клеточной поверхности [37]. Взаимодействие ГК–RНАММ играет ключевую роль в активации сигнальных каскадов, через рецептор PDGF, Ser/Thr-киназу и MAP-киназы Erk [85, 86]. Активация внутриклеточного RНАММ-рецептора вызывает реорганизацию цитоскелета и регулирует миграцию и пролиферацию клеток [37, 87]. Сигналы

ГК-CD44 также включают активацию рецепторных тирозинкиназ (рецептора PDGF- $\beta$  и ErbB2/Her2), белков семейства ERM, обеспечивающих взаимодействие актинового цитоскелета с цитоплазматической мембраной (мерлина, эрина, радиксина и моэзина), белка IQGAP1, ассоциированного с актиновым цитоскелетом, активация которого регулирует морфологию клетки, подвижность, адгезию и клеточный цикл [34, 37, 88–93]. CD44 способен формировать комплекс с фактором обмена гуаниновых нуклеотидов Tiam1 [94]. Связывание комплекса с ГК активирует опосредованный Ras1 сигнальный путь, также регулирующий реорганизацию цитоскелета [37]. Предполагается, что метаболизм ГК может регулироваться при помощи CD44, поскольку показан блокирующий эффект анти-CD44-антител на эндцитоз и расщепление ГК *in vitro* [95].

Регуляцию метаболизма ГК осуществляют гиаладгерины LYVE-1, STABILIN-1, а также STABILIN-2, основной рецептор ГК в печени [34]. Позитивная регуляция воспалительной реакции наблюдается при связывании НМВ-ГК или О-ГК с Toll-подобными рецепторами (TLR2, TLR4) [33]. Связывание с рецептором инициирует MAP-киназный каскад, ядерную транслокацию NF- $\kappa$ B и продукцию TNF $\alpha$  [96]. Функция стабилизации структуры ВКМ и гликокаликса клетки в основном обеспечивается крупными протеогликанами, ITI-протеогликанами, TSG-6 и SHAP [33, 97], однако любой гиаладгерин, связывающий ГК, также принимает участие в стабилизации надклеточных структур. Характеристика наиболее изученных гиаладгеринов человека представлена в табл. 2.

### ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА И ЕЕ РЕЦЕПТОРЫ В ПЛАЦЕНТЕ

В тканях плаценты ГК обнаруживается в структурах стромы матки и плаценты, а также в очагах ангиогенеза децидуа базалис мезометрия [99], мезенхимальных ворсинах и незрелых промежуточных ворсинах плаценты [101]. Показано также ее участие в децидуализации эндометрия у мышей [126]. Изучение распределения ГК и ее рецептора CD44 в ткани плаценты человека при физиологической беременности показало, что в первой половине беременности ГК интенсивно экспрессируется только в строме мезенхимальных ворсин, клетки которых интенсивно пролиферируют и дифференцируются, обеспечивая развитие ворсинчатого дерева плаценты. В ворсинах другого типа ГК выявлялась только в фетальных сосудах и соединительной ткани, прилежащей к трофобласту, а также в ограниченных участках стромы ворсин, прилегающих к клеткам вневорсинчатого цитотрофобласта и клеточным колоннам.

Предполагается, что значительные количества ГК, обнаруженные в мезенхимальных и незрелых промежуточных ворсинах, необходимы в качестве субстрата, через который осуществляется миграция мезенхимальных клеток и прорастание кровеносных сосудов. В зрелой плаценте строма ворсин всех типов гомогенно окрашивается «на ГК» [101].

В ткани плаценты также экспрессируются рецепторы ГК. Так, на децидуальных клетках, лимфоцитах, локализованных в области децидуа базалис, клеточных элементах стромы эндометрия при физиологической беременности обнаружена экспрессия CD44 [99]. Инвазивный вневорсинчатый трофобласт экспрессирует CD44 в первой половине беременности. Увеличение экспрессии CD44 позитивно влияет на инвазивные свойства трофобласта в матрикеле, причем ВМВ-ГК ингибирует CD44-опосредованную инвазию, а НМВ-ГК, напротив, усиливает [82]. R. Zhu и соавт. показали, что экспрессия ГК и HAS2 трофобластом при физиологической беременности выше по сравнению с выкидышами ранних сроков, что также предполагает участие ГК в морфогенезе плаценты. Однако анализ влияния ГК разной молекулярной массы на инвазию трофобласта в матрикеле показал, что ВМВ-ГК усиливает пролиферацию и инвазивные свойства трофобласта, ингибирует апоптоз и активирует сигнальные пути PI3K/AKT и MAPK/ERK1/2 в трофобласте, а НМВ-ГК не оказывает такого эффекта. Блокирование сигналов PI3K/AKT или MAPK/ERK1/2 ингибирует ГК-зависимую пролиферацию и инвазивные свойства трофобласта [79]. Аналогичные результаты получены для децидуальных стромальных клеток при беременности ранних сроков: при выкидышах экспрессия ГК, HAS2 и CD44 была ниже, чем при физиологической беременности, ВМВ-ГК позитивно регулировал пролиферацию, апоптоз и опосредованные PI3K/AKT и MAPK/ERK1/2 сигналы децидуальных стромальных клеток, что иллюстрирует роль ГК и ее рецептора в децидуализации и плацентации на ранних сроках беременности [127].

При беременности ранних сроков рецептор CD44 детектируется в ограниченном числе клеток Хофбауэра стромы ворсин и эндотелиальных клеток мелких сосудов. Возрастание экспрессии отмечается к 16-й неделе гестации – рецептор выявлялся в интима фетальных сосудов и прилегающей к ним соединительной ткани; ограниченное окрашивание отмечено в цитотрофобласте островков базальной пластины. К концу беременности экспрессия рецептора наблюдалась в ворсинах различных типов, наиболее выраженным окрашиванием было в стволовых ворсинах. Изменение регуляции экспрессии ГК и ее рецептора в тканях плаценты на разных сроках гестации позво-



Таблица 2. Характеристика гиаладгеринов человека

Рецептор	Экспрессия	Функция	Источник
CD44 – молекула адгезии, основной рецептор ГК. Изоформы: CD44s (стандартная), CD44e (эпителиальная), CD44v (вариантная)	Лейкоциты, эритроциты, некоторые эпителиальные клетки, клетки головного мозга, децидуальные стромальные клетки, клетки Кащенко–Хорфауэра, ткань плаценты; повышенная экспрессия в клетках опухолей	Опосредует процессы активации лимфоцитов, адгезии, миграции (роллинга и хоминга лимфоцитов), эмбрионального развития, ангиогенеза, ремоделирование ткани плаценты при плацентогенезе, а также инвазии и роста опухолевых клеток, воспаления. Стабилизация ВКМ и гликокаликса, биодермация ГК, индукция экспрессии CD4+CD25+ T-регуляторных клеток	[9, 33, 37, 79, 80, 98–102]
L XVE-1 – частичный гомолог CD44, основной рецептор ГК в лимфатической системе	Клетки лимфатических сосудов, эндотелий лимфатических капилляров, синусоидальные эндотелиальные клетки печени и селезенки, нейроны коры головного мозга, макрофаги в нормальных и опухолевых тканях, плацентарные макрофаги, фетальный эндотелий плаценты, синцитиотрофобласт	Регуляция подвижности клеток, биодермация ГК в лимфатической системе. Регуляция метаболизма ГК в фетоплацентарной системе. Регулирует адгезию и миграцию дендритных клеток, лимфангиогенез. Функциональная активность регулируется сиалированием/десиалированием O-целей гликанов рецептора	[11, 103–106]
CD168-RHAMM вне/внутриклеточный ГК-связывающий рецептор	Внутриклеточная локализация (цитоплазма, цитоскелет, митохондрии, ядро); внеклеточная локализация (транспортируется на клеточную поверхность, где способен связывать ГК и активировать различные сигнальные каскады); слабая экспрессия в нормальных клетках	Клеточная сигнализация, миграция, локомоция и адгезия, ангиогенез. Регуляция митоза. Локализация на клеточной поверхности коррелирует с опухолевой прогрессией	[9, 80, 101, 107–109]
ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии	Индукцибельная экспрессия на эндотелии, моноцитах, T- и B-лимфоцитах, кератиноцитах; экспрессируется при воспалении и опухолевых процессах	Регуляция воспалительного процесса. Опосредует контакт лейкоцита или опухолевой клетки с эндотелием для последующей трансэндотелиальной миграции или инвазии; контактные взаимодействия клеток в иммунном ответе. Ингибирование катаболизма коллагена II типа	[110–114]
TSG-6 (TNF-стимулируемый ген 6)	Индукцибельный секретлируемый пептид, экспрессируется многими клетками при активации	Противовоспалительное действие: ингибирует миграцию нейтрофилов в модели остро воспаления. Является кофактором для других гиаладгеринов	[33, 29, 72, 115]
TLR2 и TLR4 (Toll-подобные рецепторы)	Дендритные клетки, моноциты, лимфоциты	Регуляция (стимуляция/ингибирование) воспалительного процесса при связывании рецепторов	[77, 116]
STAB1IN-1/2 (скавенджер-рецепторы)	Конститутивно экспрессируется макрофагами (M2), синусоидальными эндотелиальными клетками; экспрессия возрастает при воспалении и канцерогенезе	Биодермация ГК	[11, 117, 118]
CD38 – бифункциональный фермент – сочетает активность рибозилликазы аденозиндифосфата (ADP) и тидролазы циклической ADP-рибозы (сADPR)	В онтогенезе на гемопозитических клетках различных стадий дифференцировки; клетки иммунной системы, гладкомышечные клетки сосудов и бронхов	Фермент, регулирующий концентрацию внутриклеточного кальция и энергетический гомеостаз клетки	[119–122]
HAVP1/C1QBP – ГК-связывающий белок-1/ белок, связывающий субкомпонент с1q	Клетки периферической крови, макрофаги, моноцитарные дендритные клетки	Клеточная сигнализация, регуляция активации системы комплемента	[33, 123]
SHAP – сывороточный ГК-ассоциированный белок	Циркулирует в крови	По строению идентичен ITIH2 – ингибитору интер-альфа-трипсина тяжелой цепи 2. Образует комплекс с ГК, выступает как кофактор при связывании с др. рецепторами (CD44). Уровень комплекса SHAP-ГК является индикатором дегенеративных изменений печени и отсутствия матрикса овулирующих ооцитов	[33]
ITP1-протеогликаны: ингибиторы интер-альфатрипсина	ВКМ, гликокаликс	Целостность и стабилизация структуры ВКМ и гликокаликса клеток	[77, 119, 124, 125]
Крупные агрегированные протеогликаны: агрекан, бревикан, нейрокан, версикан	Протеогликаны матрикса содержатся преимущественно: агрекан – в гиалиновых хрящах; нейрокан и бревикан – в тканях мозга; версикан – множество тканей, строма эндометрия, особенно важен для гликокаликса сосудов	Целостность и стабилизация структуры ВКМ и гликокаликса клеток, канцерогенез	[33, 126]

лило сделать вывод об активном участии ГК в раннем морфогенезе плаценты, а также о важной роли CD44 в ремоделировании тканей на поздних сроках беременности [128].

Рецептор ГК LYVE-1 идентифицирован в фетальном эндотелии плаценты [104] и синцитиотрофобласте [105], однако на сроке 33–34 недель гестации его экспрессия была выше по сравнению со зрелой плацентой [104]. LYVE-1 экспрессируется также в популяции плацентарных макрофагов с фенотипом DC-SIGN+CD163+, локализованных в ворсинах хориона зрелой плаценты человека [105]. При экспериментальном моделировании перитонеального эндометриоза у мышей показано, что экспрессия LYVE-1 эндотелием лимфатических сосудов повышается только после наступления беременности. У пролеченных особей вне беременности такой эффект отсутствовал, что является косвенным свидетельством участия LYVE-1 в ангиогенезе [129]. В эндометрии человека отсутствуют лимфатические сосуды; беременность вызывает быструю индукцию лимфангиогенеза в децидуальной оболочке матки [130]. Предполагается участие LYVE-1 в манифестации инвазивного фенотипа трофобласта в плаценте, однако эти предположения носят спекулятивный характер, поскольку имеются свидетельства отсутствия рецептора на фетальном эндотелии и эндотелии лимфатических сосудов при децидуализации [131, 132].

Высокое содержание ГК выявлено в зоне депозитов фибрина в ворсинах и межворсинчатом пространстве при ПЭ [64, 70], однако, есть сообщения об отсутствии различий в содержании ГК в тканях плаценты при физиологической беременности и ПЭ [133]. Следует отметить, что распределение ГК и ее рецепторов у пациенток с ранней ПЭ плохо изучено, что затрудняет интерпретацию результатов, поскольку именно развитие ранней ПЭ связано с нарушением морфогенеза плаценты.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ГК и ее рецепторы являются факторами, регулирующими процессы морфогенеза, эпителиально-мезенхимальной трансформации, опухолевого метастазирования и тканевого ремоделирования. ГК стабилизирует эндотелиальный гликокаликс, обеспечивает его интактность и ре-

генерацию при повреждениях, т.е. поддерживает сосудистый гомеостаз и обеспечивает барьерную функцию эндотелия. В соответствии с вышесказанным можно предположить, что при беременности ГК важна, во-первых, для морфогенеза плаценты, во-вторых, для адекватного функционирования и регуляции сердечно-сосудистой системы, включая маточно-плацентарный кровоток. В-третьих, поскольку ГК регулирует системный воспалительный ответ, то гиалуроновые кислоты разной молекулярной массы могут оказывать разнонаправленное действие при беременности, в том числе способствовать развитию патологии. Однако, несмотря на доказанное значение ГК в поддержании физиологического гомеостаза в организме, роль ГК и ее рецепторов при беременности изучена недостаточно. Это относится, прежде всего, к патогенезу ПЭ, поскольку основные клинические проявления заболевания связаны с неадекватной плацентацией, чрезмерным системным воспалительным ответом и дисфункцией эндотелия. Малоизученным остается распределение ГК и ее рецепторов при ПЭ, особенно при ее тяжелой форме. Не изучен гликокаликс гломерулярного эндотелия и эндотелия сосудов при фатальных исходах заболевания или на животных моделях, не охарактеризована молекулярная масса гиалуроновых кислот в крови пациенток с ПЭ и не показана их связь с заболеванием. Изучение ГК в данном контексте может оказаться предметом новых открытий в патогенезе ПЭ. ●

*Авторы выражают глубокую признательность и благодарность сотруднику лаборатории углеводов ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН И.С. Белянчикову и сотруднику отдела библиотечно-информационных ресурсов и телемедицины ФГБУ «НЦ АГиП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России А.Л. Комаровскому за помощь в подготовке данной рукописи.*

*Работа выполнена в рамках государственного задания на тему: «Изучение молекулярно-генетических, протеомных и митохондриальных детерминант развития преэклампсии» (ПК № 114040970024).*

*Работа Н.В. Бовина поддержана грантом РФФ № 14-14-00579.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burton G., Woods A., Jauniaux E., Kindom J. // *Placenta*. 2009. V. 30. P. 473–482.
2. Милованов А.П. Внутриутробное развитие человека. М.: МДВ, 2006. 384 с.
3. Ferretti C., Bruni L., Marie D., Pecking A., Bellet D. // *Hum. Reprod. Update*. 2007. V. 13. P. 121–141.
4. Benirschke K., Burton G.J., Baergen R.N. *Pathology of the human placenta*. N.Y.: Springer, 2012. 939 p.
5. Kaufmann P., Black S., Huppertz B. // *Biol. Reprod*. 2003. V. 69. P. 1–7.
6. Harrison D.G., Guzik T.J., Lob H.E., Madhur M.S., Marvar P.J., Thabet S.R., Vinh A., Weyand C.M. // *Hypertension*. 2011. V. 57. № 2. P. 132–140.

7. Lennon F.E., Singleton P.A. // *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 2011. V. 1. № 3. P. 200–213.
8. Afratis N., Gialeli C., Nikitovic D., Tsegenidis T., Karousou E., Theocharis A.D., Pavão M.S., Tzanakakis G.N., Karamanos N.K. // *FEBS J.* 2012. V. 279. № 7. P. 1177–1197.
9. Karbownik M.S., Nowak J.Z. // *Pharmacol. Rep.* 2013. V. 65. № 5. P. 1056–1074.
10. Heldin P. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003. V. 36. № 8. P. 967–973.
11. Jackson D.G. // *Immunol. Rev.* 2009. V. 230. № 1. P. 216–231.
12. Satchell S. // *Nat. Rev. Nephrol.* 2013. V. 9. № 12. P. 717–725.
13. Alphonsus C.S., Rodseth R.N. // *Anaesthesia.* 2014. V. 69. № 7. P. 777–784.
14. Kolářová H., Ambřuzová B., Svihálková Šindlerová L., Klinke A., Kubala L. // *Mediators Inflamm.* 2014. V. 2014. 17 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/694312>
15. Fels J., Jeggle P., Liashkovich I., Peters W., Oberleithner H. // *Cell Tissue Res.* 2014. V. 355. № 3. P. 727–737.
16. Fletcher D.A., Mullins R.D. // *Nature.* 2010. V. 463. P. 485–492.
17. Herrmann H., Bar H., Kreplak L., Strelkov S.V., Aebi U. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 8. P. 562–573.
18. Swift J., Ivanovska I.L., Buxboim A., Harada T., Dingal P.C., Pinter J., Pajeroski J.D., Spinler K.R., Shin J.W., Tewari M., et al. // *Science.* 2013. V. 341. № 6149. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3976548/pdf/nihms564861.pdf> 1240104
19. Ingber DE. // *FASEB J.* 2006. V. 20. P. 811–827.
20. Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K., Juliano R.L. // *Pharmacol. Rev.* 1988. V. 50. P. 197–264.
21. Markos F., Ruane O'Hora T., Noble M.I. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2013. V. 40. № 8. P. 489–494.
22. Mambetsariev N., Mirzapioazova T., Mambetsariev B., Sammani S., Lennon F.E., Garcia J.G., Singleton P.A. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. V. 30. P. 483–490.
23. Singleton P.A., Dudek S.M., Ma S.F., Garcia J.G. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 34381–34393.
24. Dane M.J., van den Berg B.M., Avramut M.C., Faas F.G., van der Vlag J., Rops A.L., Ravelli R.B., Koster B.J., van Zonneveld A.J., Vink H., et al. // *Am. J. Pathol.* 2013. V. 182. № 5. P. 1532–1540.
25. Yung S., Chan T.M. // *Int. J. Artif. Organs.* 2007. V. 30. № 6. P. 477–483.
26. Wheeler-Jones C.P., Farrar C.E., Pitsillides A.A. // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2010. V. 11. № 9. P. 997–1006.
27. Qazi H., Palomino R., Shi Z.D., Munn L.L., Tarbell J.M. // *Integr. Biol.* 2013. V. 5. № 11. P. 1334–1343.
28. Lipowsky H.H. // *Ann. Biomed. Eng.* 2012. V. 40. № 4. P. 840–848.
29. Taylor K.R., Gallo R.L. // *FASEB J.* 2006. V. 20. № 1. P. 9–22.
30. Klinger A.L., Pichette B., Sobolewski P., Eckmann D.M. // *Integr. Biol.* 2011. V. 3. № 10. P. 1033–1042.
31. Salmon A.H., Ferguson J.K., Burford J.L., Gevorgyan H., Nakano D., Harper S.J., Bates D.O., Peti-Peterdi J. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012. V. 23. № 8. P. 1339–1350.
32. Martin-DeLeon P.A. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006. V. 250. № 1–2. P. 114–121.
33. Jiang D., Liang J., Noble P.W. // *Phys. Rev.* 2011. V. 91. № 1. P. 221–264.
34. Spicer A.P., Tien J.Y. // *Birth. Defects. Res. C. Embryo Today.* 2004. V. 72. № 1. P. 89–108.
35. Triggs-Raine B., Natowicz M.R. // *World J. Biol. Chem.* 2015. V. 6. № 3. P. 110–120.
36. Siiskonen H., Oikari S., Pasonen-Seppänen S., Rilla K. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 43.
37. Heldin P., Basu K., Olofsson B., Porsch H., Kozlova I., Kahata K. // *J. Biochem.* 2013. V. 154. № 5. P. 395–408.
38. Spicer A.P., McDonald J.A. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 1923–1932.
39. Camenisch T.D., Spicer A.P., Brehm-Gibson T., Biesterfeldt J., Augustine M.L., Calabro A.Jr., Kubalak S., Klewer S.E., McDonald J.A. // *J. Clin. Invest.* 2000. V. 106. № 3. P. 349–360.
40. McDonald J.A., Camenisch T.D. // *Glycoconj. J.* 2003. V. 19. P. 331–339.
41. Chan D.D., Xiao W.F., Li J., de la Motte C.A., Sandy J.D., Plaas A. // *Osteoarthritis Cartilage.* 2015. V. 23. № 11. P. 1879–1889.
42. Arranz A.M., Perkins K.L., Irie F., Lewis D.P., Hrabe J., Xiao F., Itano N., Kimata K., Hrabetova S., Yamaguchi Y. // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. № 18. P. 6164–6176.
43. Ramsden C.A., Bankier A., Brown T.J., Cowen P.S., Frost G.I., McCallum D.D., Studdert V.P., Fraser J.R. // *J. Pediatr.* 2000. V. 136. № 1. P. 62–68.
44. Zhu X., Deng X., Huang G., Wang J., Yang J., Chen S., Ma X., Wang B. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 2. P. e87437.
45. Karousou E., Stachtea X., Moretto P., Viola M., Vigetti D., D'Angelo M.L., Raio L., Ghezzi F., Pallotti F., De Luca G., et al. // *FEBS J.* 2013. V. 280. № 10. P. 2418–2430.
46. Jones M.H., Davey P.M., Aplin H., Affara N.A. // *Genomics.* 1995. V. 29. P. 796–800.
47. Kim E., Baba D., Kimura M., Yamashita M., Kashiwabara S., Baba T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 18028–18033.
48. Csoka A.B., Frost G.I., Stern R. // *Matrix Biol.* 2001. V. 20. № 8. P. 499–508.
49. Natowicz M.R., Short M.P., Wang Y., Dickersin G.R., Gebhardt M.C., Rosenthal D.I., Sims K.B., Rosenberg A.E. // *N. Engl. J. Med.* 1996. V. 335. № 14. P. 1029–1033.
50. Triggs-Raine B., Salo T.J., Zhang H., Wicklow B.A., Natowicz M.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 11. P. 6296–6300.
51. Jadin L., Wu X., Ding H., Frost G.I., Onclinx C., Triggs-Raine B., Flamion B. // *FASEB J.* 2008. V. 22. P. 4316–4326.
52. Chowdhury B., Hemming R., Hombach-Klonisch S., Flamion B., Triggs-Raine B. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 520–528.
53. Onclinx C., Dogne S., Jadin L., Andris F., Grandfils C., Jouret F., Mullier F., Flamion B. // *Haematologica.* 2015. V. 100. № 8. P. 1023–1030.
54. Colombaro V., Jadot I., Declèves A.E., Voisin V., Giordano L., Habsch I., Malaisse J., Flamion B., Caron N. // *Kidney Int.* 2015. V. 88. № 1. P. 61–71.
55. Udabage L., Brownlee G.R., Nilsson S.K., Brown T.J. // *Exp. Cell. Res.* 2005. V. 310. № 1. P. 205–217.
56. Kultti A., Rilla K., Tiihonen R., Spicer A.P., Tammi R.H., Tammi M.I. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 23. P. 15821–15828.
57. Hommelgaard A.M., Lerdrup M., van Deurs B. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. № 4. P. 1557–1567.
58. Padberg J.S., Wiesinger A., di Marco G.S., Reuter S., Grabner A., Kentrup D., Lukasz A., Oberleithner H., Pavenstädt H., Brand M., et al. // *Atherosclerosis.* 2014. V. 234. № 2. P. 335–343.
59. Grundmann S., Fink K., Rabadzheva L., Bourgeois N., Schwab T., Moser M., Bode C., Busch H.J. // *Resuscitation.* 2012. V. 83. № 6. P. 715–720.
60. Aytelin M., Comhair S.A., de la Motte C., Bandyopadhyay S.K., Farver C.F., Hascall V.C., Erzurum S.C., Dweik R.A. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008. V. 295. № 5. P. 789–799.
61. Nyberg A., Engström-Laurent A., Lööf L. // *Hepatology.* 1988. V. 8. № 1. P. 142–146.
62. Gressner O.A., Weiskirchen R., Gressner A.M. // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. V. 11. P. 1031–1051.
63. Haserodt S., Aytelin M., Dweik R.A. // *Glycobiology.* 2011. V. 21. № 2. P. 175–183.



64. Matejevic D., Neudeck H., Graf R., Müller T., Dietl J. // *Gynecol. Obstet. Invest.* 2001. V. 52. № 4. P. 257–259.
65. Berg S., Engman A., Holmgren S., Lundahl T., Laurent T.C. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2001. V. 61. P. 131–137.
66. Hofmann-Kiefer K.F., Chappell D., Knabl J., Frank H.G., Martinoff N., Conzen P., Becker B.F., Rehm M. // *Reprod. Sci.* 2013. V. 20. № 10. P. 1237–1245.
67. Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Новаковский М.Е., Николаева М.А., Кан Н.Е., Вавина О.В., Николаева А.В., Тютюнник Н.В., Сергунина О.А. и др. // *Акушерство и гинекология.* 2016. № 3. С. 24–31.
68. Ziganshina M.M., Shilova N.V., Khasbiullina N.R., Navakowski M.E., Nikolaeva M.A., Kan N.E., Vavina O.V., Nikolaeva A.V., Tyutyunnik V.L., Tyutyunnik N.V., Bot I., Sukhikh G.T., Bovin N.V. // *Antibodies to hyaluronic acid in preeclampsia. In Glycobiology and Human Diseases / Ed. G. Wiederschain. N.Y.: CRC Press, 2016. P. 313–322.*
69. Hofmann-Kiefer K.F., Knabl J., Martinoff N., Schiessl B., Conzen P., Rehm M., Becker B.F., Chappell D. // *Reprod. Sci.* 2013. V. 20. № 3. P. 318–325.
70. Uzun H., Konukoglu D., Albayrak M., Benian A., Madazli R., Aydin S., Gelisgen R., Uludag S. // *Hypertens. Pregnancy.* 2010. V. 29. № 2. P. 153–162.
71. Noble P.W. // *Matrix. Biol.* 2002. V. 21. P. 25–29.
72. Vigetti D., Viola M., Karousou E., Deleonibus S., Karamanou K., De Luca G., Passi A. // *FEBS J.* 2014. V. 281. № 22. P. 4980–4992.
73. Evanko S.P., Tammi M.I., Tammi R.H., Wight T.N. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2007. V. 59. № 13. P. 1351–1365.
74. Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N. // *Eur. J. Cell. Biol.* 2006. V. 85. № 8. P. 699–715.
75. Ibrahim S., Ramamurthi A. // *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* 2008. V. 2. № 1. P. 22–32.
76. Gaudet A.D., Popovich P.G. // *Exp. Neurol.* 2014. V. 258. P. 24–34.
77. Petrey A.C., de la Motte C.A. // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. Art. 101. P. 1–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3949149/pdf/fimmu-05-00101.pdf>
78. Bollyky P.L., Falk B.A., Wu R.P., Buckner J.H., Wight T.N., Nepom G.T. // *J. Leukoc. Biol.* 2009. V. 86. № 3. P. 567–572.
79. Zhu R., Huang Y.H., Tao Y., Wang S.C., Sun Ch., Piao H.L., Wang X.Q., Du M.R., Li D.J. // *Placenta.* 2013. V. 34. № 9. P. 784–791.
80. Matou-Nasri S., Gaffney J., Kumar S., Slevin M. // *Int. J. Oncol.* 2009. V. 35. № 4. P. 761–773.
81. Yu M., He P., Liu Y., He Y., Du Y., Wu M., Zhang G., Yang C., Gao F. // *Med. Oncol.* 2015. V. 32. Art. 381. P. 1–8.
82. Takahashi H., Takizawa T., Matsubara S., Ohkuchi A., Kuwata T., Usui R., Matsumoto H., Sato Y., Fujiwara H., Okamoto A., Suzuki M., Takizawa T. // *Placenta.* 2014. V. 35. № 3. P. 163–170.
83. Vigetti D., Karousou E., Viola M., Deleonibus S., De Luca G., Passi A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1840. № 8. P. 2452–2459.
84. Knudson C.B., Knudson W. // *FASEB J.* 1993. V. 7. № 13. P. 1233–1241.
85. Hall C.L., Wang C., Lange L.A., Turley E.A. // *J. Cell Biol.* 1994. V. 126. P. 575–588.
86. Turley E.A., Noble P.W., Bourguignon L.Y. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 4589–4592.
87. Tolg C., Hamilton S.R., Morningstar L., Zhang J., Zhang S., Esguerra K.V., Telmer P. G., Luyt L.G., Harrison R., McCarthy J.B., et al. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 26461–26474.
88. Orian-Rousseau V., Ponta H. // *Adv. Cancer Res.* 2008. V. 101. P. 63–92.
89. Li L., Heldin C.H., Heldin P. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 26512–26519.
90. Skandalis S.S., Kozlova I., Engstrom U., Hellman U., Heldin P. // *IUBMB Life.* 2010. V. 62. P. 833–840.
91. Toole B.P. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. P. 7462–7468.
92. Toole B.P., Slomiany M.G. // *Semin. Cancer Biol.* 2008. V. 18. P. 244–250.
93. Ghatak S., Misra S., Toole B.P. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 8875–8883.
94. Bourguignon L.Y., Zhu H., Shao L., Chen Y.W. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 3. P. 1829–1838.
95. Culty M., Nguyen H.A., Underhill C.B. // *J. Cell. Biol.* 1992. V. 116. № 4. P. 1055–1062.
96. Tesar B.M., Jiang D., Liang J., Palmer S.M., Noble P.W., Goldstein D.R. // *Am. J. Transplant.* 2006. V. 6. P. 2622–2635.
97. Bollyky P.L., Bogdani M., Bollyky J.B., Hull R.L., Wight T.N. // *Curr. Diab. Rep.* 2012. V. 12. № 5. P. 471–480.
98. Ponta H., Sherman L., Herrlich P.A. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 4. № 1. P. 33–45.
99. Goshen R., Ariel I., Shuster S., Hochberg A., Vlodavsky I., de Groot N., Ben-Rafael Z., Stern R. // *Mol. Hum. Reprod.* 1996. V. 2. № 9. P. 685–691.
100. Marziani D., Crescimanno C., Zaccheo D., Coppari R., Underhill C.B., Castellucci M. // *Eur. J. Histochem.* 2001. V. 45. № 2. P. 131–140.
101. Castellucci M., Kosanke G., Verdenelli F., Huppertz B., Kaufmann P. // *Hum. Reprod. Update.* 2000. V. 6. № 5. P. 485–494.
102. Bollyky P.L., Falk B.A., Wu R.P., Buckner J.H., Wight T.N., Nepom G.T. // *J. Leukoc. Biol.* 2009. V. 86. № 3. P. 567–572.
103. Banerji S., Ni J., Wang S.X., Clasper S., Su J., Tammi R., Jones M., Jackson D.G. // *J. Cell. Biol.* 1999. V. 144. № 4. P. 789–801.
104. Gu B., Alexander J.S., Gu Y., Zhang Y., Lewis D.F., Wang Y. // *Lymphat. Res. Biol.* 2006. V. 4. № 1. P. 11–17.
105. Böckle B.C., Sölder E., Kind S., Romani N., Sepp N.T. // *Placenta.* 2008. V. 29. № 2. P. 187–192.
106. Zhang H., Tse J., Hu X., Witte M., Bernas M., Kang J., Tilahun F., Hong Y.K., Qiu M., Chen L. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010. V. 51. № 12. P. 6157–6161.
107. Gao F., Yang C.X., Mo W., Liu Y.W., He Y.Q. // *Clin. Invest. Med.* 2008. V. 31. № 3. E. 106–116.
108. Gust K.M., Hofer M.D., Perner S.R., Kim R., Chinnaiyan A.M., Varambally S., Moller P., Rinnab L., Rubin M.A., Greiner J., et al. // *Neoplasia.* 2009. V. 11. № 9. P. 956–963.
109. Ishigami S., Ueno S., Nishizono Y., Matsumoto M., Kurahara H., Arigami T., Uchikado Y., Setoyama T., Arima H., Yoshiaki K., et al. // *BMC Cancer.* 2011. V. 11. P. 106.
110. Entwistle J., Hall C.L., Turley E.A. // *J. Cell Biochem.* 1996. V. 61. № 4. P. 569–577.
111. McCourt P.A.G., Ek B., Forsberg N., Gustafson S. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 30081–30084.
112. Yasuda T. // *Inflamm. Res.* 2007. V. 56. № 6. P. 246–253.
113. Yasuda T. // *J. Pharmacol. Sci.* 2012. V. 118. № 1. P. 25–232.
114. Shao Y., Lu G.L., Shen Z.J., He H.C. // *World. J. Urol.* 2013. V. 31. № 3. P. 535–540.
115. Milner C.M., Day A.J. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. № 10. P. 1863–1873.
116. Schaefer L. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 51. P. 35237–35245.
117. Kzhyshkowska J., Gratchev A., Goerdts S. // *J. Cell. Mol. Med.* 2006. V. 10. № 3. P. 635–649.
118. Schledzewski K., Falkowski M., Moldenhauer G., Metharom P., Kzhyshkowska J., Ganss R., Demory A., Falkowska-Hansen B., Kurzen H., Ugurel S., et al. // *J. Pathol.* 2006. V. 209. № 1. P. 67–77.



119. Hascall V, Esco J.D. // Hyaluronan. In Essentials of Glycobiology / Ed. A. Varki, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2009. P. 219–228.
120. Ferrero E., Malavasi F. // J. Leukoc. Biol. 1999. V. 65. № 2. P. 151–161.
121. Brachtl G., Piñón Hofbauer J., Greil R., Hartmann T.N. // Ann. Hematol. 2014. V. 93. № 3. P. 361–374.
122. Соловьева И.А., Собко Е.А., Крапошина А.Ю., Демко И.В., Салмина А.Б. // Пульмонология. 2013. № 5. С. 81–84.
123. Majumdar M., Meenakshi J., Goswami S.K., Datta K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 291. P. 829–837.
124. Bost F., Diarra-Mehrpour M., Martin J.P. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 252. № 3. P. 339–346.
125. Suzuki M., Kobayashi H., Tanaka Y., Kanayama N., Terao T. // J. Endocrinol. 2004. V. 183. № 1. P. 29–38.
126. San Martin S., Soto-Suazo M., Zorn T.M. // Braz. J. Med. Biol. Res. 2003. V. 36. № 8. P. 1067–1071.
127. Zhu R., Wang S.C., Sun C., Tao Y., Piao H.L., Wang X.Q., Du M.R., Da-Jin Li. // PLoS One. 2013. V. 8. № 9. P. e74812.
128. Marzioni D., Kosanke G., Verdenelli F., Huppertz B., Kaufmann P. // Hum. Reprod. Update. 2000. V. 6. № 5. P. 485–494.
129. Cohen J., Naoura I., Castela M., von N’Guyen T., Oster M., Fontaine R., Chabbert-Buffet N., Darai E., Aractingi S. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2014. V. 183. P. 70–77.
130. Rogers P.A., Donoghue J.F., Girling J.E. // Placenta. 2008. V. 29. S. 48–54.
131. Volchek M., Girling J.E., Lash G.E., Cann L., Kumar B., Robson S.C., Bulmer J.N., Rogers P.A. // Hum. Reprod. 2010. V. 25. № 10. P. 2455–2464.
132. Sölder E., Böckle B.C., Nguyen V.A., Fürhapter C., Obexer P., Erdel M., Stössel H., Romani N., Sepp N.T. // Microvasc. Res. 2012. V. 84. № 1. P. 65–73.
133. Famá E.A., Souza R.S., Melo C.M., Melo Pompei L., Pinhal M.A. // Clin. Chim. Acta. 2014. V. 437. P. 155–160.
134. Максименко А.В., Турашев А.Д. // Атеросклероз и дислипидемии. 2011. № 2. С. 4–17.

УДК 57.05, 57.07

# Эпигенетика древней ДНК

С. В. Женило, А. С. Соколов, Е. Б. Прохорчук\*

Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

\*E-mail: prokhortchouk@gmail.com

Поступила в редакцию 29.01.2016

Принята к печати 25.04.2016

**РЕФЕРАТ** Изначально работа с древней ДНК была основана на анализе ее нуклеотидной последовательности. Этот подход позволяет изучать эволюционные изменения, происходящие в различных популяциях, определять влияние окружающей среды на генетический отбор. Однако усовершенствование методических подходов к проведению полногеномного анализа открыло новые возможности изучения эпигенетических механизмов, вовлеченных в регуляцию экспрессии генов. Один из наиболее ярких примеров влияния эпигенетических модификаций на эволюцию человека – изменение статуса метилирования регуляторных последовательностей целого ряда генов кластера *HOXD* и гена *MEIS1*. Эпигенетические изменения в этих генах играют ключевую роль в эволюции конечностей современного человека. Последние работы показали возможность определения транскрипционной активности генов в образцах древней ДНК путем комбинирования информации о метилировании ДНК и о наличии гиперчувствительных к ДНКазе I участков в последовательностях, расположенных в стартах транскрипции генов. В дальнейшем при нахождении хорошо сохранившихся тканей появляется перспектива обнаружения эволюционных изменений, связанных с эпигенетическими различиями в высшей нервной деятельности современного и древнего человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** древняя ДНК, метилирование ДНК, эпигенетика.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** CpG – метилированные CpG; PMD – частично метилированные домены (partially methylated domains); DMV – «долины» метилированной ДНК (DNA methylation valley); MBD – метил-ДНК-связывающий домен (methyl DNA binding domain).

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение ДНК, выделенной из археологических и палеонтологических образцов, позволяет получить информацию об эволюционном прошлом. Первое время работа с древней ДНК заключалась в анализе нуклеотидных последовательностей. На этом этапе исследователи сталкивались с множеством трудностей, связанных с качеством древней ДНК, ее контаминацией чужеродной ДНК и пр. Эти сложности удалось преодолеть, в частности, совершенствованием методов полногеномного секвенирования. Однако развитие современных технологий секвенирования позволяет также анализировать информацию, содержащуюся в надгенетическом коде. С одной стороны, физические характеристики, предрасположенность к заболеваниям и даже некоторые психологические особенности индивида обусловлены генетическими факторами. С другой стороны, нельзя забывать про воздействие окружающей среды. Экспрессия генов определяется не только нуклеотидной последовательностью, но и целым рядом адаптационно регулируемых процессов, которые приводят к изменению уровня метилирования ДНК, гистонового кода, спектра

микроРНК. Эти эпигенетические механизмы вовлечены в формирование структур хроматина, необходимых для регуляции экспрессии генов. Благодаря комбинации высокотехнологического секвенирования и различных методических подходов получены карты полногеномного метилирования ДНК в различного типа клетках человека и мыши: соматических, стволовых, половых, раковых и т.д. [1].

Основной характеристикой любой древней ДНК является ее деградация и дезаминирование остатков цитозина. До недавнего времени считалось невозможным получить информацию о транскрипционной активности генов на основе ДНК, выделенной через длительное время после смерти индивида. Тем не менее в 2010 году группой С. Паабо были предприняты первые попытки получения карт метилирования древней ДНК, которые показали потенциальную возможность определения картины метилирования CpG *in vivo* в ДНК неандертальца [2]. Немного позже с помощью бисульфитного аллель-специфичного секвенирования отдельных локусов ДНК бизона из образцов, относящихся к позднему плейстоцену, Б. Лламас и соавт. [3] показали, что в древней ДНК сохраняется метилирование.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДРЕВНЕЙ ДНК

Дезаминирование метилированных остатков цитозина и их превращение в тимин, происходящее после смерти, затрудняет количественный анализ метилированных цитозина. Только в 2014 году был разработан метод, позволяющий проводить полногеномный анализ метилирования древней ДНК [4–6]. При бисульфитном секвенировании неметилированные остатки цитозина химически конвертируются в остатки урацила, которые затем считываются полимеразой, например Taq-полимеразой, как тимины при ПЦР. В клетках позвоночных картирование таких С-Т-мутаций осуществляется с точностью до одного нуклеотида. Аналогичное химическое превращение происходит после смерти в естественных условиях в основном за счет гидролитического дезаминирования цитозина, расположенных в одноцепочечных участках [7]. Применение Taq-полимеразы, например Taq platinum high fidelity (Hifi), нечувствительной к присутствию урацила, приводит к увеличению количества С-Т-замен относительно исходной цепи. Такие замены не могут наблюдаться при использовании такой Pfu-полимеразы, как Phusion. Pfu-полимераза не способна продолжать синтез цепи в присутствии урацила. При этом 5-метилцитозин дезаминируется в тимин, в отличие от немодифицированного цитозина, и может быть успешно амплифицирован Pfu-полимеразой (рис. 1). Таким образом, увеличение количества С-Т-замен при анализе древней ДНК позволяет отличить метилированные цитозины от неметилированных [5]. Дезаминирование – это стохастический процесс, значит, всегда есть метилированные CpG-динуклеотиды (Mpg), не дезаминированные с течением времени, которые будут амплифицироваться как обычные CpG (рис. 1). Поэтому данный метод позволяет определить метилирование не всех цитозина, а только дезаминированных. Для определения метилированных цитозина с однонуклеотидным разрешением необходимо увеличивать уровень покрытия. Так, в работе группы Р. Смита [8] показана возможность определять статус метилирования одиночного CpG-динуклеотида, расположенного в мобильном генетическом элементе LINE-1, в образцах древней ДНК, полученной из скелетов пяти североамериканцев, возраст которых составлял от 200 до 4000 лет до нашей эры. Если не требуется определять Mpg с точностью до одного нуклеотида, то достаточно анализировать количество CpG-ТрG-замен на интересующем участке ДНК. Такой подход применен к анализу генома неандертальского, денисовского, палеоэскимосского человека [4]. Удалось

показать, что в костном мозге и в волосяном фолликуле современных и древних людей метилирование ДНК практически идентично.

## АНАЛИЗ ЭПИГЕНОМА ДРЕВНЕЙ ДНК

При исследовании дифференциально метилированных участков Д. Джохман и соавт. обнаружили, что промоторы и последовательности генов *HOXD9* и *HOXD10*, одних из ключевых регуляторов развития конечностей, метилированы в костном мозге древних образцов (человек неандертальский и денисовский) и неметилированы в ДНК современного человека [4]. На мышинных модельных системах показано, что изменения в экспрессии генов кластера *HOXD*, особенно генов *HOXD9* и *HOXD10*, приводят к морфологическим изменениям [9], которые напоминают различия в строении конечностей неандертальца и современного человека. Этот факт позволяет предположить, что эпигенетические изменения в кластере генов *HOXD* играют ключевую роль в эволюции конечностей современного человека. Более того, внутри гена *MEIS1*, кодирующего белок, который регулирует активность генов кластера *HOXD*, найден дифференциально метилированный участок [4]. Информация о метилировании древней ДНК больших геномных районов в виде количества С-Т-замен может использоваться для поиска протяженных участков с измененным уровнем метилирования в костном мозге и волосяных фолликулах наших предков. Такой анализ позволит обнаружить не только гиперметилированные CpG-островки, но и:

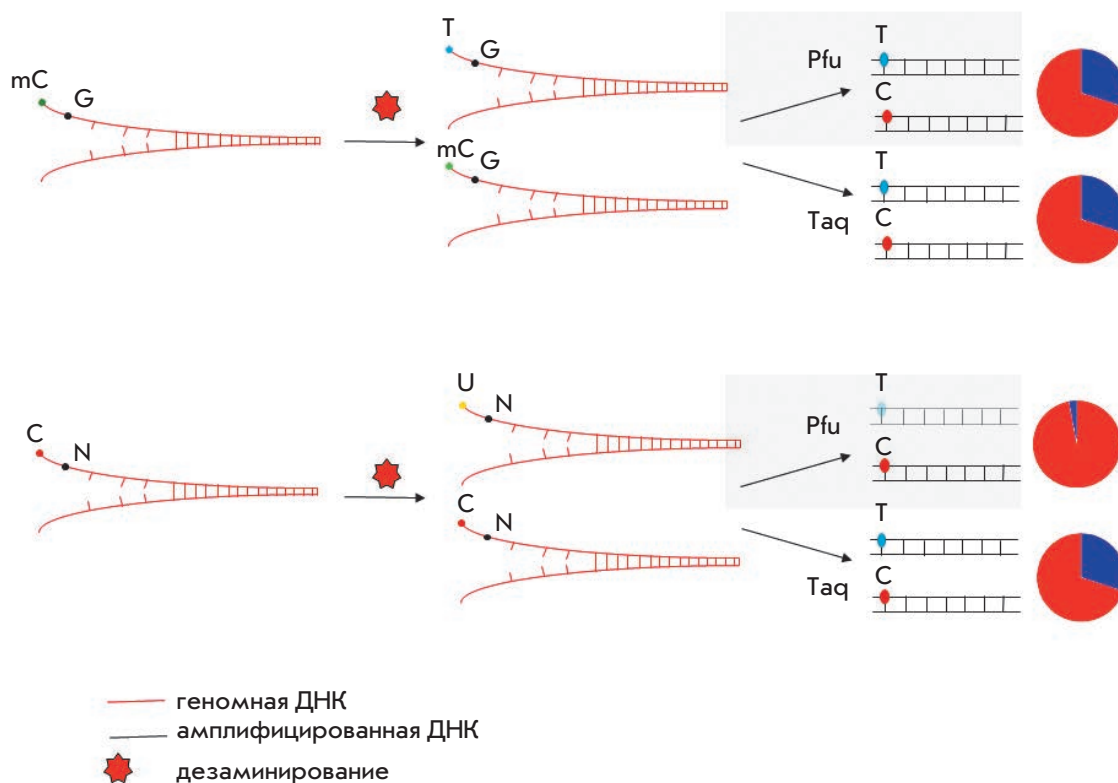
1) длинные (от нескольких сотен тысяч до нескольких миллионов пар нуклеотидов) частично метилированные домены (PMD), которые не содержат гены и колокализуются с ламинсвязанными структурами [10, 11];

2) «долины» метилированной ДНК (DMV) (несколько тысяч пар нуклеотидов), гипометилированные в большинстве тканей, содержащие большое количество генов развития и участков связывания факторов транскрипции [12, 13], но гиперметилированы в клетках рака кишечника [12];

3) неометилированные «каньоны» (десятки тысяч пар нуклеотидов), недавно открытые в гемопоэтических стволовых клетках [14];

4) эпигенетические механизмы воспаления кишечника, которые характеризуются гиперметилированием DMV, низкой плотностью CpG, активными марками хроматина [15].

Все перечисленные исследования основаны на анализе уровня метилирования геномных областей, длина которых варьирует от нескольких тысяч до нескольких миллионов пар нуклеотидов. Эпигенетический анализ древней ДНК, базирующийся-



**Рис. 1.** Схема определения метилирования цитозина в древней ДНК за счет увеличения количества С-Т-замен относительно исходной цепи при дезаминировании. Таq-полимераза не чувствительна к урацилу, а Pfu-полимераза не может продолжать синтез цепи в присутствии урацила. Дезаминирование метилированных цитозинов (mC) не отразится на соотношении С-Т-замен, выявляемых с помощью Таq- и Pfu-полимераз. В случае неметилированных цитозинов дезаминирование создает «непроходимый» для Pfu-полимеразы урацил. Таким образом, все чтения, которые начинаются на Т (в контексте геномного CG), в NGS-библиотеках, приготовленных с использованием Pfu-полимеразы, однозначно говорят о метилированном состоянии соответствующего цитозина в древней ДНК

ся на поиске регионов, обогащенных заменами С-Т, открывает перед нами новые возможности определения адаптационных сигналов и/или маркеров заболеваний. Однако для этого необходимы хорошо сохранившиеся ткани (мозг, кишечник, мышцы, кровь), что характерно для останков, найденных в вечной мерзлоте, например, останков мамонтов, живших в эпоху плейстоцена (см. далее). В 2014 году была опубликована уникальная работа по составлению эпигенетической карты, полученной на ДНК одного волосяного фолликула палеоэскимосского человека, позволившая определить возраст индивида в момент смерти [5]. Это сделано на основе судебного исследования, показавшего возможность вычисления возраста по уровню метилирования определенных CpG-динуклеотидов [16]. Если предположить, что 6000 лет назад внешняя среда воздействовала на метилирование так же, как в наши дни, то, основываясь на со-

временных базах данных, можно определить возраст древнего человека. Группа Л. Орландо показала, что саккакский человек (палеоэскимосская эпоха в Гренландии) был сравнительно немолод, к моменту смерти ему, вероятно, было около 35–40 лет [5].

### ПРОБЛЕМА КОНТАМИНАЦИИ ДРЕВНЕЙ ДНК

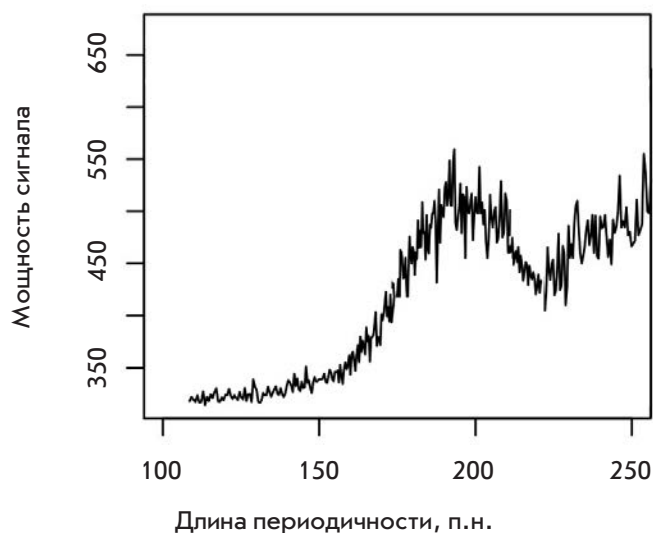
Значительную трудность при работе с древней ДНК представляет контаминация материала бактериальной ДНК. Недавно показали, что эпигенетические особенности позвоночных (метилирование CpG) можно применить для разделения бактериальной и древней геномной ДНК человека [17]. Метилированные CpG-динуклеотиды найдены только в соматических клетках позвоночных. В бактериальном геноме также есть метилированные цитозины и аденины, но не в CpG. В состав белков семейства MBD входит метил-ДНК-связывающий домен (MBD),



который взаимодействует с метилированной ДНК, содержащей одиночные метилированные CpG [18]. Аффинная хроматография на основе домена MBD является рутинным методом построения карт метилирования геномов различных организмов. Этот метод позволяет не только охарактеризовать древние метиломы, но и разделить ДНК древних позвоночных и микроорганизмов. На примере палеоэскимосского саккакского человека, шерстистых мамонтов (Юка и Хрома), полярных медведей и двух видов, принадлежащих к семейству лошадиных, показано, что метилирование сохраняется в различных тканях, при внешних воздействиях и при разном времени появления останков (от 4000 до 45000 лет до нашего времени). Обогащение с помощью аффинной хроматографии с MBD-доменом позволяет проводить анализ микробиоты древних образцов, а также потенциально патогенных геномов [17].

### ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ДРЕВНИХ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ НУКЛЕОСОМНЫХ КАРТ

Метилирование ДНК может служить маркером подавления транскрипции генов, однако этой информации недостаточно для того, чтобы утверждать, экспрессировался ген или нет. Для предсказания транскрипционной активности гена необходима дополнительная информация, например, о модификациях гистонов, структуре хроматина, связывании факторов транскрипции с регуляторными участками. Предприняты первые попытки работы с белками из древних организмов [19]. Секвенирование древней ДНК выявило неожиданный источник эпигенетической информации. Исследователи из группы Л. Орландо обнаружили периодичность в плотности прочтения нуклеотидов [5]. Они предположили, что наблюдаемая периодичность не является ошибкой выравнивания последовательностей или артефактом секвенирования. В основе периодичности плотности прочтения нуклеотидов лежит защита ДНК путем связывания ее с нуклеосомами, при этом расщепление ДНКазой, которая попала в ядро во время клеточной смерти, либо посмертная деградация ДНК происходят в линкерных участках. В этом случае наблюдаемая глубина секвенирования отражает положение нуклеосом на ДНК. Спектральные методы анализа ДНК применяются для поиска скрытых периодичностей. Так, в случае сравнительно коротких последовательностей использование преобразования Фурье позволяет получать статистические критерии, обладающие свойством самоусредняемости [20]. Применение преобразования Фурье к функции, которая связывает плотность покрытия «чтениями» с координатой в геноме, имеет сильный пик на 180–190 нуклеотидов, указывая на то, что пе-



**Рис. 2.** График спектральной плотности (оценка спектральной мощности). Анализ регионов вокруг стартов транскрипции (+/- 1000 п.н.) генов, проведена коррекция относительно фонового распределения чтений при анализе современной ДНК слона. Используются данные секвенирования генома детеныша мамонта, найденного в 2009 году в нижнем течении реки Хрома (Прохорчук Е.Б. и соавт., неопубликованные данные). Возраст находки более 50000 лет

риодичность покрытия при секвенировании совпадает с периодичностью организованного в нуклеосомы хроматина (рис. 2). При анализе распределения плотности расположения 5'-конца чтений выяснилось, что на расстояниях с характерной длиной 100 нуклеотидов проявляется также периодичность в 10 нуклеотидов, которую связывают с одним оборотом спирали ДНК: нуклеотиды, обращенные к нуклеосомам, не будут стартом чтений, поскольку они менее доступны для нуклеаз. В древней ДНК с высокой точностью удалось картировать положение нуклеосом на расстоянии 4 т.п.н. от сайтов связывания СТСФ, расположение которых отрицательно коррелировало с метилированием ДНК. Активно транскрибируемые участки можно находить с помощью анализа гиперчувствительных к ДНКазе I участков, расположенных в стартах транскрипции [21]. Предполагается, что участки с открытой структурой хроматина будут более чувствительны к расщеплению ДНКазой I при апоптозе или после смерти организма. Поэтому при полногеномном секвенировании плотность чтений в районах старта транскрипции активных генов будет снижена по сравнению с молчащими генами. Если одновременно учитывать плотность чтений в области определенного старта транскрипции

и информацию о гиперчувствительных к ДНКазе I участках из базы данных ENCODE, то появляется потенциальная возможность определения транскрипционной активности соответствующих генов.

### ПЕРСПЕКТИВЫ

Комбинирование информации о метилировании ДНК и сайтах гиперчувствительности к ДНКазе I в стартах транскрипции позволит в ближайшее время восстановить количественную картину экспрессии

генов в древних образцах. Если удастся найти хорошо сохранившийся мозг древнего человека, то это будет прорывом в области изучения древней ДНК и эволюции человека. Подобную возможность подтверждает недавняя находка шерстистого мамонта, структуры мозга которого хорошо сохранились [22]. Предполагается, что основные отличия в высшей нервной деятельности древних и современных людей будут найдены на эпигенетическом уровне [23, 24]. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gerstein M.B., Kundaje A., Hariharan M., Landt S.G., Yan K.K., Cheng C., Mu X.J., Khurana E., Rozowsky J., Alexander R., et al. // *Nature*. 2012. V. 489. P. 91–100.
- Briggs A.W., Stenzel U., Meyer M., Krause J., Kircher M., Paabo S. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. P. e87.
- Llamas B., Holland M.L., Chen K., Cropley J.E., Cooper A., Suter C.M. // *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e30226.
- Gokhman D., Lavi E., Prufer K., Fraga M.F., Riancho J.A., Kelso J., Paabo S., Meshorer E., Carmel L. // *Science*. 2014. V. 344. P. 523–527.
- Pedersen J.S., Valen E., Velazquez A.M., Parker B.J., Rasmussen M., Lindgreen S., Lilje B., Tobin D.J., Kelly T.K., Vang S., et al. // *Genome Res*. 2014. V. 24. P. 454–466.
- Smith O., Clapham A.J., Rose P., Liu Y., Wang J., Allaby R.G. // *Sci Rep*. 2014. V. 4. P. 5559.
- Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., von Haeseler A., Paabo S. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 4793–4799.
- Smith R.W., Monroe C., Bolnick D.A. // *PLoS One*. 2015. Published online 25 May.
- Zakany J., Duboule D. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2007. V. 17. P. 359–366.
- Hansen K.D., Timp W., Bravo H.C., Sabunciyan S., Langmead B., McDonald O.G., Wen B., Wu H., Liu Y., Diep D., et al. // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. P. 768–775.
- Berman B.P., Weisenberger D.J., Aman J.F., Hinoue T., Ramjan Z., Liu Y., Noushmehr H., Lange C.P., van Dijk, C.M., Tollenaar R.A., et al. // *Nat. Genet.* 2012. V. 44. P. 40–46.
- Xie W., Schultz M.D., Lister R., Hou Z., Rajagopal N., Ray P., Whitaker J.W., Tian S., Hawkins R.D., Leung D., et al. // *Cell*. 2013. V. 153. P. 1134–1148.
- Nakamura R., Tsukahara T., Qu W., Ichikawa K., Otsuka T., Ogoshi K., Saito T.L., Matsushima K., Sugano S., Hashimoto S., et al. // *Development*. 2014. V. 141. P. 2568–2580.
- Jeong M., Sun D., Luo M., Huang Y., Challen G.A., Rodriguez B., Zhang X., Chavez L., Wang H., Hannah R., et al. // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. P. 17–23.
- Abu-Remaileh M., Bender S., Raddatz G., Ansari I., Cohen D., Gutekunst J., Musch T., Linhart H., Breiling A., Pikarsky E., et al. // *Cancer Res.* 2015. V. 75 (10). P. 2120–2130.
- Kader F., Ghai M. // *Forensic Sci. Int.* 2015. V. 249. P. 255–265.
- Seguin-Orlando A., Gamba C., Sarkissian C.D., Ermini L., Louvel G., Boulygina E., Sokolov A., Nedoluzhko A., Lorenzen E.D., Lopez P., et al. // *Sci. Repts.* 2015. Published online number: 11826.
- Hendrich B., Bird A. // *Mol. Cell Biol.* 1998. V. 18. P. 6538–6547.
- Welker F., Collins M.J., Thomas J.A., Wadsley M., Brace S., Cappellini E., Turvey S.T., Reguero M., Gelfo J.N., Kramarz A., et al. // *Nature*. 2015. V. 522. P. 81–84.
- Лобзин В.В., Чечеткин В.П. // *Успехи физ. наук*. 2000. Т. 43. С. 55–78.
- Crawford G.E., Holt I.E., Whittle J., Webb B.D., Tai D., Davis S., Margulies E.H., Chen Y., Bernat J.A., Ginsburg D., et al. // *Genome Res.* 2006. V. 16. P. 123–131.
- Kharlamova A., Kurtova A., Chernikov V., Protopopov A., Boeskorov G., Plotnikov V., Ushakov V., Maschenko E. // *Quaternary International*. 2016. P. 86–93.
- Zeng J., Konopka G., Hunt B.G., Preuss T.M., Geschwind D., Yi S.V. // *Am. J. Hum. Genet.* 2012. V. 91. P. 455–465.
- Chopra P., Papale L.A., White A.T., Hatch A., Brown R.M., Garthwaite M.A., Roseboom P.H., Golos T.G., Warren S.T., Alisch R.S. // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. P. 131.

УДК 577.1

# Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б

А. П. Бонарцев<sup>1,2\*</sup>, Г. А. Бонарцева<sup>2</sup>, В. Л. Мышкина<sup>2</sup>, В. В. Воинова<sup>1</sup>, Т. К. Махина<sup>2</sup>, И. И. Жаркова<sup>1</sup>, С. Г. Яковлев<sup>2</sup>, А. Л. Зернов<sup>1</sup>, Э. В. Иванова<sup>1</sup>, Е. А. Акулина<sup>2</sup>, Е. С. Кузнецова<sup>1</sup>, В. А. Жуйков<sup>2</sup>, С. Г. Алексеева<sup>3</sup>, В. В. Подгорский<sup>4</sup>, И. В. Бессонов<sup>5</sup>, М. Н. Копицына<sup>5</sup>, А. С. Морозов<sup>5</sup>, Е. Ю. Милановский<sup>6</sup>, З. Н. Тюгай<sup>6</sup>, Г. С. Быкова<sup>6</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1</sup>, К. В. Шайтан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

<sup>3</sup>ОАО «Институт пластмасс», 111024, Москва, Петровский пр-д, 35

<sup>4</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

<sup>5</sup>Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., 5, стр. 1

<sup>6</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: ant\_bonar@mail.ru

Поступила в редакцию 26.10.2015

Принята к печати 21.06.2016

**РЕФЕРАТ** Получение новых полиоксиканоатов (ПОА) – биоразлагаемых полимеров биомедицинского назначения и биоматериалов на их основе – перспективное направление современной биоинженерии. Изучена способность эффективного штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б синтезировать не только гомополимер поли-3-оксибутирата (ПОБ) и его основной сополимер поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат (ПОБВ), но и новый сополимер поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат (ПОБ4МВ). Для биосинтеза сополимеров ПОБ мы использовали карбоновые кислоты в качестве дополнительных источников углерода и предшественников мономеров в цепи синтезируемых сополимеров. Определены основные параметры биосинтеза полимеров: урожай биомассы штамма-продуцента, продукция полимера, молекулярная масса и мономерный состав синтезируемых полимеров, а также морфология клеток *A. chroococcum* 7Б. Физико-химические свойства полученных полимеров определены с использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК), измерения контактного угла смачивания и др. Рост клеток на полученных полимерах *in vitro* оценен с использованием стромальных клеток (СК), выделенных из костного мозга крыс, и теста анализа жизнеспособности клеток ХТТ. Синтез нового сополимера ПОБ4МВ показан путем определения его химического состава методом спектроскопии ЯМР – добавление в культуральную среду 4-метилвалериановой кислоты приводило к включению в полимерную цепь ПОБ мономеров 3-окси-4-метилвалерата (3О4МВ) (0.6 мол. %). Несмотря на малое молярное содержание 3О4МВ в составе сополимера, его физико-химические свойства значительно отличались от свойств гомополимера ПОБ: имел сниженную степень кристалличности и повышенный контактный угол смачивания, т.е. по своим физико-химическим свойствам сополимер ПОБ4МВ с содержанием 3О4МВ всего 0.6 мол. % соответствовал сополимеру ПОБВ с молярным содержанием от 2.5 до 7.8%. Рост СК, определенный по тесту ХТТ, на полученном сополимере ПОБ4МВ *in vitro* не отличался статистически от их роста на полимерах ПОБ и ПОБВ, что позволяет использовать его в биомедицинских разработках и исследованиях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** *Azotobacter chroococcum* 7Б, биосинтез, биосовместимость, кристалличность, поли-3-оксибутират, поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат, стромальные клетки костного мозга.

**ВВЕДЕНИЕ**

В связи с интенсивным развитием таких биомедицинских направлений, как регенеративная медицина, биоинженерия (в том числе тканевая инженерия), биофармацевтика, нанобиотехнология, возрастает потребность в создании новых биоматериалов, особенно биосовместимых и биоразлагаемых полимеров. В качестве материалов для изготовления медицинских изделий и лекарственных форм используют целый ряд природных и синтетических полимеров: полиоксикарбонаты (ПОА), полиангидриды, полиалкилцианоакрилаты, полифосфазены, полифосфоэфиры, полиортоэфиры, некоторые полисахариды (хитозан, гиалуроновая кислота, агароза, декстран, альгинаты, хондроитинсульфат) и белки (коллаген, фибрин, фиброин шелка, спидроин, желатин) [1–5]. Эти полимеры применяются в медицинских имплантатах при восстановительной хирургии [4, 5], тканевой инженерии [3, 6, 7], для создания новых лекарственных форм в биофармацевтике [8, 9], новых материалов для стоматологии и в других приложениях [1, 2].

Несмотря на широкий ассортимент используемых в медицине полимеров, подавляющее большинство из них получают химическим синтезом или выделяют из природного сырья (водорослей, высших растений, грибов, ракообразных, тканей домашних животных). К сожалению, методы химического синтеза и выделения полимеров из природного сырья не могут в полной мере обеспечить набор свойств, необходимый для полимеров биомедицинского назначения. Требуется глубокая и очень дорогая очистка получаемых полимеров, которые должны иметь заданную в узких рамках химическую структуру и свойства, а также быть биобезопасными и т.п. Кроме того, синтетические полимеры и продукты их биodeградации могут быть токсичными, а природные полимеры могут обладать выраженной иммуногенностью или быть загрязнены вирусами или прионными белками [10, 11].

Среди разрабатываемых и используемых биомедицинских полимеров особое внимание привлекают биоразлагаемые поли-3-оксикарбонаты – поли-3-оксибутират (ПОБ) и его сополимеры (согласно отечественной химической номенклатуре высокомолекулярных соединений и ИЮПАК [12]). В отличие от природных полимеров (хитозана, альгината, декстрана, коллагена и др.) и химически синтезируемых полимеров, ПОА получают биотехнологическим путем, что позволяет добиваться высокой степени чистоты, контролировать и задавать в узких пределах основные физико-химические свойства биополимеров в процессе их биосинтеза. ПОА обладают набором уникальных свойств: высокой механической прочностью и термопластичностью, что обеспечивает про-

стоту переработки и позволяет получать широкий спектр изделий, способностью к образованию композитов с синтетическими полимерами, неорганическими материалами и лекарственными веществами, а также к полному биоразложению с образованием нетоксичных продуктов, биосовместимостью (в том числе гемосовместимостью) с тканями и органами человека и животных и экологической безопасностью. В связи с этим ПОА считаются перспективными для применения в медицине [13–16].

ПОА обладают также уникальной наноструктурой. Будучи частично кристаллическими, ПОА могут формировать различные супрамолекулярные структуры, такие, как ламеллы и сферолиты. Подобная частично кристаллическая структура и морфология во многом определяют биологические свойства ПОА, например кинетику биodeградации [17, 18].

Однако ПОА, как и другие полимерные материалы, в частности гомополимер ПОБ, может обладать и некоторыми недостатками: высокой гидрофобностью и кристаллическостью, длительной биodeградацией и низкой пластичностью, что в ряде случаев серьезно ограничивает их применение в качестве биоинженерных материалов в медицине, например для изготовления протезов сосудов [19, 20]. В связи с этим разработка новых биотехнологических методов получения новых сополимеров ПОБ биомедицинского назначения с оптимальным сочетанием физико-химических и биологических свойств и биоматериалов на их основе считается наиболее перспективным направлением в современной биоинженерии [1, 2, 13–16].

Ранее мы показали возможность биосинтеза различных сополимеров ПОБ в высокоэффективном штамме-продуценте ПОА *Azotobacter chroococcum* 7Б с использованием различных методических подходов, провели комплексное исследование физико-химических и биологических свойств полученных полимеров. Этот штамм характеризуется неприхотливостью к условиям культивирования и биотехнологического процесса (необходимо только самое базовое оборудование, не требуются высокоспецифичные культуральные среды, газовое питание, высокоточный контроль специальных параметров и т.п.), высокой продуктивностью (высокий выход биомассы, содержание полимера и сухой биомассы в клетках до 80% и выше), высокой молекулярной массой синтезируемого полимера (более  $1.5 \times 10^6$  Да). Такие характеристики крайне важны для биотехнологической продукции полимеров биомедицинского назначения в связи с необходимостью технически простой и глубокой очистки, помимо обеспечения их эффективной наработки [15, 21]. Однако у таких продуцентов имеются ограничения в синтезе сополимеров ПОБ, содержащих мономеры 3-оксикарбо-



новых кислот с длиной более пяти атомов углерода [22, 23]. Биосинтез нового сополимера ПОБ, поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерата, показан с использованием таких бактериальных продуцентов, как *Ralstonia eutropha*, *Burkholderia* sp., *Chromobacterium* sp., способных к биосинтезу ПОА с короткоцепочечными и длинноцепочечными мономерами карбоновых кислот [24–27]. Однако химическая структура этого сополимера (мономер 3-окси-4-метилвалерат имеет Y-образную R-группу) особенно интересна для изучения его биосинтеза именно такими бактериальными продуцентами, как *Azotobacter* sp., из-за указанных ограничений.

Возможность биосинтеза новых сополимеров ПОБ такими бактериальными продуцентами, как *Azotobacter* sp., представляет большой научный и практический интерес. Нами изучена возможность биосинтеза нового сополимера ПОБ – поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат – высокоэффективным штаммом-продуцентом ПОА *A. chroococcum* 7Б, определены физико-химические свойства этого сополимера и его биосовместимость *in vitro*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

Натриевая соль валериановой кислоты, или валерат натрия (ВК), натриевая соль 4-метилвалериановой кислоты, или метилвалерат натрия (4МВК), натриевая соль гексановой кислоты, или гексанат натрия (ГК); компоненты культуральной среды:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , NaCl,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $CaCO_3$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , цитрат натрия,  $CaCl_2$ ,  $KH_2PO_4$ , сахароза, агар, фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Все реактивы закуплены в компании Sigma Aldrich (Германия) и использованы в том виде, в котором получены.

### Биосинтез полимеров

Для биосинтеза полимеров использован высокоэффективный штамм-продуцент ПОБ *A. chroococcum* 7Б, несимбиотическая азотфиксирующая бактерия, способная к сверхпродукции полимера (до 80% от сухого веса клеток) [28–31]. Штамм был выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва) и поддерживался на среде Эшби, содержащей 0.2 г/л  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.2 г/л  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 г/л NaCl, 0.006 г/л  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 5.0 г/л  $CaCO_3$ , 20 г/л сахарозы и 20 г/л агара. Все эксперименты проведены в лабораторных условиях. Для достижения высокой продуктивности клеток культуру *Azotobacter* выращивали в качалочных колбах в микробиологической качалке Innova 43 (New Brunswick Scientific, США)

при постоянном перемешивании и 30°C на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде, содержащей 0.4 г/л  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01 г/л  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.006 г/л  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.5 г/л цитрата натрия, 0.1 г/л  $CaCl_2$ , 1.05 г/л  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.2 г/л  $KH_2PO_4$  и 17 г/л (50 мМ) сахарозы как основного источника углерода. Объем среды в колбе составлял 100 мл, что при высокой продуктивности штамма *A. chroococcum* 7Б при отборе проб в конце эксперимента позволяет анализировать процессы биосинтеза и иметь достаточное количество проб для статистической обработки (каждый эксперимент проведен в восьмикратной повторности). Для биосинтеза сополимеров ПОБ в культуральную среду добавляли соли карбоновых кислот (пропионовой, валериановой, 4-метилвалериановой, гексановой) в качестве дополнительных источников углерода. В качестве предшественника мономера 3-оксивалерата в составе ПОА в культуральную среду добавляли ВК в концентрации 5 и 20 мМ сразу и через 12 ч культивирования штамма-продуцента. Эти концентрации и временные интервалы выбраны для получения сополимера ПОВВ с различным содержанием 3-оксивалерата в цепи получаемого сополимера [28, 29]. В качестве потенциальных предшественников мономеров 3-окси-4-метилвалерата и 3-оксигексаноата в составе синтезируемого ПОА в культуральную среду добавляли 4МВК и ГК в концентрации 5, 10, 20 и 35 мМ через 12 ч культивирования штамма-продуцента и в концентрации 20 мМ через 0 ч. Такие концентрации этой карбоновой кислоты выбраны по аналогии с другими карбоновыми кислотами, используемыми для биосинтеза новых сополимеров ПОБ и согласно [24–27, 29]. Штамм-продуцент культивировали в течение 72 ч. Оптическую плотность культуральной среды контролировали при помощи нефелометрии. Рост и накопление полимера контролировали также при помощи световой микроскопии с использованием микроскопа Биомед-1 («Биомед», РФ) с цифровой камерой. Параметры биосинтеза сополимеров: урожай биомассы (г/л среды) и общее содержание полимера в клетках (вес. % от сухого веса клеток) (табл. 1) измеряли согласно ранее разработанным методикам. Процесс выделения и очистки полимера из биомассы штамма-продуцента включал экстракцию хлороформом, фильтрование, осаждение изопропиловым спиртом, очистку путем нескольких циклов растворения-осаждения и высушивание [28–31].

### Исследование химического состава полимера методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Спектры  $^1H$  ЯМР 1% (вес./об.) растворов полимеров в дейтерированном хлороформе были сня-

ты на спектрометре MSL-300 300 МГц (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 313 К, релаксационная задержка 2.5 с, ширина спектрального окна 4000 Гц, и на спектрометре Bruker Avance III 500 МГц с трехканальным криодатчиком TCI Prodigy (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 310 К, релаксационная задержка 3.3 с, ширина спектрального окна 10000 Гц. Химические сдвиги (в миллионных долях) выставлены по сигналу остаточных протонов  $\text{CDCl}_3$  (7.24 м.д. по ТМС). Процентное содержание мономеров 3-оксивалерата (ЗОВ) в сополимере ПОВВ рассчитывали по соотношению интегральных интенсивностей сигнала метильной группы гидроксивалерата (0.89 м.д.) и суммарных сигналов метильной группы гидроксивалерата (0.89 м.д.) и метильной группы гидроксibuтирата (1.27 м.д.) [29, 31]. Процентное содержание мономеров 3-окси-4-метилвалерата (ЗО4МВ) в сополимере ПОВ4МВ рассчитывали по соотношению суммы интегральных интенсивностей сигналов 4-метильной группы (g) (0.90 м.д.) и  $-\text{CH}$  (f) (1.91 м.д.) и суммы интегральных интенсивностей сигналов 4-метильной и  $-\text{CH}$ -групп остатка 3-окси-4-метилвалерата и метильной группы остатков 3-оксибутирата (1.27 м.д.) (рис. 2).

#### Определение молекулярной массы полимеров

Молекулярную массу (ММ) полимеров определяли методом гель-фильтрационной хроматографии (ГФХ). Данные, полученные методом ГФХ, были сопоставлены с вискозиметрическими данными [28–31].

#### Получение экспериментальных образцов полимерных пленок

С целью изучения физико-химических свойств и роста клеток *in vitro* на полимерных пленках получены экспериментальные образцы полимерных пленок толщиной 40 мкм и диаметром 30 мм. Для изготовления образцов использовали синтезированные в бактериях полимеры: ПОВ, ПОВВ1 (2.5 мол. % ЗОВ), ПОВВ2 (7.8 мол. % ЗОВ) и ПОВ4МВ, характеристики которых приведены в табл. 2. Полимерные пленки готовили из 2% (вес/об.) растворов соответствующих полимеров в хлороформе путем испарения растворителя на стеклянной подложке. Вес пленок измерен с помощью весов AL-64 (Max = 60 г, d = 0.1 мг, Acculab, США) и составил  $61 \pm 8$  мг. Толщина пленок, измеренная магнитным толщинометром, составила  $38 \pm 6$  мкм. Для работ с культурами клеток пленки стерилизовали автоклавированием, их предварительно инкубировали в дистиллированной воде при 37°C в термостате (ЕС 1/80 СПУ, РФ) в течение 2 ч [30, 31].

#### Дифференциальная сканирующая калориметрия

Теплофизические характеристики полимерных пленок (температуры плавления и кристаллизации, теплоты плавления и кристаллизации) измеряли с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии согласно [32, 33]. Температуру начала и максимума пика плавления или кристаллизации обозначали как  $T_{\text{пл}}^0$ ,  $T_{\text{пл. пик}}$  и  $T_{\text{кр. пик}}$  соответственно. Кристалличность ПОВА ( $X_c$ ) рассчитывали согласно [33]:

$$X_c = \Delta H_m(\text{ПОВА}) / \Delta H_0 m(\text{ПОВ}) \times 100\%$$

где  $\Delta H_0 m(\text{ПОВ})$  – теоретическое значение термодинамической энтальпии плавления, которая у 100% кристаллического ПОВ могла составить 146.6 Дж/г [34], а  $\Delta H_m(\text{ПОВА})$  – экспериментальная энтальпия плавления соответствующего образца ПОВА. Расчеты степени кристалличности образцов и температуры плавления произведены для данных, полученных на втором цикле нагрева полимеров, температура кристаллизации – на основании данных, полученных на первом цикле охлаждения. Данные представлены как средние значения из трех измерений.

#### Измерение контактного угла смачивания

Гидрофильность поверхности полимерных пленок оценивали, измеряя контактный угол смачивания, формирующийся между каплей воды и поверхностью полимерной пленки, с помощью цифрового угломера – системы анализа формы капли Drop Shape Analysis System – DSA100 (KRÜSS, GmbH, Германия) согласно [30, 31].

#### Исследование роста стромальных клеток на полимерных пленках

Стромальные клетки (СК) выделяли из костного мозга бедренных костей 3-дневных крыс линии Вистар по стандартной методике [35]. Животных забивали декапитацией, выделяли бедренные кости, отрезали эпифизы, костный мозг вымывали из диафизов с помощью шприца (2 мм, игла 27G). Полученную суспензию инкубировали в среде DMEM с коллагеназой типа 1 (1075 ед/мл) («ПанЭко», Россия) в течение 1 ч при 37°C, центрифугировали (10 мин, 100 об/мин), осадок высаживали на культуральный пластик. На следующий день меняли ростовую среду и далее культивировали до появления первичной монослойной культуры.

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием теста ХТТ – аналога широко применяемого теста МТТ [30, 31, 36]. Этот тест, основанный на превращении неокрашенной соли тетразолия в окрашенные соединения формазана под действием NADPH-зависимых оксидоредуктаз, позволяет оце-

нить активность митохондриальных дегидрогеназ. Использовали набор для ХТТ (ХТТ Cell Proliferation Kit, Biological Industries, Израиль).

Задачей нашей работы была не проверка цитотоксичности, а выявление пролиферации клеток на матриксах, т.е. биосовместимости полимерных пленок. Клетки поддерживали в среде DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, «ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biological Industries, Израиль), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»), при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Среду меняли каждые 3 дня. Стерильные образцы пленок ПОВ, ПОВВ1 и ПОВ4МВ (стерилизация автоклавированием) ( $n = 6$ ) помещали в лунки 96-луночного планшета, клеточную суспензию наносили сверху из расчета 1500 клеток на образец. Использовали клетки второго пассажа, так как пролиферация клеток первого пассажа была не вполне стабильной, в повторных экспериментах наблюдались значительные различия в росте клеток первого пассажа на полимерных пленках. Мы определяли жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных пленках, на 1, 3, 7 сут, так как важно было оценить данный параметр в динамике. Установлено, что рост клеток стабилен в этом временном промежутке, а данные точки наиболее полно описывают динамику роста СК на пленках. После заданного времени культивирования удаляли среду из лунок, вносили 100 мкл свежей среды в новые чистые лунки и переносили туда наши образцы. Это делалось для того, чтобы учитывать только клетки, прикрепленные к полимерной подложке, и не учитывать клетки, которые могли открепиться от подложки и прикрепиться к полимерному планшету. Затем добавляли 50 мкл свежеприготовленного раствора ХТТ (по методике). По прошествии 4 ч инкубации при 37°C при плавном покачивании вынимали образцы и измеряли оптическую плотность на приборе Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия) при 450 нм против 690 нм [30, 31].

### Статистический анализ

Статистическую обработку параметров биосинтеза полимеров, контактного угла смачивания полимеров и их биосовместимости *in vitro* на культуре клеток проводили с использованием программного пакета SPSS/PC+ Statistics™ 12.1 (SPSS). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). В таблицах и на рисунках данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего ( $M \pm SD$ ) при уровне значимости  $p < 0.05$ , в подписях к рисункам и в примечании к таблицам указано число измерений ( $n$ ). Представлены

средние значения физико-химических свойств полимеров, вычисленные из трех измерений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Биосинтез сополимеров ПЗОВ с использованием дополнительных источников углерода

Результаты изучения биосинтеза сополимеров ПОВ штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 7Б при добавлении различных дополнительных источников углерода (солей пропионой, валериановой и 4-метилвалериановой и гексановой кислот) в культуральную среду приведены в *табл. 1*. Результаты изучения биосинтеза сополимера ПОВВ подтверждают полученные ранее данные: мономеры 3-оксивалерата включаются в цепь сополимера ПОВВ при добавлении валериановой и пропионовой кислот в качестве дополнительных источников углерода, тогда как в присутствии более длинноцепочечной гексановой кислоты синтеза сополимеров не происходило. Причем молярное содержание ЗОВ в синтезируемом сополимере прямо зависит от концентрации ВК, добавляемой в культуральную среду. Молекулярная масса сополимера ПОВВ была ниже, чем у гомополимера ПОВ, что, вероятно, связано с ингибирующим действием валерата на синтез полимера. Если же сахара служит единственным источником углерода, то штамм-продуцент синтезирует высокомолекулярный ПОВ (1710 кДа) [29, 37–39].

С целью улучшения параметров биосинтеза полимеров используют различные дополнительные источники углерода. Показано, что дополнительные источники углерода не только влияют на молекулярную массу синтезируемых полимеров, но и приводят к синтезу сополимеров с новыми и модифицированными физико-химическими и биомедицинскими свойствами [29–31, 40–46].

Используя этот метод, показали возможность биосинтеза нового для штамма-продуцента *A. chroococcum* 7Б сополимера ПОВ4МВ путем добавления в культуральную среду 4МВК в качестве дополнительного источника углерода и предшественника мономера 3О4МВ в цепи сополимера. Вхождение остатков 3О4МВ в состав синтезированного полимера ПОВ4МВ подтверждено также данными спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H. На спектре ЯМР <sup>1</sup>H 4-метильная группа (е) и –СН-группа (ж) мономера 3О4МВ представлены пиками 1.91 и 0.90 м.д. соответственно (*рис. 2*), тогда как у гомополимера ПОВ и сополимера ПОВВ в этой области нет сигналов. Мы предполагаем, что полученный сополимер, как и ПОВВ, является мультиблок-сополимером, и его синтез осуществляется по следующей схеме: 4МВК → 4-метилвалерил-КоА → 3-кето-4-

Таблица 1. Биосинтез сополимеров ПОБ *A. chroococum* 7Б на сахарозосодержащей культуральной среде с добавлением солей карбоновых кислот

Субстрат	Время добавления соли карбоновой кислоты в культуральную среду, ч	Урожай биомассы, г/л среды	Содержание ПОА в биомассе, % от сухого веса клеток	Молекулярная масса ПОА, кДа	Содержание ЗОВ/ЗО4МВ в сополимере, мол. %
Сахароза, 50 мМ	-	5.8 ± 0.6	83.4 ± 3.1	1710	0
С + 20 мМ ПК	12	2.2 ± 0.7*	63.3 ± 3.3*	890	2.9
С + 5 мМ ВК	12	4.4 ± 0.9*	76.2 ± 3.0*	1290	2.5
С + 20 мМ ВК	0	3.1 ± 1.3*	67.4 ± 4.6*	1020	7.8
С + 20 мМ ВК	12	3.5 ± 0.8*	70.5 ± 3.2*	1270	21.3
С + 20 мМ 4МВК	0	2.6 ± 1.2*	71.2 ± 4.8*	620	0.04
С + 5 мМ 4МВК	12	3.7 ± 0.8*	79.3 ± 3.2*	1390	0.14
С + 10 мМ 4МВК	12	3.6 ± 0.9*	78.8 ± 3.4*	1340	0.23
С + 20 мМ 4МВК <sup>#</sup>	12	3.4 ± 0.9*	76.7 ± 3.3*	1300	0.60
С + 35 мМ 4МВК	12	2.7 ± 0.8*	71.4 ± 3.5*	1130	0.32
С + 20 мМ ГК	12	2.7 ± 0.7*	64.3 ± 3.7*	1020	0

\* $p < 0.05$  при сравнении с группой «Сахароза» (С),  $n = 8$ .

<sup>#</sup> – экспериментальные данные для полученного согласно приведенным в данной строке условиям биосинтеза сополимера ПОБ4МВ показаны на рис. 2, 4 и в табл. 2.

метилвалерил-КоА → D-3-окси-4-метилвалерил-КоА → ЗО4МВ в составе ПОБ4МВ, т.е. подобно биосинтезу ПОБВ: ВК → валерил-КоА → 3-кетовалерил-КоА → D-3-гидроксивалерил-КоА → ЗОВ в составе ПОБВ [29, 37–39] (рис. 1).

Максимальное вхождение мономеров ЗО4МВ в состав синтезированного полимера ПОБ4МВ составляло 0.6 мол. % при добавлении в культуральную среду 4МВК в концентрации 20 мМ в качестве дополнительного источника углерода, при других концентрациях карбоновой кислоты-предшественника вхождение мономеров было гораздо ниже. Тем не менее подтвержден сам факт синтеза этого сополимера.

Кодируемая геном *phbC* ПОБ-синтаза является полимеразой короткоцепочечных карбоновых кислот, таких, как 3-гидроксипропанат и 3-гидроксивалерат. Эта полимеразы не способна использовать для синтеза ПОА средне- и длинноцепочечные 3-гидроксикарбоновые кислоты, а именно кислоты, длиннее 3-гидроксивалериановой кислоты (5С 3-гидроксикарбоновая кислота), т.е. 3-гидроксигексановую и 3-гидроксигептановую кислоты этот фермент не может инкорпорировать в состав растущей цепи ПОА [22, 23]. Тем не менее в качестве добавки мы использовали ГК, которая как изомер 4МВК может служить контролем, поскольку известно, что присутствие ГК не приводит к синтезу сополимера ПОБ клетками *A. chroococum*. Однако влияние ГК на сам процесс биосинтеза необходимо было проконтролировать. Полученные нами данные подтверждают ограничения по длине используемых

мономеров для ПОБ-синтазы, что, по-видимому, связано со строгой специфичностью этого фермента по отношению к субстратам, используемым для синтеза полимера. Включение остатков 3-окси-4-метилвалерата лишь подтверждает это ограничение, так как несмотря на то, что 3-окси-4-метилвалерат является остатком 6С 3-гидроксикарбоновой кислоты, его боковая группа имеет вилкообразную форму, что не приводит к увеличению длины боковой цепи. А вот линейная молекула – 3-оксигексановая кислота (6С линейная 3-оксикарбоновая кислота) не может быть включена ферментом в состав растущей цепи полиэфира по тем же причинам.

Интересно, что добавление в культуральную среду ВК и 4МВК вызывает небольшое снижение молекулярной массы синтезируемого полимера, что можно объяснить ингибирующим действием карбоновых кислот на процесс биосинтеза ПОА (табл. 1). Однако если добавить 4МВК в культуральную среду не через 12 ч, а сразу же, то будет наблюдаться не только значительное снижение молекулярной массы полимера, но, прежде всего, практически не будет синтезироваться собственно сам сополимер ПОБ4МВ. Аналогичный эффект наблюдается и при начальном добавлении ВК в культуральную среду, но в этом случае синтезируется сополимер ПОБВ с гораздо меньшим содержанием мономеров ЗОВ. Снижение молекулярной массы происходит и при добавлении в культуральную среду ГК, хотя сополимер при этом не синтезируется. Это также может быть связано с ингибирующим действием карбоновых кислот



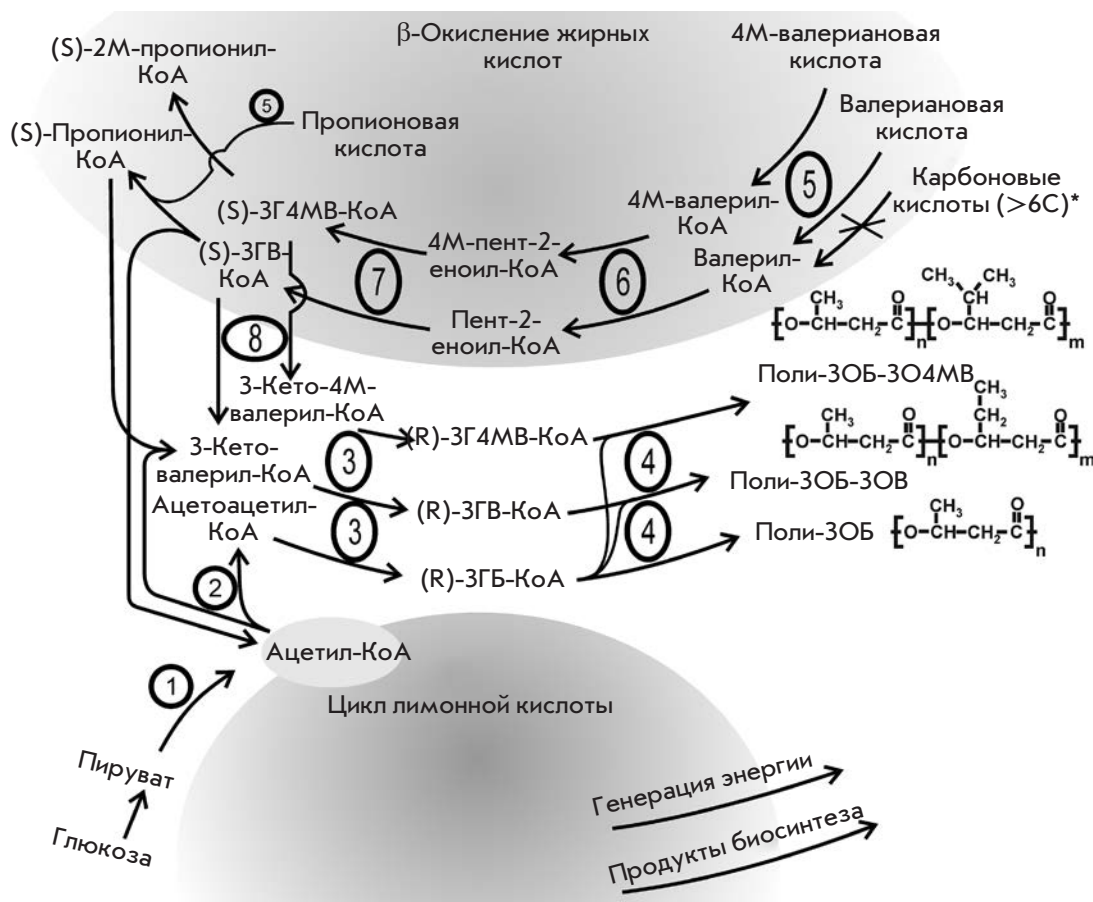


Рис. 1. Схема биосинтеза ПОБ и его сополимеров *A. chroococcum* 7Б. 1 – пируват-дегидрогеназный комплекс; 2 – β-кетотиолаза; 3 – NADPH-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза; 4 – ПОА-полимераза короткоцепочечных карбоновых кислот; 5 – ацил-КоА-синтаза; 6 – ацил-КоА-дегидрогеназа; 7 – еноил-КоА-гидратаза; 8 – NADH-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза. Сокращения на схеме: 4М – 4-метил; 2М – 2-метил; 3ГБ – 3-гидроксибутират-; 3ГВ – 3-гидроксивалерат-; 3Г4МВ – 3-гидрокси-4-метилвалерат; поли-3ОБ-3О4МВ – поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат; поли-3ОБ-3ОВ – поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат; поли-3ОБ – поли-3-оксибутират

на ПОБ-синтазу, которое на ранних стадиях биосинтеза полимера приводит к снижению включения молекул-предшественников в растущую цепь сополимера, хотя теоретически, напротив, должно приводить к синтезу сополимеров с большим содержанием ЗОВ и ЗО4МВ.

Влияние карбоновых кислот на биосинтез сополимеров подтверждают результаты изучения роста культуры *A. chroococcum* 7Б. Полученные результаты свидетельствуют о том, что добавление в среду карбоновых кислот приводит к заметному подавлению роста клеток, снижению содержания полимера и, как следствие, продукции полимера, причем степень такого ингибирующего влияния на рост клеток зависит от химической природы добавки [29]. Так, несмотря на то, что при использовании ГК в качестве

дополнительного источника углерода, сополимер не синтезируется, ГК значительно подавляет рост клеток и продукцию полимера (табл. 1).

Несмотря на некоторое снижение параметров биосинтеза ПОБ4МВ, следует отметить высокую продуктивность (урожай биомассы – 3.4 г/л, содержание сополимера – 76.7%) штамма-продуцента и высокую молекулярную массу сополимера ( $1.3 \times 10^6$ ). Биосинтез ПОБ4МВ был показан ранее с использованием различных продуцентов: *R. eutropha*, *Burkholderia* sp., *Chromobacterium* sp., однако, содержание полимера в клетках штаммов-продуцентов редко превышал 50%, а сам биотехнологический процесс требовал высокоспецифичных технических условий, что может существенно ограничивать использование этих методик для продукции новых

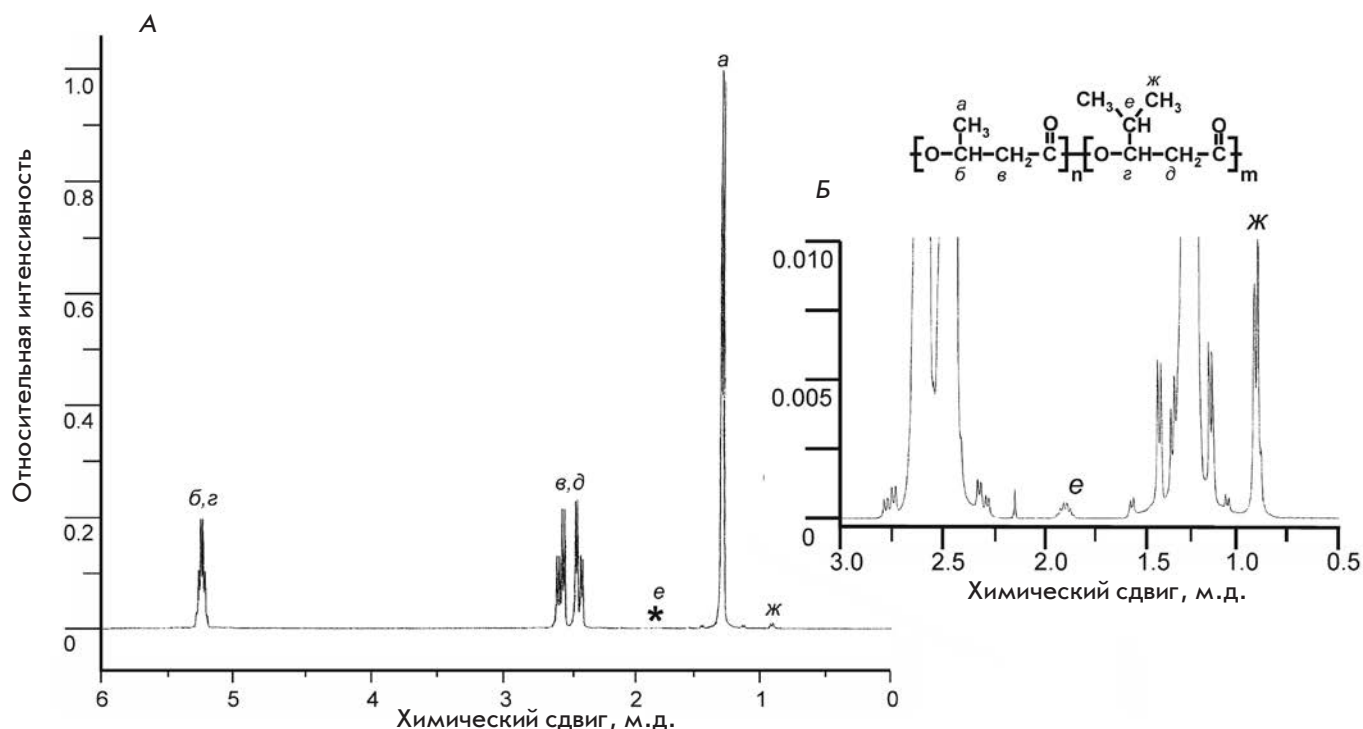


Рис. 2. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  500 МГц сополимера ПОБ4МВ. А – полимерная цепь ПОБ: а –  $\text{CH}_3(s)$ , б –  $\text{CH}(b)$ , в –  $\text{CH}_2(b)$ , полимерная цепь поли-3-окси-4-метилвалерата: г –  $\text{CH}_2(s)$ , д –  $\text{CH}_3(s)$ , е –  $\text{CH}(b)$ , ж –  $\text{CH}_2(b)$ ; \* увеличенный участок графика изображен на врезке (Б)

полимеров биомедицинского назначения. Вероятно, в связи с подобными препятствиями биосовместимость синтезированных по разработанным методикам сополимеров не тестировали [24–27]. Поэтому использование высокопродуктивных и неприхотливых к условиям культивирования штаммов-продуцентов для получения новых сополимеров, таких, как *A. chroococcum* 7Б [15, 29–31], представляется особенно важным.

Добавление в культуральную среду карбоновых кислот также вызывает изменение морфологии бактериальных клеток (рис. 3). *A. chroococcum* характеризуется высокой склонностью к плеоморфизму клеток, чем и может быть объяснен этот эффект. Так, если при добавлении валериановой кислоты в низких концентрациях (5 мМ) морфология клеток почти не изменялась, то добавление ВК в относительно высоких концентрациях (20 мМ) приводило к выраженному изменению клеточной морфологии – коккоидные клетки трансформировались в бациллярные формы (рис. 3Б). Добавление 20 мМ ГК приводило даже к возникновению нитеобразных клеток, хотя коккоидные и бациллярные формы также присутствовали (рис. 3В). Такое влияние карбоновых кислот на морфологию бактериальных клеток сходно

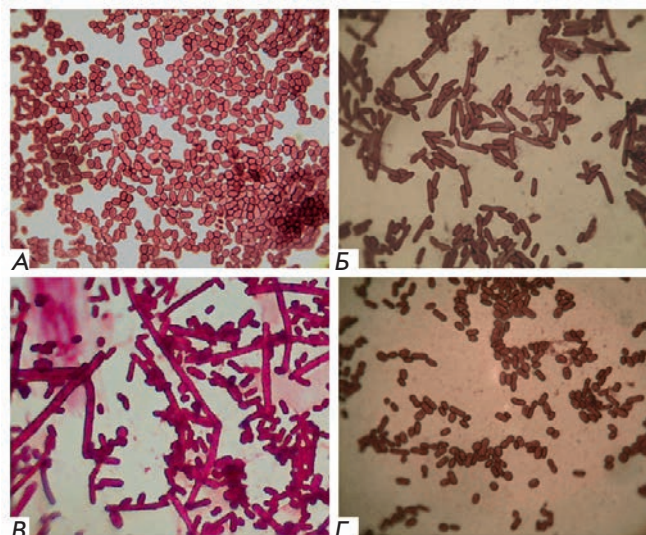


Рис. 3. Влияние добавления карбоновых кислот в культуральную среду на морфологию клеток штамма-продуцента *A. chroococcum* (световая микроскопия,  $\times 900$ ). А – С + 5 мМ ВК (добавка через 12 ч), через 72 ч культивирования; Б – С + 20 мМ ВК (добавка на 0 ч), через 72 ч культивирования; В – С + 20 мМ ГК (добавка через 12 ч), через 72 ч культивирования; Г – С + 20 мМ 4МВК (добавка через 12 ч), через 72 ч культивирования

Таблица 2. Физико-химические свойства сополимеров ПОБ, полученных в клетках *A. chroococcum* 7Б

Полимер	Химический состав			Физико-термические свойства			Гидрофильность
	Содержание ЗОВ/304МВ, мол. %	Молекулярная масса, кДа	$M_w/M_n$	Температура плавления (нач. и пик) ( $T_{пл}^0 / T_{пл}^{пик}$ , °C)	Температура кристаллизации (нач. и пик) ( $T_{кр}^{пик}$ , °C)	Кристалличность ( $X_c$ ), %	Контактный угол смачивания, град
ПОБ	0	1710	1.7	166.8/176.9	62.2	86.6*/74.7**	70.1 ± 2.6
ПОБВ1	2.5	1290	1.9	166.0/174.8	60.3	56.4/52.8	70.7 ± 2.2
ПОБВ2	7.8	1020	1.8	161.2/169.0	66.3	47.5/45.2	76.4 ± 2.3*
ПОБ4МВ	0.6	1300	2.0	169.9/177.3	75.1	58.0/49.6	75.1 ± 1.1*

\*Расчет по первому циклу прогрева.

\*\*Расчет по второму циклу прогрева.

Примечание. Во всех столбцах, кроме последнего, приведены как средние данные, вычисленные по трем измерениям; в последнем столбце «Контактный угол смачивания» – \* $p < 0.05$  при сравнении с группой ПОБ,  $n = 10$ .

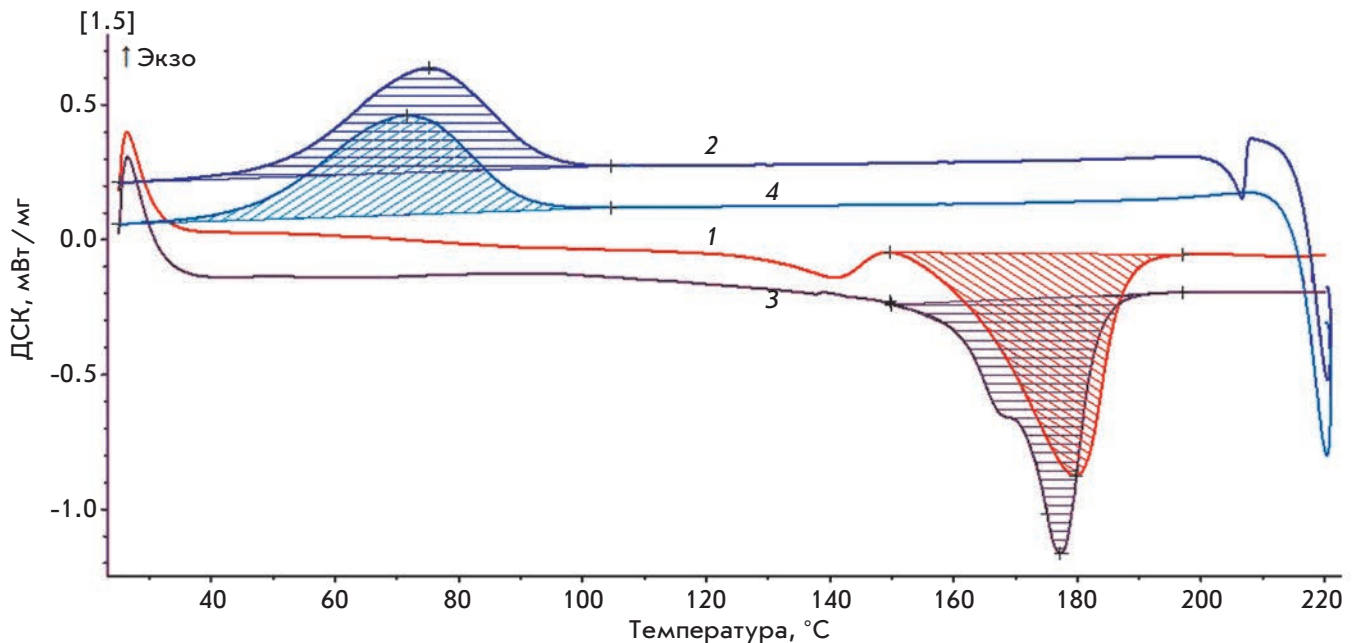


Рис. 4. ДСК-термограммы ПОБ4МВ, полученного путем биосинтеза *A. chroococcum* 7Б: 1 – кривая первого цикла нагрева; 2 – кривая первого цикла охлаждения; 3 – кривая второго цикла нагрева; 4 – кривая второго цикла охлаждения; заштрихованы площади пиков плавления и кристаллизации соответственно

с хорошо известным эффектом различных стрессиндуцирующих веществ (кислот, щелочей, пептона) на форму клеток [47, 48].

### Исследование физико-химических свойств полимеров

Изучение физико-химических свойств полимеров, синтезируемых штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 7Б, выявило значительное отличие физико-термических свойств и гидрофильности сополимеров ПОБ – ПОБВ1 (2.5 мол. % ЗОВ), ПОБВ2 (7.8

мол. % ЗОВ) и ПОБ4МВ от гомополимера ПОБ, несмотря на низкое молярное содержание ЗОВ и ЗО4МВ в сополимерах ПОБВ1 и ПОБ4МВ соответственно (табл. 2).

На рис. 4 представлены термограммы ДСК сополимеров ПОБВ и ПОБ4МВ в сравнении с ПОБ. Термограмма плавления полимеров содержит выраженные пики плавления полукристаллических полимеров и их кристаллизации. Пики плавления сополимеров ПОБВ и ПОБ4МВ в сравнении с гомополимером ПОБ характеризовались:

– незначительным изменением пика плавления, что свидетельствует об отсутствии значительного изменения температуры плавления сополимеров;

– смещением пика кристаллизации ПОБ4МВ в область более высоких температур, что свидетельствует об увеличении температуры кристаллизации этого сополимера;

– уменьшением площади пика плавления, что свидетельствует об уменьшении энтальпии плавления и соответственно кристалличности сополимеров.

Расчет физико-термических параметров, полученных из анализа данных ДСК-термограмм, приведен в табл. 2. Из табл. 2 следует, что сополимеры как ПОБВ, так и ПОБ4МВ обладают значительно меньшей степенью кристалличности, чем ПОБ (на 21.9 и 25.1% соответственно), причем у нового сополимера ПОБ4МВ степень падения кристалличности даже выше, чем у сополимера ПОБВ1, несмотря на то, что молярное содержание ЗО4МВ в ПОБ4МВ составляет всего 0.6 против 2.5% ЗОВ в сополимере ПОБВ, и сравнима со степенью кристалличности сополимера ПОБВ2, у которого молярное содержание ЗОВ составляет 7.8%. Частично такое падение кристалличности сополимеров может быть связано с более низкой их молекулярной массой (на более 300 кДа по сравнению с ПОБ). Сами показатели кристалличности (рассчитанные по первому и второму циклам прогрева полимерных образцов, табл. 2) соответствуют опубликованным данным [49]. Показано, что уменьшение молекулярной массы полимеров может приводить к довольно значительному (до 10% и более при уменьшении ММ в 2 раза) падению степени их кристалличности [49]. Однако основной вклад в падение степени кристалличности вносят мономеры (ЗОВ и ЗО4МВ) в сополимерах с более длинной боковой группой, чем у ЗОВ. Это подтверждает данные о том, что введение мономеров ЗОВ в полимерную цепь ПОБ приводит к получению сополимера с измененными физико-химическими свойствами: с более низкой температурой плавления, с меньшей кристалличностью, более пластичного, менее прочного и обладающего большей скоростью биodeградации [22, 32], причем кристалличность сополимера ПОБВ значительно падает при увеличении молярного содержания мономеров ЗОВ в составе его цепи [32]. Однако в случае ПОБ4МВ мы наблюдаем гораздо более выраженный эффект: по своим физико-химическим свойствам сополимер ПОБ4МВ с молярным содержанием ЗО4МВ всего 0.6% соответствует сополимеру ПОБВ с молярным содержанием от 2.5 до 7.8%. Аналогичную картину мы наблюдаем при анализе гидрофильности полимеров. Если контактный угол смачивания (как показатель гидрофильности поверхности полимеров) гомополимера ПОБ и его сополиме-

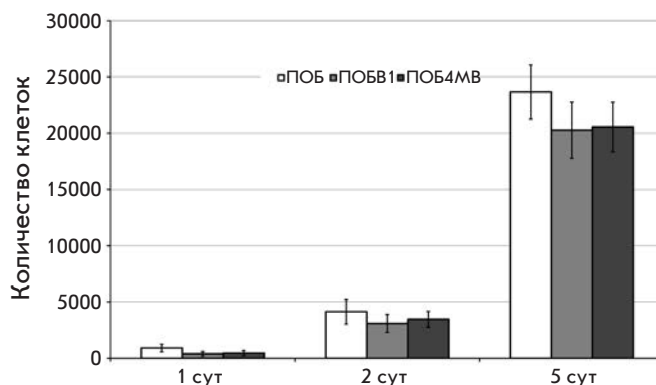


Рис. 5. Динамика изменения количества жизнеспособных стромальных клеток костного мозга крыс, культивируемых на полимерных пленках ПОБ, ПОБВ1 и ПОБ4МВ по данным теста ХТТ. \* $p < 0.05$  при сравнении с группой ПОБ,  $n = 6$

ра ПОБВ1 не различались, то у сополимеров ПОБВ2 и ПОБ4МВ этот показатель был значительно выше, но при этом контактный угол смачивания у ПОБ4МВ был лишь незначительно ниже ПОБВ2. Ранее показали, что контактный угол смачивания сополимера ПОБВ возрастает при увеличении в нем молярного содержания мономеров ЗОВ, а гидрофильность полимерной пленки падает из-за увеличения концентрации гидрофобных групп на ее поверхности [50]. Таким образом, по данным анализа гидрофильности полимеров сополимер ПОБ4МВ с содержанием ЗО4МВ всего 0.6% соответствует сополимеру ПОБВ с молярным содержанием от 2.5 до 7.8%. Это может быть связано с гораздо более выраженным дестабилизирующим влиянием вилокобразной боковой группы остатков ЗО4МВ на кристаллическую структуру полимера по сравнению с эффектом линейной группы ЗОВ в сополимере ПОБВ (рис. 1), что и объясняет столь непропорционально большой вклад столь низкого содержания ЗО4МВ в изменение физико-химических свойств полимера.

#### Исследование роста стромальных клеток на пленках из полимеров

Изучение биосовместимости *in vitro* полимеров, полученных путем биосинтеза в клетках *A. chroococcum* 7Б с использованием культуры выделенных из костного мозга стромальных клеток, выявило значительное увеличение количества жизнеспособных СК на пленках из трех полимеров: ПОБ, ПОБВ1 (2.5 мол. % ЗОВ) и ПОБ4МВ в течение 5 сут. Не наблюдали статистических различий в пролиферации клеток на пленках из различных полимеров. Таким образом, новый сополимер ПОБ4МВ можно



использовать для биомедицинских разработок и исследований наряду с его аналогами – ПОб и ПОБВ, в частности, для изготовления матриц, применяемых в инженерии костной ткани [51, 52].

## ВЫВОДЫ

Нами показано, что добавление 4-метилвалериановой кислоты в культуральную среду штамма-продуцента *A. chroococcum* 7Б приводит к включению в полимерную цепь ПОб мономеров 6С-оксикарбоновой кислоты – 3-окси-4-метилвалерата, и синтезу сополимера поли-3-оксипропионат-со-3-окси-4-метилвалерат. Несмотря на малое молярное содержание 3О4МВ в составе полученного сополимера, по своим физико-химическим свойствам ПОБ4МВ, содержащий всего 0.6% 3О4МВ, соответствовал со-

полимеру ПОБВ с молярным содержанием от 2.5 до 7.8% 3О4МВ. Рост СК, определенный по тесту ХТТ, на сополимере ПОБ4МВ *in vitro* не отличался статистически значимо от их роста на ПОб и ПОБВ, что позволяет использовать его в биомедицинских разработках и исследованиях. ●

*Авторы благодарят В.О. Попова (Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН) за поддержку работы. В работе использовано оборудование центров коллективного пользования МГУ и ФИЦ ФОб РАН.*

*Работа поддержана грантом РФФИ офи-м, проект № 15-29-04856.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Biomedical polymers / Ed. Jenkins M. Birmingham, UK: University of Birmingham, 2007. 203 p.
- Shtilman M.I. Polymeric biomaterials. Part 1. Polymer implants. VSP: Leiden, Netherlands, 2003. 294 p.
- Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzeev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., et al. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 15. P. 3887–3898.
- Satyam A., Kumar P., Fan X., Gorelov A., Rochev Y., Joshi L., Peinado H., Lyden D., Thomas B., Rodriguez B., et al. // *Advanced Materials*. 2014. V. 26. № 19. P. 3024–3034.
- Miroiu F.M., Stefan N., Visan A.I., Nita C., Luculescu C.R., Rasoga O., Socol M., Zgura I., Cristescu R., Craciun D., et al. // *Appl. Surface Sci*. 2015. V. 355. P. 1123–1131.
- Baradaran-Rafii A., Biazar E., Heidari-Keshel S. // *ASAIO J*. 2015. V. 61. № 5. P. 605–612.
- Bondar O.V., Saifullina D.V., Shakhmaeva I.I., Mavlyutova I.I., Abdullin T.I. // *Acta Naturae*. 2012. V. 4. № 1. P. 78–81.
- Ulasov A.V., Khrantsov Y.V., Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. // *Mol. Therapy*. 2011. V. 19. № 1. P. 103–112.
- Kolotova E.S., Egorova S.G., Ramonova A.A., Bogorodski S.E., Popov V.K., Agapov I.I., Kirpichnikov M.P. // *Acta Naturae*. 2012. V. 4. № 1. P. 101–106.
- Agrawal C.M., Athanasiou K.A. // *J. Biomed. Mater. Res*. 1997. V. 38. P. 105–114.
- Stevanovic M., Pavlovic V., Petkovic J., Filipic M., Uskokovic D. // *Express Polymer. Lett*. 2011. V. 5. № 11. P. 996–1008.
- Киреев В.В. Высокомолекулярные соединения. М.: Высшая школа, 1992. 512 с.
- Volova T., Shishatskaya E., Mogilnaya O., Sevastianov V., Efremov S. // *Biochem. Engin. J*. 2003. V. 16. № 2. P. 125–133.
- Sevastianov V.I., Perova N.V., Shishatskaya E.I., Kalacheva G.S., Volova T.G. // *J. Biomat. Sci. Polymer Ed*. 2003. V. 14. № 10. P. 1029–1042.
- Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. // *Биомед. химия*. 2011. V. 57. № 4. P. 374–391.
- Singh M., Kumar P., Ray S., Kalia V.C. // *Ind. J. Microbiol*. 2015. V. 55. № 3. P. 235–249.
- Shtukenberg A.G., Punin Y.O., Gunn E., Kahr B. // *Chem. Rev*. 2012. V. 112. № 3. P. 1805–1838.
- Chardron S., Bruzard S., Lignot B., Elain A., Sire O. // *Polymer Testing*. 2010. V. 29. № 8. P. 966–971.
- Bonartsev A.P., Boskhomdgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., et al. // *Mol. Crystals Liquid Crystals*. 2012. V. 556. № 1. P. 288–300.
- Engelberg I., Kohn J. // *Biomater*. 1991. V. 12. P. 292–304.
- Прудскова Т.Н., Кириллович В.И., Заковряшина Н.А., Ермилина Н.И., Андреева Т.И., Бонарцева Г.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Попов В.О. // Патент РФ на изобретение № 2333962. 17.10.2006.
- Pearce R.P., Marchessault R.H. // *Macromol*. 1994. V. 27. P. 3869–3874.
- Pettinari M.J., Vazquez G.J., Silberschmidt D., Rehm B., Steinbüchel A., Mendez B.S. // *Appl. Environ. Microbiol*. 2001. V. 67. № 11. P. 5331–5334.
- Lau N.S., Tsuge T., Sudesh K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2011. V. 89. № 5. P. 1599–1609.
- Saika A., Watanabe Y., Sudesh K., Tsuge T. // *J. Biosci. Bioeng*. 2014. V. 117. № 6. P. 670–675.
- Ling S.C., Tsuge T., Sudesh K. // *J. Appl. Microbiol*. 2011. V. 111. № 3. P. 559–571.
- Tanadchangsaeng N., Tsuge T., Abe H. // *Biomacromolecules*. 2010. V. 11. № 6. P. 1615–1622.
- Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2008. V. 44. № 5. P. 533–538.
- Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2010. V. 46. № 3. P. 1–8.
- Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiiev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Voinova V.V., et al. // *BMC Biochem*. 2013. V. 14. P. 12.
- Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Boskhomdzhiiev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., Zernov A.L., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. e57200.
- Savenkova L., Gercberga Z., Bibers I., Kalnin M. // *Proc. Biochem*. 2000. V. 36. № 5. P. 445–450.

33. Zheng Z., Bei F.F., Tian H.L., Chen G.Q. // *Biomaterials*. 2005. V. 26. № 17. P. 3537–3548.
34. Barham P.J., Keller A., Otun E.L., Holmes P.A. // *J. Materials Sci.* 1984. V. 19. № 9. P. 2781–2794.
35. Maniatopoulos C., Sodek J., Melcher A.H. // *Cell Tissue Res.* 1998. V. 254. № 2. P. 317–330.
36. Sutherland M.W., Learmonth B.A. // *Free Rad. Res.* 1997. V. 27. № 3. P. 283–289.
37. Senior P.J., Dawes E.A. // *Biochem. J.* 1973. V. 134. P. 225–238.
38. Madison L.L., Huisman G.W. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. № 1. P. 21–53.
39. Ren Q., Siervo N., Kellerhals M., Kessler B., Witholt B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 4. P. 1311–1320.
40. Elsayed N.S., Aboshanab K.M., Aboulwafa M.M., Hassouna N.A. // *African J. Microbiol. Res.* 2013. V. 7. № 43. P. 5025–5035.
41. Pramanik N., Mukherjee K., Nandy A., Mukherjee S., Kundu P.P. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2014. V. 131. № 22. P. 41080.
42. Xin J., Zhang Y., Dong J., Song H., Xia C.G. // *African J. Biotechnol.* 2011. V. 10. № 36. P. 7078–7087.
43. Karthikeyan O.P., Chidambarampadmavathy K., Nadarajan S., Lee P.K., Heimann K. // *Chemosphere.* 2015. V. 141. P. 235–242.
44. Zhu C., Chiu S., Nakas J.P., Nomura C.T. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2013. V. 130. № 1. P. 1–13.
45. Pena C., Castillo T., Garcia A., Millán M., Segura D. // *Microbial Biotechnol.* 2014. V. 7. № 4. P. 278–293.
46. Pena C., Lopez S., Garcia A., Espín G., Romo-Uribe A., Segura D. // *Ann. Microbiol.* 2014. V. 64. № 4. P. 39–47.
47. Eisenstark A., McMahon K.J., Eisenstark R. // *J. Bacteriol.* 1950. V. 59. № 1. P. 75–81.
48. Vela G.R., Rosenthal R.S. // *J. Bacteriol.* 1972. V. 111. № 1. P. 260–266.
49. Dominguez-Diaz M., Meneses-Acosta A., Romo-Uribe A., Pena C., Segura D., Espin G. // *European Polymer J.* 2015. V. 63. P. 101–112.
50. Choi G.G., Kim H.W., Rhee Y.H. // *J. Microbiol.* 2004. V. 42. № 4. P. 346–352.
51. Andreeva N.V., Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Makhina T.K., Myshkina V.L., Kharitonova E.P., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Belyavskii A.V. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. V. 159. № 4. P. 567–571.
52. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Zernov A.L., Kudryashova K.S., Feofanov A.V., Akulina E.A., Ivanova E.V., et al. // *J. Biomaterials Tissue Engin.* 2016. V. 6. № 1. P. 42–52.

УДК 591.315:599.89

# Варианты и вариабельность дробления эмбрионов человека

Ю. К. Доронин<sup>1\*</sup>, И. В. Сенечкин<sup>2</sup>, Л. В. Хилькевич<sup>2</sup>, М. А. Курцер<sup>2</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12<sup>2</sup>Перинатальный медицинский центр, отделение лечения бесплодия и ЭКО, 117209, Москва, Севастопольский просп., 24, корп. 1

\*E-mail: ljh\_rjycn@mail.ru

Поступила в редакцию 08.09.2015

Принята к печати 25.04.2016

**РЕФЕРАТ** С целью выяснения природы вариабельности дробления проанализированы цейтраферные видеозаписи доимплантационного развития эмбрионов человека, аккумулярованные в рамках стандартного протокола культивирования после процедуры внутриклеточной инъекции сперматозоида. Детально изучены топографические особенности и временные параметры дробления, определены продолжительности циклов и прослежена генеалогия бластомеров 2–8-клеточных эмбрионов человека. Обнаружено, что 4-клеточные эмбрионы распределяются в четыре группы в соответствии с ориентацией и последовательностью плоскостей второго дробления. Динамика развития эмбрионов с разными вариантами второго деления дробления существенно отличается как параметрами циклов дробления, так и продолжительностями циклов бластомеров. Анализ последовательностей делений бластомеров человека позволил предположить, что в итоге дробления элиминируются влияния зиготических детерминантов, после чего бластомеры приобретают способность к собственным синтезам и регуляциям, к поляризации и формированию функциональных контактов и, в конечном итоге, к собственным специфическим дифференциациям. Полученные с помощью неинвазивной методологии сведения о раннем развитии эмбрионов человека дополняют и расширяют представления о событиях эмбриогенеза плацентарных млекопитающих и могут найти применение в практике репродуктивных технологий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** анализ цейтраферной видеозаписи, дробление, генеалогия бластомеров, эмбрионы человека.

## ВВЕДЕНИЕ

Последние десятилетия в связи с бурным развитием и коммерциализацией технологий «вспоможения зачатия» (репродуктивных технологий) доимплантационные зародыши человека стали предметом пристального внимания в буквальном смысле этих слов. Этические нормы и юридические ограничения позволяют использовать только неинвазивных методов изучения концептусов, т.е. только микроскопические наблюдения. Итогом тщательных феноменологических исследований стала система оценок морфологии и темпов развития ранних эмбрионов человека *in vitro*, позволяющая с большей или меньшей степенью уверенности предсказывать появление имплантационно-компетентных («качественных») бластоцист [1, 2]. Внедрение в практику репродуктивной медицины инкубаторов, оснащенных устройством непрерывной видеорегистрации, существенно расширило возможности диагностики и прогнозирования качества эмбрионов [3–5]. В настоящее время

в архивах центров репродуктивной биологии человека накоплен огромный фактический материал, тщательный анализ которого может не только усовершенствовать прогностические возможности морфокинетического подхода к выявлению перспективных эмбрионов, но и углубить общие представления о раннем развитии плацентарных млекопитающих.

Первая (меридиональная) борозда дробления поляризованной зиготы плацентарных млекопитающих врезается на анимальном полюсе (в непосредственной близости к полярному тельцу) и распространяется от анимального к вегетативному полюсу [6–10]. Борозды дробления бластомеров 2-клеточных эмбрионов ортогональны первой борозде дробления и распространяются в плоскостях, приблизительно совпадающих с экваториальной и меридиональной плоскостями зиготы. Соответственно возможны четыре варианта дробления бластомеров 2-клеточных эмбрионов: оба бластомера делятся экваториально (Е) или меридионально (М) (варианты ЕЕ или ММ),

либо первое деление меридиональное, а второе – экваториальное (вариант МЕ) и наоборот (вариант ЕМ).

Перечисленные сочетания вторых делений дробления описаны у эмбрионов мышей, причем варианты 4-клеточных зародышей различаются «фенотипами». При МЕ- или ЕМ-делениях бластомеры формируют тетраэдрическую структуру (т.е. проецируются на вершины воображаемого тетраэдра). В результате ЕЕ- или ММ-делений бластомеры распределяются в виде «пластинки» или «розетки» [11, 12]. Согласно каноническим описаниям, 4-клеточный эмбрион человека в отличие от 4-клеточных эмбрионов мышей формируется в результате последовательных меридиональных и экваториальных делений бластомеров 2-клеточных эмбрионов и соответственно приобретает тетраэдрическую форму [6, 10, 13]. Между тем, существование принципиальных отличий, в том числе в способах формирования 4-клеточных эмбрионов, на столь ранних (филогенетически древних) базисных этапах эмбриогенеза лабораторных млекопитающих и человека кажется маловероятным.

Возникновение вариантов 4-клеточных эмбрионов в результате вторых делений дробления представляется важным событием раннего онтогенеза. Различия в сегрегации ооплазмы сопряжены с различиями динамического паттерна последующего развития эмбрионов [14, 15], которое, вопреки этому, в норме завершается формированием однотипной финальной структуры, т.е. бластоцисты. Иными словами, этот феномен следует полагать одной из причин вариабельности последующего развития и соответственно наиболее ранним проявлением регуляторной способности эмбрионов млекопитающих.

В соответствии с представленными выше посылами целью этого исследования стал (1) детальный анализ топографических особенностей второго деления дробления культивируемых эмбрионов человека; и (2) анализ вариаций временных параметров последующих этапов дробления у эмбрионов, различающихся вариантами второго деления дробления. Сопоставление генеалогии бластомеров с последовательностью их делений позволило предположить роль дробления, предопределяющую нормальное развитие событий компактизации и кавитации эмбрионов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом исследования послужили цейтраферные видеорегистрации развития 101 эмбриона человека (микроскоп Primo Vision, помещенный в термостат Thermo; видеозахват через каждые 15 мин), полученные в рамках стандартного протокола культивирования от 20 анонимных пациенток в воз-

расте от 27 до 44 лет (в среднем 34.7 г). Ориентацию первых трех делений дробления относительно анимально-вегетативной оси зиготы и последовательные моменты делений зиготы и каждого бластомера вплоть до 16-клеточной стадии развития определяли, просматривая кадры цейтраферной съемки отдельных эмбрионов. Параллельно прослеживали генеалогию бластомеров. На основании этих регистраций 4-клеточные эмбрионы классифицировали в соответствии с вариантами делений второго цикла дробления и рассчитывали продолжительности зиготического периода (от оплодотворения до деления зиготы) и циклов дробления, т.е. разницы времен наступления третьего и первого делений бластомеров (второй цикл дробления), седьмого и третьего делений (третий цикл дробления) и 15-го и седьмого делений (четвертый цикл дробления). Определяли также продолжительности периодов, не сопровождающихся клеточными делениями (разницы времен наступления второго и первого, четвертого и третьего, восьмого и седьмого делений), и периодов клеточных делений (разницы времен третьего и второго, седьмого и четвертого, 15-го и восьмого делений) второго, третьего и четвертого циклов дробления (см. рис. 2). Эти же измерения позволили вычислить продолжительности циклов отдельных бластомеров как разницы моментов делений соответствующих материнских и дочерних бластомеров. На основании этих данных можно восстанавливать и сопоставлять генеалогию бластомеров до наступления 16-клеточной стадии, используя в качестве маркировки бластомеров длительность их циклов. Результаты измерений анализировали и сравнивали с помощью непараметрических методов вариационной статистики с использованием пакетов программ Stadia (А.П. Кулаичев, МГУ им. М.В. Ломоносова) и Statistica v6 (StatSoft). По истечении стандартного срока культивирования диагностировали стадии развития зародышей в соответствии с принятой классификацией [16, 17].

Уже в период первых делений дробления 33 эмбриона обнаружили разнообразные аномалии развития: чрезмерную фрагментацию, чрезвычайно короткие или длительные клеточные циклы (десятки минут или двое и более суток, вплоть до полного отсутствия цитотомии на протяжении всего периода наблюдений), слияния бластомеров вскоре после деления, гигантские внутриклеточные вакуоли и внеклеточные полости у 4–8-клеточных эмбрионов. Эти зародыши были исключены из рассмотрения, но в отдельных случаях поддающиеся определению параметры их первых циклов сопоставляли с соответствующими параметрами у эмбрионов, развивавшихся без органических нарушений.



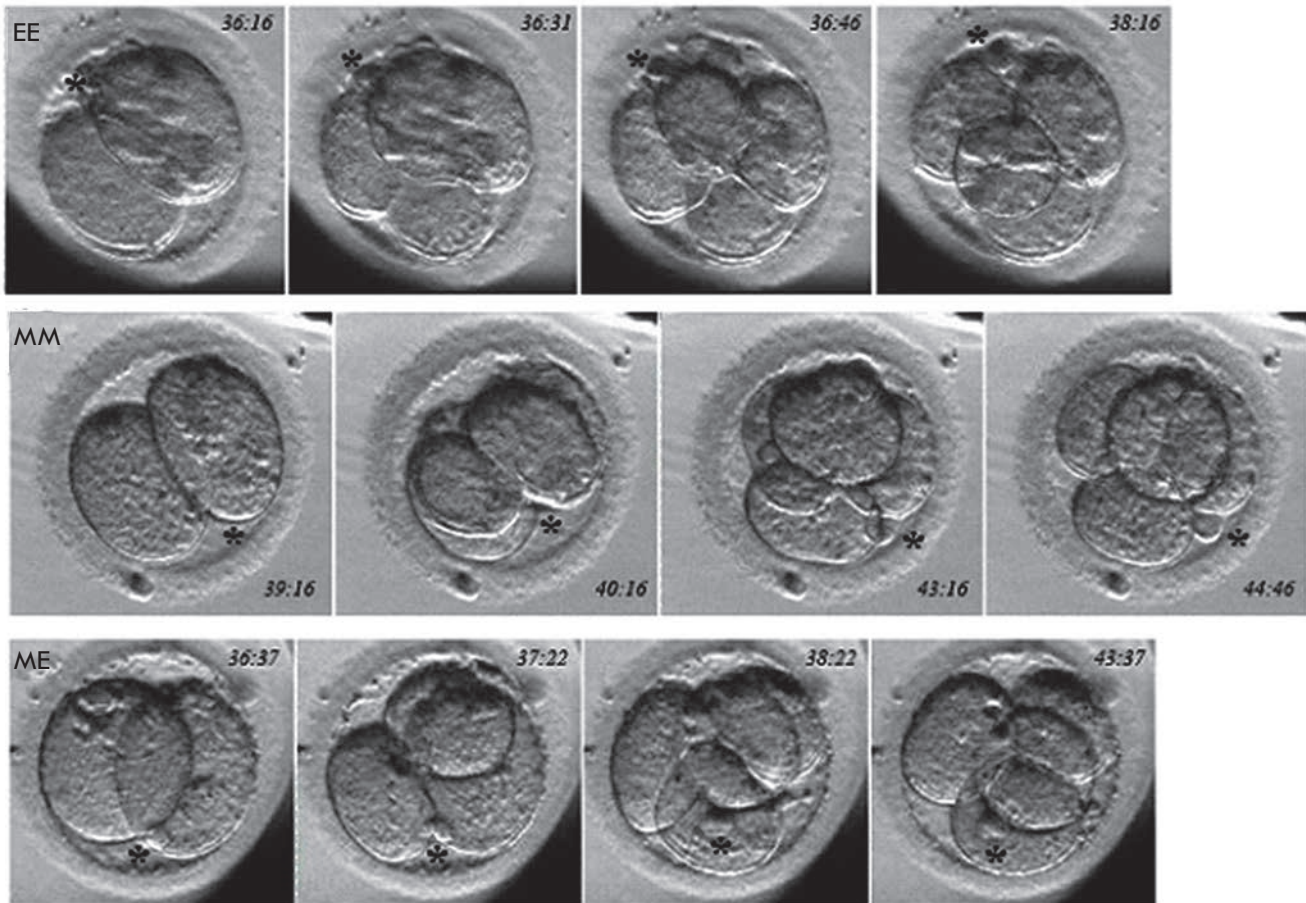


Рис. 1. Становление универсальной тетраэдрической формы 4-клеточных эмбрионов в результате последовательных экваториальных (ЕЕ), меридиональных (ММ) и меридионального и экваториального (МЕ) делений во втором цикле дробления. Вариант экваториального и меридионального деления (не представлен) отличается от варианта МЕ только последовательностью делений. Время после внутриклеточной инъекции сперматозоида (ч:мин) указано в поле изображений. Звездочкой обозначено второе полярное тельце

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Взаимоотношения делящихся бластомеров

Варианты ЕЕ-, ММ-, МЕ- и ЕМ-делений бластомеров обнаружены у 10,3, 19,1, 27,9 и 42,6% 2-клеточных эмбрионов, развивавшихся без структурных аномалий (N = 68). В случае МЕ- или ЕМ-делений в силу ортогональности плоскостей деления бластомеров 2-клеточного зародыша две пары сестринских клеток оказываются ориентированными почти взаимно перпендикулярно, а 4-клеточный эмбрион приобретает близкую к тетраэдру конфигурацию. Со временем геометрическая правильность такого тетраэдра совершенствуется за счет медленных перемещений сестринских пар бластомеров (рис. 1). В результате ЕЕ- или ММ-делений образуются своего рода «пла-

стинка» или «розетка» бластомеров. И в этих случаях сестринские пары бластомеров смещаются, ориентируясь взаимно перпендикулярно. В результате, «пластинка» или «розетка» также принимают форму тетраэдра (рис. 1). Таким образом, форма 4-клеточных эмбрионов человека становится однотипной вне зависимости от ориентации предшествующих борозд дробления. Смещения клеточных пар, вероятнее всего, связаны с оптимизацией формы 4-клеточных зародышей в результате уравнивания механических напряжений, возникающих в ограниченном объеме зародыша после делений бластомеров. Ассоциация сестринских бластомеров, вероятно, связана с длительно сохраняющимися цитоплазматическими мостиками [8, 11, 18]. Длительный контакт между сестринскими бластомерами способствует появлению

клеточных кластеров – компактному размещению потомков blastomerov 2-, 4- и 8-клеточных зародышей, образование которых мы наблюдали при восстановлении генеалогии blastomerov.

Частоты встречаемости вариантов EE, MM, ME и EM у эмбрионов со структурными дефектами (30.3, 15.2, 24.2 и 30.3% соответственно; N = 33) не отличаются от частот у эмбрионов, развивавшихся без структурных аномалий ( $\chi^2 = 6.471$ ,  $P = 0.091$ ), но не соответствуют распределению, характерному для последних ( $\chi^2 = 15.130$ ,  $P = 0.002$ ). Это связано с тем, что доли MM-, ME- и EM-вариантов второго дробления в сравниваемых группах эмбрионов одинаковы (значения  $\chi^2$  для соответствующих альтернативных сравнений равны 0.17, 0.09, 0.65;  $P = 0.682$ , 0.763 и 0.419 соответственно). Частота EE-вариантов деления у аномальных эмбрионов имеет явную тенденцию к превышению (почти втрое) частоты у нормальных эмбрионов ( $\chi^2 = 4.30$ ,  $P = 0.038$ ; с поправкой Йейтса  $P = 0.072$ ). Вероятно, следует полагать, что EE-эмбрионы склонны к органическим нарушениям развития в большей мере, чем эмбрионы с иными вариантами вторых делений дробления. Такая же тенденция отмечена у EE-эмбрионов мышей [19].

### Циклы и траектории дробления

Варианты делений blastomerov во втором цикле дробления небезразличны для последующего развития. Для EE-эмбрионов характерна сглаженная «волнообразная» временная траектория развития. У MM-, ME- и EM-эмбрионов ярче выражена «ступенеобразная» траектория (рис. 2). Усредненные временные траектории (см. рис. 2) различаются между собой (парный критерий Вилкоксона; значимость различий ( $P$ ) между EE- и MM-, EE- и EM-, MM- и ME-, MM- и EM-вариантами равны 0.001; значимость различий между EE- и EM-вариантами – 0.002; между ME и EM – 0.023).

Различия продолжительности циклов дробления становятся явными в третьем цикле дробления и усугубляются в 4-м. Наиболее продолжительны циклы у EE-, наименее – у MM-эмбрионов. EM- и ME-эмбрионы занимают промежуточное положение. Удлинение полных циклов дробления связано, главным образом, с удлинением периодов клеточных делений. Соответственно частота делений максимальна у MM- и минимальна у EE-эмбрионов (табл. 1). MM-эмбрионы достигают стадии 16 клеток через  $80.5 \pm 4.85$  ч (среднее  $\pm$  стандартное отклонение); EM-эмбрионы – через  $87.7 \pm 9.47$  ч, а ME- и EE-эмбрионы – через  $94.8 \pm 11.29$  и  $98.1 \pm 5.05$  ч (различия средних величин статистически значимы за исключением различий для EE- и ME-групп ( $P = 0.197$ ); критерий Ван-дер-Вардена).

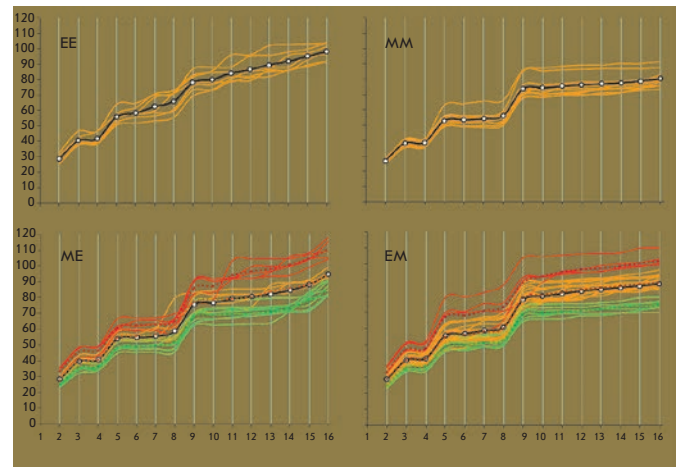


Рис. 2. Траектории дробления отдельных эмбрионов, сгруппированные в соответствии с порядком и ориентацией плоскостей делений во втором цикле дробления (EE, MM, ME и EM). Зеленые, красные и желтые линии в ME и EM группах – траектории эмбрионов с высоким (1), низким (2) и промежуточным (3) темпами дробления. Пунктирные линии – усредненные траектории дробления эмбрионов каждой из различающихся темпом развития групп. Сплошные линии с маркерами – усредненные траектории развития для каждого из вариантов 4-клеточных эмбрионов. Горизонтальная ось – число blastomerov в эмбрионе. Вертикальная ось – время после внутриклеточной инъекции сперматозоида, ч

Вариабельность траекторий развития у ME- и EM-эмбрионов заметно выше, чем у EE- и MM-эмбрионов (см. рис. 2; сравните соответствующие значения стандартных отклонений, представленные в табл. 1). ME- и EM-эмбрионы можно распределить на три группы в соответствии со сходством траекторий. Усредненные траектории развития как ME-, так и EM-эмбрионов из разных групп значимо различаются между собой ( $P = 0.0007$  для всех вариантов сравнений, парный критерий Вилкоксона). Эмбрионы второй группы отличаются большей продолжительностью циклов. Циклы дробления у эмбрионов третьих групп могут быть сравнимыми или превышать по продолжительности соответствующие циклы эмбрионов из первых групп, а в отдельных случаях – циклы эмбрионов из вторых групп (см. детали в табл. 2).

ME-эмбрионы первой, второй и третьей групп достигают 16-клеточной стадии развития через  $85.1 \pm 4.28$  (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение),  $110.5 \pm 6.10$  и  $94.6 \pm 2.57$  ч; EM-эмбрионы – через

Таблица 1. Временные параметры циклов дробления (среднее значение и стандартное отклонение, ч) эмбрионов с различными вариантами последовательных делений бластомеров 2-клеточных зародышей

		ЕЕ	ММ	МЕ	ЕМ
Численность и проспективные стадии развития зародышей*		В5(2), В4(1), В3(1), В1(3)	В5(7), В4(3), В3(2), В1(1)	В5(3), В4(5), В3(2), В2(2), В1(5), М(2)	В5(8), В4(6), В3(5), В2(4), В1(5), М(1)
Зиготический период		28.6 ± 2.70 <sup>1</sup>	26.7 ± 1.44 <sup>1</sup>	28.2 ± 3.96	28.5 ± 3.61
Полная продолжительность циклов	цикл 2	13.1 ± 2.52	12.1 ± 1.05	12.4 ± 1.22	12.8 ± 1.85
	цикл 3	24.4 ± 5.72 <sup>2,3,4</sup>	17.4 ± 3.33 <sup>2</sup>	18.1 ± 5.58 <sup>3</sup>	19.4 ± 4.96 <sup>4</sup>
	цикл 4	32.1 ± 8.67 <sup>5,6</sup>	24.3 ± 3.06 <sup>5,7,8</sup>	36.0 ± 8.12 <sup>7,9</sup>	26.9 ± 4.57 <sup>6,8,9</sup>
Период без делений	цикл 2	11.9 ± 1.33	11.6 ± 1.12	11.5 ± 1.16	11.9 ± 1.48
	цикл 3	14.3 ± 2.81	14.1 ± 2.78	13.2 ± 1.88	14.3 ± 3.72
	цикл 4	12.1 ± 3.36 <sup>10,11</sup>	17.5 ± 4.05 <sup>10</sup>	16.8 ± 7.04	17.3 ± 4.67 <sup>11</sup>
Период делений бластомеров	цикл 2	1.1 ± 1.60	0.5 ± 0.31 <sup>12,13</sup>	0.9 ± 0.55 <sup>12</sup>	1.0 ± 0.89 <sup>13</sup>
	цикл 3	10.0 ± 4.57 <sup>14,15,16</sup>	3.3 ± 2.08 <sup>14,17</sup>	4.9 ± 5.07 <sup>15</sup>	5.1 ± 2.99 <sup>16,17</sup>
	цикл 4	20.0 ± 6.87 <sup>18,19</sup>	6.8 ± 2.47 <sup>18,20</sup>	19.2 ± 5.93 <sup>20,21</sup>	9.6 ± 5.29 <sup>19,21</sup>
Среднее время между последовательными делениями клеток**	цикл 2	0.6 ± 0.80	0.2 ± 0.15	0.4 ± 0.28	0.5 ± 0.45
	цикл 3	2.5 ± 1.14	0.8 ± 0.52	1.2 ± 1.27	1.3 ± 0.75
	цикл 4	2.5 ± 0.86	0.9 ± 0.31	2.4 ± 0.74	1.2 ± 0.66

Примечание. Одинаковыми надстрочными цифрами указаны статистически значимые различия средних значений (критерий Ван-дер-Вардена,  $P < 0.05$ ).

\*В – стадия бластоцисты; М – стадия морулы; цифрами указаны градации эмбрионов на стадии бластоцисты; в скобках указана численность эмбрионов, достигших указанной стадии.

\*\*Средние значения различаются между собой так же, как средние значения продолжительностей периодов делений бластомеров.

74.9 ± 3.10, 102.1 ± 5.20 и 88.8 ± 3.05 ч соответственно. Различия этих показателей статистически значимы (критерий Ван-дер-Вардена,  $P = 0.001$ , 0.024 и 0.001). В то же время усредненные траектории развития МЕ- и ЕМ-эмбрионов первой, второй и третьей групп не различаются (парный критерий Вилкоксона;  $P = 0.256$ , 0.158 и 0.112 соответственно).

К завершению срока регистрации МЕ- и ЕМ-эмбрионы из разных групп достигли разных стадий развития (табл. 2). Первые группы объединяют эмбрионы, сформировавшие развитые бластоцисты (градации 4 и 5). Вторые группы включают медленно развивавшиеся эмбрионы, которые достигли стадии морулы или начинающей кавитировать бластоцисты. Третьи группы разнородны, поскольку к концу наблюдений составляющие их эмбрионы имеют весь спектр бластоцист, хотя большую часть составляют бластоцисты градаций 2 и 3 (табл. 2). Сопоставление альтернативных распределений (численности эмбрионов, достигших градаций 5 и 4, с численностью более ранних эмбрионов в конце срока регистраций) показывает явное доминирование как МЕ-, так и ЕМ-эмбрионов в группе 1 и соответственно доминирова-

ние отстающих в развитии зародышей в группе 2 (двусторонний точный критерий Фишера,  $P = 0.021$  и 0.001). Такое же сопоставление групп 1 и 3 показало значимое различие альтернативных распределений у ЕМ-эмбрионов ( $P = 0.019$ ), но сходство у МЕ-эмбрионов ( $P = 0.277$ ).

Срок развития ММ-эмбрионов до 16-клеточной стадии занимает промежуточное положение между показателями для МЕ- и ЕМ-эмбрионов из первых групп, значимо короче первого показателя (критерий Ван-дер-Вардена,  $P = 0.017$ ), но длиннее второго ( $P = 0.001$ ). Усредненная траектория дробления ММ-эмбрионов отличается от траектории у МЕ- и ЕМ-эмбрионов из первых групп (парный критерий Вилкоксона,  $P = 0.001$  и 0.000 соответственно). Альтернативное распределение (продвинутые против отстающих в развитии) в группе ММ не отличается от аналогичных распределений в первых группах МЕ- и ЕМ-эмбрионов (точный критерий Фишера,  $P = 0.590$  и 0.148), но отличается от распределений во вторых группах ( $P = 0.015$  для обоих сравнений).

Усредненные параметры дробления (и соответственно траектории развития в период дробления)

Таблица 2. Временные параметры циклов дробления (среднее значение, стандартное отклонение, ч) МЕ- и ЕМ-эмбрионов с различными темпами развития (группы 1, 2 и 3)

	МЕ			ЕМ			
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3	
Численность и перспективные стадии развития зародышей	В5(2), В4(4), В3(1), В1(1)	В2(2), В1(2), М(1)	В5(1), В4(1), В3(1), В1(2), М(1)	В5(5), В4(2)	В1(4), М(1)	В5(3), В4(4), В3(5), В2(4), В1(1)	
Зиготический период	25.5 ± 2.01 <sup>1,2</sup>	33.3 ± 3.29 <sup>1,3</sup>	27.7 ± 2.01 <sup>2,3</sup>	25.1 ± 2.19 <sup>1,2</sup>	32.9 ± 3.60 <sup>1,3</sup>	28.7 ± 2.53 <sup>2,3</sup>	
Полная продолжительность цикла	цикл 2	11.3 ± 0.62 <sup>4,5</sup>	13.3 ± 0.94 <sup>4</sup>	13.1 ± 0.87 <sup>5</sup>	11.7 ± 1.25 <sup>4</sup>	15.0 ± 0.63 <sup>4,5</sup>	12.7 ± 1.81 <sup>5</sup>
	цикл 3	15.3 ± 3.28 <sup>8</sup>	18.4 ± 1.21	21.7 ± 8.22 <sup>8</sup>	16.3 ± 1.94 <sup>8</sup>	25.7 ± 6.08 <sup>8,9</sup>	18.8 ± 3.94 <sup>9</sup>
	цикл 4	33.0 ± 3.68 <sup>11</sup>	45.5 ± 6.49 <sup>11,12</sup>	32.1 ± 7.91 <sup>12</sup>	21.9 ± 3.11 <sup>13,14</sup>	28.5 ± 4.50 <sup>13</sup>	28.5 ± 3.62 <sup>14</sup>
Период без делений	цикл 2	10.5 ± 0.97 <sup>6,7</sup>	12.4 ± 0.51 <sup>6</sup>	12.2 ± 0.64 <sup>7</sup>	10.8 ± 0.41 <sup>6</sup>	14.2 ± 0.56 <sup>6,7</sup>	11.6 ± 1.21 <sup>7</sup>
	цикл 3	11.9 ± 0.87 <sup>9,10</sup>	14.6 ± 2.51 <sup>9</sup>	13.9 ± 1.08 <sup>10</sup>	12.3 ± 1.49 <sup>10</sup>	19.6 ± 4.99 <sup>10,11</sup>	13.6 ± 2.47 <sup>11</sup>
	цикл 4	15.6 ± 4.29	21.3 ± 9.22	14.8 ± 7.57	15.6 ± 1.74	15.1 ± 6.65	18.6 ± 4.65
Период делений бластомеров	цикл 2	0.8 ± 0.60	0.9 ± 0.57	0.93 ± 0.56	0.9 ± 1.01	0.76 ± 0.25	1.08 ± 0.98
	цикл 3	3.4 ± 2.89	3.9 ± 2.18	7.75 ± 7.92	4.0 ± 1.41 <sup>12</sup>	6.08 ± 2.16 <sup>12</sup>	5.21 ± 3.59
	цикл 4	17.5 ± 2.81	24.2 ± 9.63	17.3 ± 2.66	6.2 ± 2.98 <sup>15</sup>	13.4 ± 6.00 <sup>15</sup>	9.95 ± 5.19

Обозначения те же, что и в табл. 1.

Таблица 3. Продолжительности и сопоставления циклов бластомеров у эмбрионов с различными вариантами второго деления дробления

Бластомеры	Средние значения ± стандартное отклонение			
	ЕЕ (N = 7)	ММ (N = 13)	МЕ (N = 19)	ЕМ (N = 29)
1	11.9 ± 1.29 <sup>a</sup>	11.6 ± 1.13 <sup>a</sup>	11.7 ± 1.09 <sup>a</sup>	11.9 ± 1.46 <sup>a</sup>
2	13.1 ± 2.51 <sup>a</sup>	12.0 ± 1.09 <sup>a</sup>	12.5 ± 1.21 <sup>a</sup>	12.9 ± 1.83 <sup>a</sup>
1:1	17.6 ± 6.20 <sup>b</sup>	14.9 ± 2.76 <sup>b,c</sup>	14.6 ± 2.16 <sup>b,c</sup>	15.5 ± 4.01 <sup>b,c,d</sup>
1:2	21.1 ± 6.15 <sup>1,6,b</sup>	16.6 ± 3.20 <sup>6,b</sup>	15.5 ± 2.58 <sup>1,9,b,d</sup>	18.2 ± 5.34 <sup>9,b,e</sup>
2:1	17.7 ± 2.86 <sup>2,7,c</sup>	15.0 ± 3.46 <sup>7,d</sup>	14.2 ± 2.44 <sup>2,10,d,e</sup>	16.3 ± 3.60 <sup>10,c,e,f</sup>
2:2	24.4 ± 9.30 <sup>3,4,8,c</sup>	16.2 ± 3.47 <sup>5,8,c,d</sup>	17.9 ± 5.66 <sup>3,c,e</sup>	18.6 ± 4.33 <sup>4,5,d,f</sup>
1:1:1	23.6 ± 5.00 <sup>d,e,f</sup>	21.8 ± 3.64 <sup>15,e,f</sup>	25.3 ± 6.93 <sup>f,g</sup>	24.4 ± 5.15 <sup>15,g,h,k,l</sup>
1:1:2	29.7 ± 10.71 <sup>d</sup>	23.8 ± 3.99 <sup>12,16,e,g,h,k</sup>	32.4 ± 9.71 <sup>12,f,h,k,l</sup>	28.0 ± 5.89 <sup>16,g,m,n,p,q</sup>
1:2:1	22.4 ± 5.36 <sup>g</sup>	21.5 ± 4.13 <sup>g,l,m,n</sup>	23.0 ± 6.87 <sup>h,m,n,p</sup>	24.3 ± 5.32 <sup>m,r,s</sup>
1:2:2	32.2 ± 12.50 <sup>20,e,g</sup>	22.7 ± 3.67 <sup>17,20,l</sup>	28.1 ± 9.74 <sup>m</sup>	27.1 ± 5.55 <sup>17,h,r,t,u</sup>
2:1:1	25.4 ± 9.17 <sup>h</sup>	21.4 ± 3.8 <sup>13,18,h,p</sup>	26.0 ± 7.88 <sup>13,k,q</sup>	24.5 ± 4.43 <sup>18,n,t,v,x</sup>
2:1:2	33.8 ± 11.38 <sup>21,22,f,h,k</sup>	24.3 ± 3.67 <sup>19,21,f,m,p,q</sup>	30.3 ± 10.76 <sup>g,n,q,r</sup>	27.6 ± 4.78 <sup>19,22,k,s,v,y,z</sup>
2:2:1	20.2 ± 3.77 <sup>k,l</sup>	21.2 ± 3.26 <sup>k,q,r</sup>	22.8 ± 6.30 <sup>l,r,s</sup>	21.7 ± 5.94 <sup>l,p,u,x,y</sup>
2:2:2	26.5 ± 10.22 <sup>l</sup>	23.8 ± 3.33 <sup>14,n,r</sup>	28.7 ± 6.34 <sup>14,p,s</sup>	25.7 ± 5.01 <sup>q,z</sup>

Примечание. Одинаковые надстрочные буквы указывают на статистически значимые различия ( $P < 0.05$ , парный критерий Вилкоксона) длительностей циклов бластомеров у эмбрионов каждой из групп (различия значений в столбцах). Одинаковые надстрочные цифры указывают на статистически значимые различия ( $P < 0.05$ , критерий Ван-дер-Вардена) длительностей соответствующих циклов у эмбрионов из разных групп (различия значений по строкам).



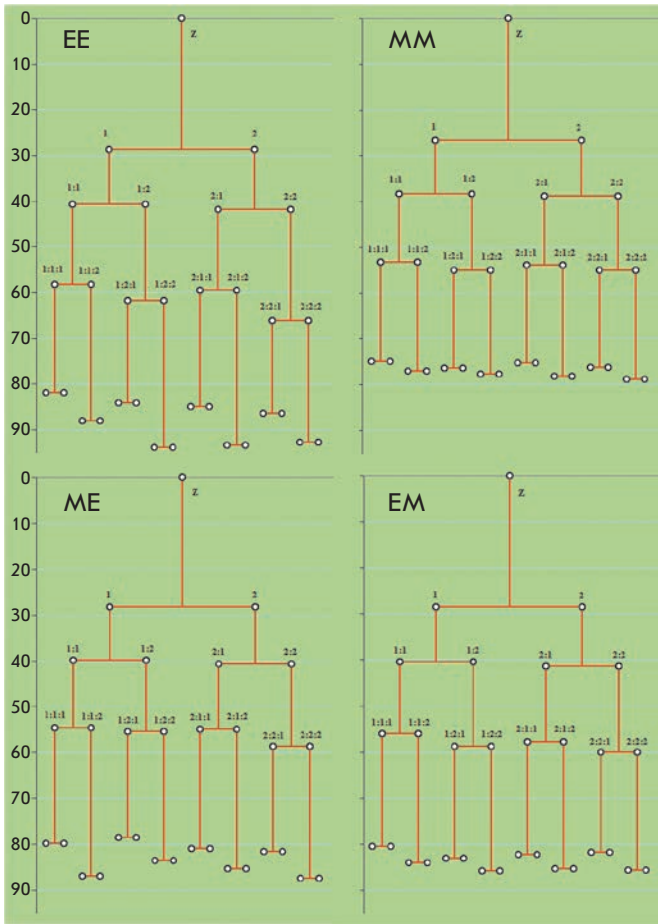


Рис. 3. Генеалогия бластомеров EE-, MM-, ME- и EM-эмбрионов. Вертикальная ось – время от момента внутриклеточной инъекции спермия, ч. Последовательность цифр отражает порядок появления бластомеров: меньшая цифра кодирует бластомеры с менее продолжительным циклом. Вертикальные линии соответствуют средним значениям продолжительностей циклов бластомеров. Z – зигота

ME- и EM-эмбрионов первых групп, так же как MM-эмбрионов (т.е., в совокупности, параметры быстро дробящихся зародышей), хорошо соответствуют прогностическим критериям успешно развивающихся зародышей (см. табл. 1 и 2).

**Генеалогия и циклы бластомеров**

Продолжительности циклов бластомеров у 4- и 8-клеточных эмбрионов с разными вариантами второго деления дробления, в целом, различны (критерий Крускала–Уоллиса,  $P < 0.000$  в обоих случаях). Наиболее короткие циклы свойственны MM-эмбрионам, наиболее длительные – EE-эмбрионам. Промежуточное положение занимают ME- и EM-

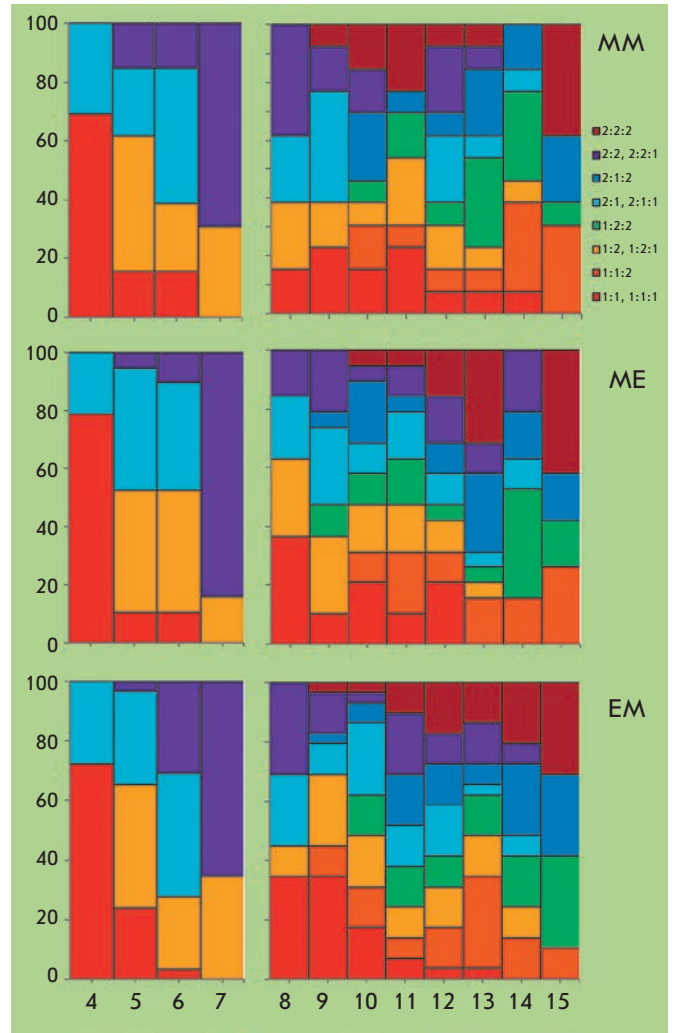


Рис. 4. Распределения моментов делений бластомеров 4- (левые диаграммы) и 8-клеточных (правые диаграммы) MM-, ME-, EM-эмбрионов. Горизонтальные оси – последовательные деления дробления. Отличающиеся цветом столбцы – частоты делений отдельных бластомеров в % от совокупной частоты делений в каждом из последовательных делений (вертикальные оси). Цветовой код различающихся происхождением бластомер представлен в поле правого верхнего рисунка

эмбрионы, у которых циклы соответствующих бластомеров (особенно на 8-клеточной стадии) достаточно близки между собой (см. табл. 3). Циклы бластомеров первых групп ME- и EM-эмбрионов короче, чем соответствующие циклы у эмбрионов из вторых и третьих групп (значения продолжительностей циклов и их статистические сравнения представлены в табл. 4).

В силу генеалогической иерархии время деления того или иного бластомера складывается из продол-

Таблица 4. Продолжительности циклов бластомеров (средние значения, стандартное отклонение, ч) и их сопоставления у МЕ- и ЕМ-эмбрионов с различными темпами развития (группы 1, 2 и 3)

Бластомеры	МЕ			ЕМ		
	Группа 1 (N = 8)	Группа 2 (N = 5)	Группа 3 (N = 6)	Группа 1 (N = 7)	Группа 2 (N = 5)	Группа 3 (N = 17)
1	11.0 ± 1.21 <sup>1,2,a</sup>	12.4 ± 0.51 <sup>1,a</sup>	12.2 ± 0.59 <sup>2,a</sup>	10.9 ± 0.46 <sup>1,a</sup>	14.2 ± 0.59 <sup>1,2,a</sup>	11.7 ± 1.15 <sup>2,a</sup>
2	11.7 ± 1.11 <sup>3,4,a</sup>	13.3 ± 0.94 <sup>3,a</sup>	13.1 ± 0.85 <sup>4,a</sup>	11.9 ± 1.33 <sup>3,a</sup>	15.0 ± 0.66 <sup>3,4,a</sup>	12.7 ± 1.80 <sup>4,a</sup>
1:1	13.1 ± 2.10 <sup>5,8,b</sup>	16.5 ± 1.77 <sup>5</sup>	15.1 ± 0.81 <sup>8,b</sup>	13.2 ± 1.90 <sup>5,9,b,c</sup>	21.0 ± 6.44 <sup>5,10,b</sup>	14.9 ± 2.06 <sup>9,10,b,c</sup>
1:2	13.8 ± 2.43 <sup>6,9,b,c</sup>	17.5 ± 2.47 <sup>6</sup>	16.1 ± 1.25 <sup>9,b</sup>	15.2 ± 2.14 <sup>6,b</sup>	25.6 ± 6.95 <sup>6,11,b</sup>	17.3 ± 3.76 <sup>11,b</sup>
2:1	12.4 ± 0.92 <sup>7,10,c,d</sup>	15.5 ± 2.79 <sup>7</sup>	15.5 ± 2.24 <sup>10,c</sup>	14.2 ± 1.40 <sup>7,d</sup>	20.9 ± 4.43 <sup>7,12,c</sup>	15.8 ± 2.85 <sup>12,d</sup>
2:2	14.9 ± 3.13 <sup>13,11,d</sup>	18.2 ± 1.53	21.7 ± 8.24 <sup>11,c</sup>	15.8 ± 2.06 <sup>8,c,d</sup>	23.0 ± 4.89 <sup>8,13,c</sup>	18.4 ± 3.96 <sup>13,c,d</sup>
1:1:1	20.0 ± 4.06 <sup>12,17,e,f,g</sup>	31.9 ± 5.95 <sup>12b,c,d</sup>	26.9 ± 5.45 <sup>17,d</sup>	20.4 ± 1.83 <sup>14,21,e</sup>	24.3 ± 5.07 <sup>d,e</sup>	26.0 ± 5.40 <sup>14,21,e,f</sup>
1:1:2	27.3 ± 6.78 <sup>13,18,h,k</sup>	42.9 ± 9.15 <sup>13,20,b,e,f</sup>	30.5 ± 7.15 <sup>20,d,e,f</sup>	23.1 ± 3.07 <sup>15,22,e,f,g</sup>	31.1 ± 6.18 <sup>15,d,f</sup>	29.2 ± 5.72 <sup>e,22,g,h</sup>
1:2:1	20.1 ± 2.98 <sup>h,l</sup>	27.2 ± 11.5 <sup>e,g,h</sup>	23.5 ± 4.37 <sup>e,g</sup>	19.9 ± 2.79 <sup>16,23,h,k</sup>	25.1 ± 3.37 <sup>16,g</sup>	25.9 ± 5.69 <sup>23,g,k,l</sup>
1:2:2	25.8 ± 7.43 <sup>f,l,m</sup>	32.9 ± 14.7 <sup>f,g</sup>	27.1 ± 7.63 <sup>g</sup>	21.5 ± 3.16 <sup>17,24,h,l</sup>	28.3 ± 4.68 <sup>17,g</sup>	29.0 ± 5.14 <sup>f,24,e,k,m,n,p</sup>
2:1:1	19.9 ± 2.62 <sup>14,18,k,n,p,q</sup>	34.9 ± 7.18 <sup>14,21,k</sup>	26.7 ± 5.70 <sup>18,21,h,k</sup>	20.6 ± 3.19 <sup>18,25,f,m</sup>	26.8 ± 5.97 <sup>18,h,k</sup>	25.4 ± 3.54 <sup>25,m,q</sup>
2:1:2	21.9 ± 3.56 <sup>15,19,n,r</sup>	42.9 ± 9.99 <sup>15,22,c,h,k,l</sup>	30.9 ± 6.89 <sup>19,22,h,l</sup>	22.4 ± 2.98 <sup>19,26,k,m,n</sup>	28.8 ± 6.31 <sup>19,h,l</sup>	29.4 ± 3.34 <sup>26,f,l,q,r,s</sup>
2:2:1	23.2 ± 5.00 <sup>p,s</sup>	27.8 ± 5.17 <sup>23,d,f,l,m</sup>	18.2 ± 6.02 <sup>23,f,k,l,m</sup>	19.0 ± 2.20 <sup>27,g,l,n,p</sup>	19.4 ± 10.43 <sup>f,k,l,m</sup>	23.6 ± 4.89 <sup>27,h,n,r,t</sup>
2:2:2	27.3 ± 5.30 <sup>16,g,m,q,r,s</sup>	34.8 ± 4.67 <sup>16,24,m</sup>	25.7 ± 6.02 <sup>24,m</sup>	21.2 ± 2.92 <sup>20,28,p</sup>	28.0 ± 6.86 <sup>e,20,m</sup>	26.8 ± 4.18 <sup>28,p,s,t</sup>

Обозначения те же, что и в табл. 3.

жительности цикла делящегося бластомера и продолжительностей циклов предшествующих ему бластомеров. Неравенство циклов сестринских бластомеров (рис. 3) является событием, «структурирующим» периоды делений бластомеров в каждом цикле дробления и траектории дробления в целом.

Замена временных параметров траектории дробления последовательностью (порядком) делений бластомеров (опосредующих сроки существования линий бластомеров, см. рис. 3) позволяет выявить вариабельность циклов отдельных бластомеров в составе различных эмбрионов. Распределения, связывающие частоты делений сходных по происхождению бластомеров с последовательностью их деления в третьем и четвертом циклах траекторий дробления, значимо отличаются от соответствующих равновероятных как для 4-клеточных ЕЕ-, ММ-, МЕ- и ЕМ-эмбрионов ( $\chi^2$  равны: 20.0, 40.3, 84.0 и 93.1 соответственно; пороговое значение  $\chi^2$  ( $P < 0.05$ ) равно 16.9), так и для 8-клеточных ММ-, МЕ- и ЕМ-эмбрионов ( $\chi^2$  равны: 79.4, 98.9 и 133.8 соответственно; пороговое значение  $\chi^2$  равно 66.3). Распределение для 8-клеточных ЕЕ-эмбрионов не отличается от равновероятного ( $\chi^2 = 56.0$ ,  $P > 0.250$ ), что связано с малочисленностью выборки таких эмбрионов.

У 4-клеточных МЕ-эмбрионов бластомер 1 : 1 делится раньше остальных в 78.9% случаев ( $\chi^2 = 31.7$ ,  $P < 0.000$ ), а бластомер 2 : 2 – в 84.2% ( $\chi^2 = 40.6$ ,  $P < 0.000$ ). Бластомеры 1 : 1 : 1, 2 : 2 : 2 и 1 : 2 : 2 значимо чаще делятся восьмыми, 15-ми и 14-ми (36.8,

42.1 и 36.8%;  $\chi^2 = 12.6$ , 26.1 и 15.1;  $P < 0.050$ ,  $< 0.001$  и 0.050 соответственно). Бластомеры 1 : 1 и 2 : 2 у 72.4 и 65.5% ЕМ-эмбрионов делятся четвертыми и седьмыми ( $\chi^2 = 40.6$  и 34.6,  $P < 0.000$ ); бластомер 1 : 1 : 1 – восьмым и девятым (в 34.5% случаев,  $\chi^2 = 36.9$  и 22.0,  $P < 0.000$  и  $< 0.005$ ), бластомеры 1 : 1 : 2 и 2 : 2 : 2 – 14-ми и 15-ми (в 31.0 и 34.5%,  $\chi^2 = 35.8$ ,  $P < 0.000$ ) (см. рис. 4). У ММ-эмбрионов первыми и последними делятся бластомеры 1 : 1 и 2 : 2 (69.2%,  $\chi^2 = 16.8$ ,  $P < 0.025$ ) и бластомеры 2 : 2 : 1 и 2 : 2 : 2 (в 38.5% случаях,  $\chi^2 = 15.9$  и 18.4,  $P < 0.050$  и  $< 0.025$  соответственно).

Таким образом, на протяжении третьего и четвертого циклов дробления в составе эмбрионов появляются и возрастают в численности бластомеры, у которых, вопреки сходству происхождения, существенно различны последовательности делений (т.е. сроки существования линий бластомеров до моментов их делений). У подавляющего большинства 4-клеточных эмбрионов два бластомера преемственно делятся первыми и последними, в то время как последовательности делений двух других бластомеров переменны. У 8-клеточных эмбрионов вероятность преемственного раннего или позднего делений бластомеров снижается, но увеличивается количество бластомеров, момент деления которых варьирует у разных эмбрионов. Если такая тенденция продолжается в пятом и шестом циклах дробления, то последовательность делений всех бластомеров – 16- и 32-клеточных – станет стохастичной. Поскольку

эмбрионы раньше или позже, но достигли финальной стадии развития (бластоцисты), можно полагать, что обсуждаемый феномен представляет собой одно из проявлений регуляционности бластомеров и зародышей в целом, возрастающей по мере дробления. Возрастание регуляционности, по определению, предполагает расширение спектра потенциальных дифференцировок. Соответственно можно ожидать расширение потенциальных возможностей к дифференцировкам у бластомеров 8-клеточных и, тем более, 16- и 32-клеточных эмбрионов.

Традиционно считается, что ооцит и зигота тотипотенты. Однако по цитологическим критериям ооцит и зигота, наследующая структуру ооцита, представляют собой высокоспециализированные клетки. Помимо характерной морфологии и специфических синтезов, специализация зиготы проявляется в поляризованности, обеспеченной неравномерным распределением в объеме (и по протяженности кортикального слоя) клеточных органелл и комплекса специфических регуляторных макромолекул [18–20 и др.]. Мы предполагаем, что только после элиминации специфических особенностей организации зиготы и освобождения от влияний зиготических детерминантов бластомеры приобретают способность к собственным синтезам и регуляциям, к поляризации и формированию функциональных контактов и, в конечном итоге, к собственным специфическим дифференциациям [21–23]. На молекулярно-генетическом уровне события, освобождающие бластомеры от «диктата зиготы» в период первых делений дробления, исследованы слабо и, вероятнее всего, сопряжены с регуляциями клеточных циклов [24, 25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У плацентарных млекопитающих, в отличие от низших позвоночных, поляризованность («предразметка») зиготы достаточно лабильна, что предопределяет вариабельность временных параметров раннего развития и при несовершенстве или недостаточности этой предразметки – довольно высокий уровень аномалий раннего развития. В результате реализации всех возможных комбинаций меридиональных и экваториальных борозд при дроблении 2-клеточных эмбрионов человека (так же как эмбрионов мышей и, вероятно, иных видов плацентарных млекопитающих) формируются четыре варианта 4-клеточных

эмбрионов. Бластомеры эмбрионов, относящихся к разным вариантам, включают в свой состав существенно разные части зиготы, приобретая таким образом разные «дозы» детерминантов. Сегрегация зиготической цитоплазмы и детерминантов продолжается в следующих делениях дробления. Это, в свою очередь, находит отражение в существенной вариабельности временных параметров (циклов бластомеров, циклов дробления и траектории дробления в целом) в следующих раундах дробления каждого из вариантов 4-клеточных эмбрионов. Вариабельность, связанная со степенью «совершенства» организации зиготы, интерферирует с вариабельностью, приносимой способом ее сегрегации, что проявляется в траекториях дробления. Примером могут служить траектории развития ME- и EM-эмбрионов с существенно разными темпами дробления (первая, вторая и третья группы). По предварительной оценке частоты формирования имплантационно-компетентных бластоцист, восходящих к каждому из вариантов 4-клеточных эмбрионов, различаются. Из этого следует, что вариант формирования 4-клеточных эмбрионов следует учитывать при раннем прогнозе перспективности отдельных зародышей.

Замена временных показателей на порядковые (последовательности делений бластомеров в траектории дробления или, иными словами, опосредованные сроки существования линий бластомеров) позволила обнаружить еще одну форму вариабельности, связанную с особенностями собственно процесса дробления: изменчивость моментов вступления в следующий цикл дробления сходных по происхождению бластомеров в составе разных эмбрионов. Мы предполагаем, что это явление связано с градуальным снижением эффектов детерминантов в результате последовательной элиминации специфической организации зиготы в ее фрагментах (т.е. бластомерах). Достигаемая таким образом дедифференциация бластомеров предшествует и, возможно, разрешает осуществление их собственной экспрессии, регуляции и, в конечном итоге, собственных дифференцировок. В большей или меньшей мере успешная дедифференциация бластомеров предопределяет большее или меньшее временное смещение событий асимметричных делений и компактизации, что, возможно, сказывается на соотношениях внутренней клеточной массы и муральной трофэктодермы в бластоцистах. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Human preimplantation embryo selection. Reproductive medicine and assisted reproductive techniques / Eds K. Elder, J. Cohen. Informa Healthcare, 2007. 379 p.
2. van den Bergh M., Ebner T., Elder K. Atlas of oocytes, zygotes

- and embryos in reproductive medicine. N.Y.: Cambridge University Press, 2012. 237 p.
3. Pribenszky C., Losonczy E., Molnar M., Lang Z., Matyas S., Rajczy K., Molnar K., Kovacs P., Nagy P., Conceicao J., et al. // Reprod. BioMed. Online. 2010. V. 20. P. 371–379.

4. Kirkegaard K., Agerholm I.E., Ingerslev H.J. // *Hum. Reprod.* 2012. V. 27. № 5. P. 1277–1285.
5. Herrero J., Meseguer M. // *Fertil. Steril.* 2013. V. 99. P. 1030–1034.
6. Gulyas B.J. // *J. Exp. Zool.* 1975. V. 193. P. 235–248.
7. Graham C.F., Deussen Z.A. // *J. Embryol. Exp. Morph.* 1978. V. 48. P. 53–72.
8. Gardner R.L. // *Development.* 1997. V. 124. P. 289–301.
9. Cooke S., Tyler J.P.P., Driscoll G.L. // *Hum. Reprod.* 2003. V. 18. P. 2397–2405.
10. Edwards R.G., Hansis C. // *Reprod. BioMed. Online.* 2005. V. 11. № 2. P. 206–218.
11. Gardner R.L. // *Hum. Reprod.* 2002. V. 17. № 12. P. 3178–3189.
12. Piotrowska-Nitsche K., Zernicka-Goetz M. // *Mech. Dev.* 2005. V. 122. P. 487–500.
13. Edwards R.G. // *Reprod. BioMed. Online.* 2003. V. 6. № 1. P. 97–113.
14. Edwards R.G., Beard H.K. // *Mol. Hum. Reprod.* 1997. V. 3. № 10. P. 863–905.
15. Zernicka-Goetz M., Morris S.A., Bruce A.W. // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 467–477.
16. Gardner D.K., Schoolcraft W.B. // *Towards reproductive certainty: Fertility and genetics beyond 1999* / Eds R. Jansen, D. Mortimer. Carnforth: Parthenon Publ., 1999. P. 378–388.
17. Gardner D.K., Stevens J., Sheehan C.B., Schoolcraft W.B. // *Human preimplantation embryo selection: Reproductive medicine & assisted reproductive techniques series* / Eds K. Elder, J. Cohen. Informa Healthcare, Informa UK Ltd., 2007. P. 79–87.
18. Goodall H., Johnson M.H. // *J. Embryol. Exp. Morph.* 1984. V. 79. P. 53–76.
19. Bischoff M., Parfitt D.-E., Zernicka-Goetz M. // *Development.* 2008. V. 135. P. 953–962.
20. Kloc M., Ghobrial R.M., Borsuk E., Kubiak J.Z. // *Mouse development – from oocyte to stem cells* / Ed. J.Z. Kubiak. Berlin, Haidelberg: Springer-Verlag, 2012. P. 23–44.
21. Marikawa Y., Alarcón V.B. // *Mol. Reprod. Dev.* 2009. V. 76. № 11. P. 1019–1032.
22. Zhang P., Zucchelli M., Bruce S., Hambiliki F., Stavreus-Evers A., Levkov L., Skottman H., Kerkelä E., Kere J., Hovatta O. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 11. e7844.
23. Cockburn K., Rossant J. // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. № 4. P. 995–1003.
24. Kiessling A.A., Bletsa R., Desmarais B., Mara C., Kallianidis K., Loutradis D. // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010. V. 27. № 6. P. 265–276.
25. Duronio R.J. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 746–750.



УДК 577.218

# ZAD-домен определяет ядерную локализацию инсуляторных белков *Drosophila melanogaster*

Н. А. Золотарев, О. Г. Максименко, П. Г. Георгиев, А. Н. Бончук\*

Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

\*E-mail: errinaceus@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.12.2015

Принята к печати 14.03.2016

**РЕФЕРАТ** Многие транскрипционные факторы с мотивами цинковых пальцев типа C2H2 содержат на N-конце характерный домен, названный ZAD (Zinc-finger Associated Domain), в котором четыре остатка цистеина координируют ион цинка. Показано, что некоторые ZAD-домены обладают способностью к гомодимеризации. Однако функциональная роль этого домена остается почти неизученной. Нами показано, что точечная мутация в ZAD-доме инсуляторного белка Zw5 нарушает его ядерную локализацию, не влияя на способность к димеризации. Установлено также, что ZAD-домены необходимы для ядерной локализации белков Pita и Grau. Таким образом, одна из функций ZAD-домена состоит в регуляции ядерной локализации транскрипционных факторов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** инсуляторы, транскрипционные факторы, хроматин.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ZAD – домен, ассоциированный с цинковыми пальцами (Zinc-finger Associated Domain); ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид.

## ВВЕДЕНИЕ

Белки с ДНК-связывающим доменом «цинковые пальцы» C2H2-типа – самый обширный класс транскрипционных факторов у высших эукариот [1]. Обычно C2H2-домены формируют кластеры, часть из которых отвечает за высокоспецифичное связывание с ДНК. У членистоногих обнаружен подкласс транскрипционных факторов с цинковыми пальцами типа C2H2, представители которого на N-конце содержат специфичный домен, названный ZAD (Zinc-finger Associated Domain), в котором четыре остатка цистеина координируют ион цинка [2, 3]. В клетках *Drosophila melanogaster* насчитывается более 90 транскрипционных факторов (рис. 1) с доменами C2H2 и ZAD [3]. Геномы других представителей членистоногих могут кодировать от четырех (дафния обыкновенная) до 120 (малярийный комар) факторов этого класса. Кристаллическая структура ZAD-домена фактора Grauzone (Grau) показала, что он представляет собой димер (рис. 2А) [4]. Кроме того, *in vitro* показано, что ZAD-домены белков Serendipity-δ и Weckle также образуют димеры [5, 6]. До настоящего времени это семейство транскрипционных факторов остается почти неизученным, определена только функциональная роль некоторых из них [7–9]. Три транскрипционных фактора с ZAD-доменом (Pita, ZIPIC и Zw5) можно отнести к классу инсулятор-

ных белков (рис. 2Б) [10, 11]. Инсуляторами называют регуляторные элементы, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором только в том случае, если находятся между ними [12, 13]. Недавно было показано, что инсуляторы могут участвовать в установлении дистанционных взаимодействий и организации архитектуры хромосом [14, 15]. Белок Zw5 обнаружен в составе инсулятора SCS, расположенного на границе кластера генов теплового шока 70 [10]. Белки Pita и ZIPIC исходно идентифицировали как партнеры инсуляторного белка CP190, который считается ключевым для формирования архитектуры хроматина [11]. Все инсуляторные белки связываются со специфическими нуклеотидными последовательностями длиной 9–15 п.н., мультипликация которых формирует эффективный инсулятор [10, 11, 16]. С помощью полногеномного анализа показано, что Zw5, Pita и ZIPIC преимущественно связываются с промоторами генов [11]. Предполагается, что ZAD-домен может участвовать в организации дистанционных взаимодействий между удаленными сайтами связывания одного и того же инсуляторного белка [15].

В настоящей работе изучена точечная мутация в ZAD-доме белка Zw5, которая приводит к летальному фенотипу. Показано, что эта мутация нарушает ядерную локализацию белка Zw5. ZAD-

домены других двух белков, Pita и Grau, также нужны для ядерной локализации этих белков. Таким образом, одна из функций ZAD-домена состоит в регуляции ядерной локализации транскрипционных факторов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Экспрессия и очистка белков

ДНК, кодирующую ZAD-домен белка Zw5 (дикого типа и с заменой R14G) дрозофилы, клонировали в плазмиду pET32a(+) в рамке с шестью остатками гистидина и тиоредоксином. Плазмидами трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3). Экспрессию белка индуцировали 1 mM ИПТГ, перед индукцией добавляли 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub>, культуру инкубировали в течение ночи при 18°C на качалке. Бактериальные клетки разрушали ультразвуком в 50 mM HEPES-КОН-буфере pH 7.6, содержащем 500 mM NaCl, 20 mM имидазол, 5 mM β-меркаптоэтанол, 1 mM ФМСФ с добавлением 1 : 500 Proteinase inhibitor cocktail VII (Calbiochem). Белки выделяли из лизата бактериальных клеток с помощью аффинной хроматографии на Co-IDA-сефарозе. Элюцию проводили 50 mM HEPES-КОН-буфером pH 7.6, содержащем 500 mM NaCl, 250 mM имидазол, 5 mM β-меркаптоэтанол.

### Химическая сшивка белков

После выделения белки диализовали против буфера PBS. К препаратам добавляли глутаральдегид до конечной концентрации 0.01 или 0.1%, инкубировали при комнатной температуре в течение 10–15 мин. Реакцию останавливали, добавляя глицин до концентрации 50 mM, и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Продукты сшивки визуализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием серебром.

### Окрашивание препаратов клеток S2

#### *D. melanogaster*

кДНК, кодирующие либо полноразмерные белки дикого типа, либо мутантные, клонировали в рамке с 3×FLAG-пептидом в плазмиду для транзientной экспрессии под контролем промотора гена актина 5С. Клетки трансфицировали по стандартной методике с помощью реагента Cellfectin (Invitrogen). Окрашивание проводили на 3-и сутки после трансфекции.

В 35-мм чашке Петри на покровное стекло наносили 1 мл суспензии S2-клеток. Инкубировали в течение ночи при 24°C для осаждения клеток на стекло. Среду с неприсоединенными клетками удаляли.

Все растворы наносили по стенке чашки, чтобы не смыть клетки со стекла. Инкубацию проводили при комнатной температуре на качалке с низкой скоростью.

Стекло промывали 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) 2 раза по 5 мин. Клетки фиксировали 1 мл фиксирующего раствора (2% формальдегида, 50 mM MgCl<sub>2</sub> в PBS) в течение 20 мин. Промывали 1 мл PBS 3 раза по 5 мин. Для повышения проницаемости клеточных мембран клетки обрабатывали 1% раствором Triton X-100 в PBS в течение 10 мин. Промывали PBS (1 мл 3 раза по 5 мин). Инкубировали в блокирующем растворе (1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0.05% Tween-20 в PBS) 2 раза по 30 мин. Инкубировали с 1 мл блокирующего раствора с первичными антителами (1 : 30 антиламин (из коллекции Университета Айовы), 1 : 300 анти-FLAG (Sigma)) в течение 1 ч. Промывали раствором 0.25% BSA, 0.05% Tween-20 в PBS (3 раза по 15 мин). Инкубировали с 1 мл блокирующего раствора с вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором (Invitrogen), и TO-PRO-3 Iodide в течение 1 ч. Промывали раствором 0.25% BSA, 0.05% Tween-20 в PBS (3 раза по 15 мин). Промывали 1 мл PBS в течение 5 мин, промывали стекло водой, удаляли избыток воды. Добавляли среду Vectashield для закрепления на предметном стекле. Края покровного стекла покрывали лаком.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Летальная мутация в ZAD-домене белка Zw5 не влияет на его способность к димеризации

Ген *dwg* (*deformed wings*), кодирующий белок Zw5, экспрессируется преимущественно в процессе эмбриогенеза. Описано много мутаций в гене *dwg*, которые имеют летальный фенотип, что предполагает важную роль Zw5 в эмбриональном развитии. Одна из охарактеризованных мутаций, *dwg*<sup>8</sup> или *zw5*<sup>62jl</sup>, приводит к замене аргинина на глицин в положении 14 (R14G) ZAD-домена [10]. Эта рецессивная мутация летальна на личиночной стадии. Для доказательства того, что именно мутация *zw5*<sup>62jl</sup> отвечает за летальный фенотип, получена конструкция, в которой ген *dwg* находится под контролем промотора гена *hsp83*. В качестве репортера для идентификации трансформантов использовали ген *white*, который определяет пигментацию глаз. В результате трансформации в эмбрионы дрозофилы получены четыре трансгенные линии с одной инсерцией конструкции. Все трансгены комплементировали летальный фенотип мутации *zw5*<sup>62jl</sup>, что подтверждает роль этой мутации в проявлении летального фенотипа.

Таким образом, точечная мутация в ZAD-домене приводит к полной инактивации функциональной ак-



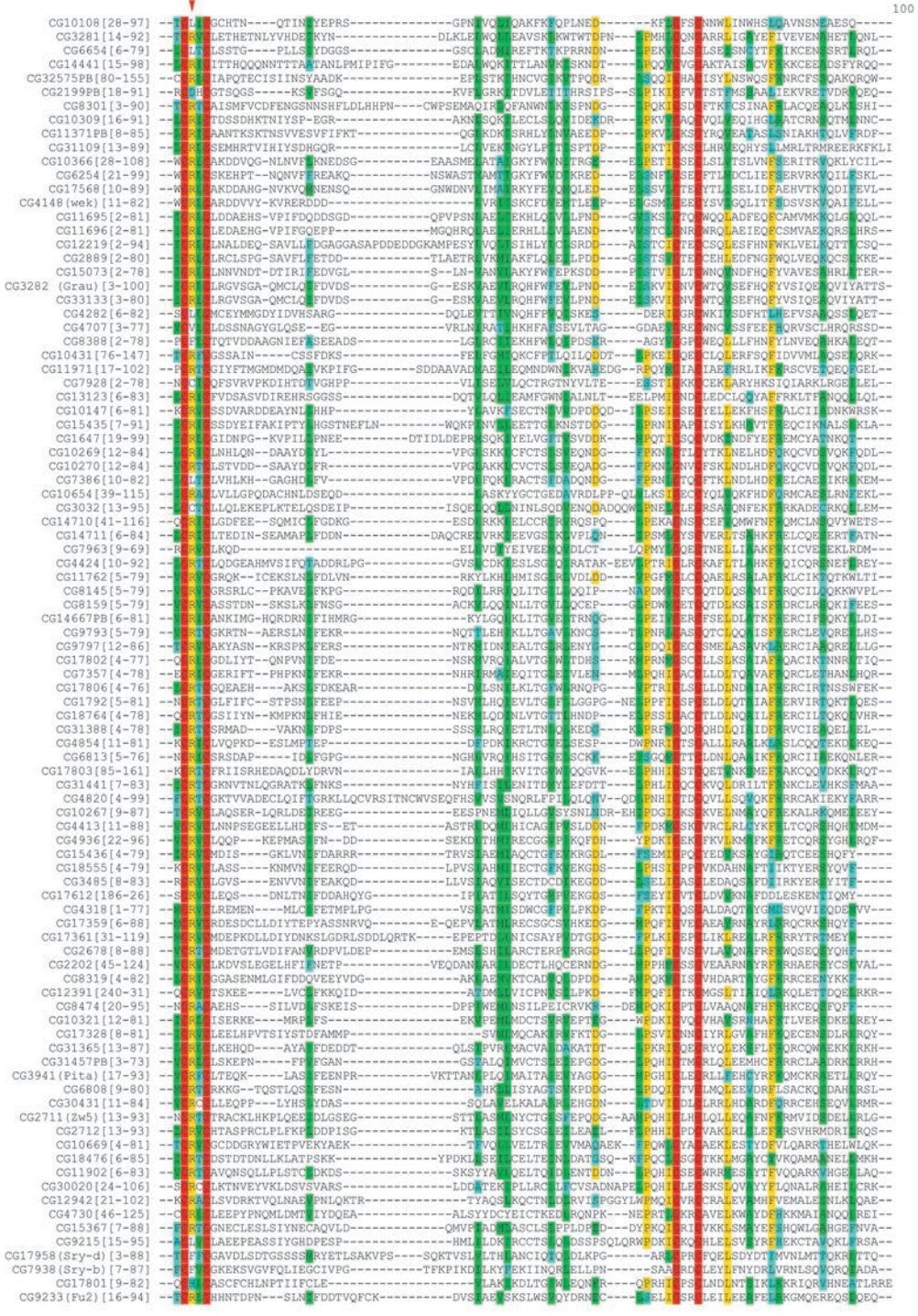


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ZAD-доменов *Drosophila*. Стрелкой показано положение консервативного остатка аргинина

тивности Zw5. Из этого можно сделать вывод о важности R14 в составе ZAD-домена. Выравнивание последовательностей ZAD-доменов различных белков показало, что большинство ZAD-доменов содержат остаток аргинина в положении 14 (рис. 1). Из 93 кодируемых геномом *Drosophila* транскрипционных факторов с ZAD-доменом аргинин в положении 14

(R14) найден у 81, у пяти аргинин заменен на лейцин, в трех – на фенилаланин, в двух – на цистеин, в одном – на аспарат и гистидин. Ранее предположили, что R14 участвует в димеризации ZAD-домена [4], поскольку он (R5 у белка Grau) вовлечен в формирование водородных связей с Q74 (рис. 2A), хотя эти остатки являются лишь небольшой ча-

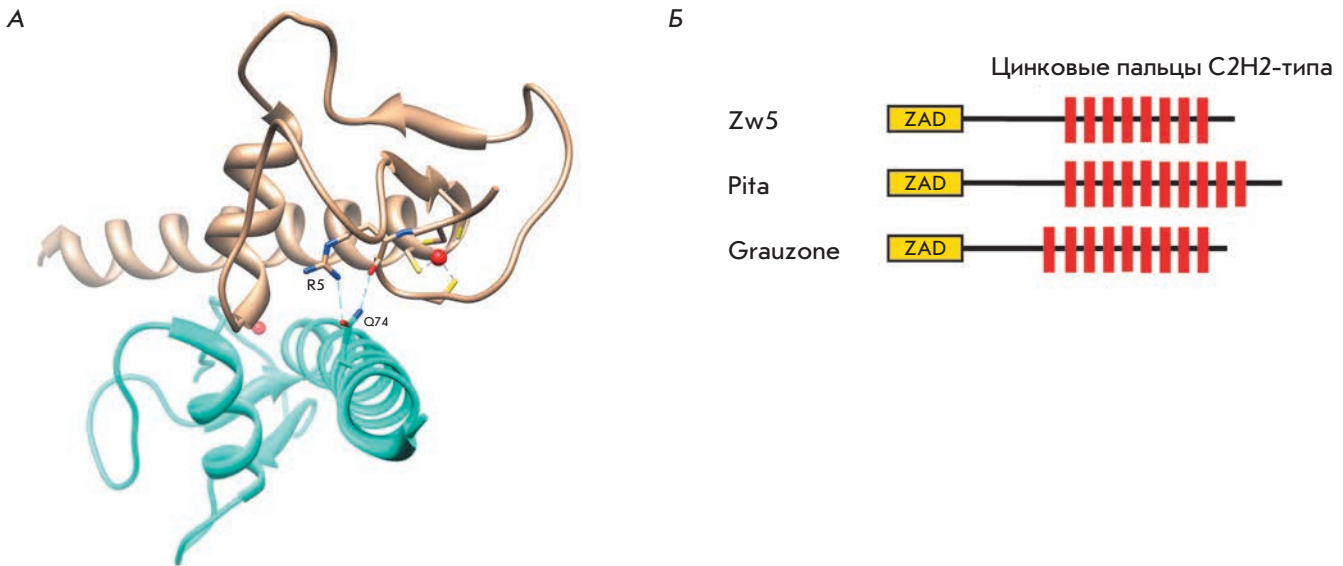


Рис. 2. А – структура димера ZAD-домена белка Grauzone (1PZW в базе PDB). Показано формирование водородных связей между R5 (остаток, гомологичный R14 в белке Zeste-white 5) и Q74, а также четыре консервативных цистеина, координирующие атом цинка. Б – доменная структура белков Zeste-white 5, Pita и Grauzone

стью протяженного интерфейса димеризации двух ZAD-доменов. С целью проверки этого предположения в векторе рЕТ32a(+) клонировали кДНК, кодирующие домены ZAD<sup>wt</sup> и ZAD<sup>R14G</sup>, слитые с тиоредоксином, и экспрессировали их в клетках *E. coli*. Оказалось, что мутантный ZAD-домен выделяется в существенно меньших количествах по сравнению с доменом дикого типа. Это может свидетельствовать о меньшей стабильности и нарушении правильной конформации мутантного ZAD-домена, экспрессируемого в бактериях.

Для сравнения димеризации нормального и мутантного ZAD-домена был проведен опыт по сшиванию ZAD-доменов с помощью глутаральдегида. Как видно из рис. 3, в концентрации 10 мкМ оба ZAD-домена с примерно одинаковой эффективностью образуют димеры. Таким образом, точечная мутация R14G не влияет на способность ZAD-домена белка Zw5 к димеризации *in vitro*, однако нельзя исключить возможности снижения стабильности димеров при низких концентрациях белка в клетке.

### ZAD-домены нужны для ядерной локализации белков в культуре клеток S2

Установлено, что у мутантного ZAD-домена сохранена способность к димеризации, поэтому следующей задачей стало изучение распределения нормального и мутантного белков Zw5 в S2-клетках дрозофилы. С этой целью созданы векторы экспрессии, в которых гены, кодирующие нормальный и мутантный белки Zw5, слитые с эпитопом 3×FLAG, находились

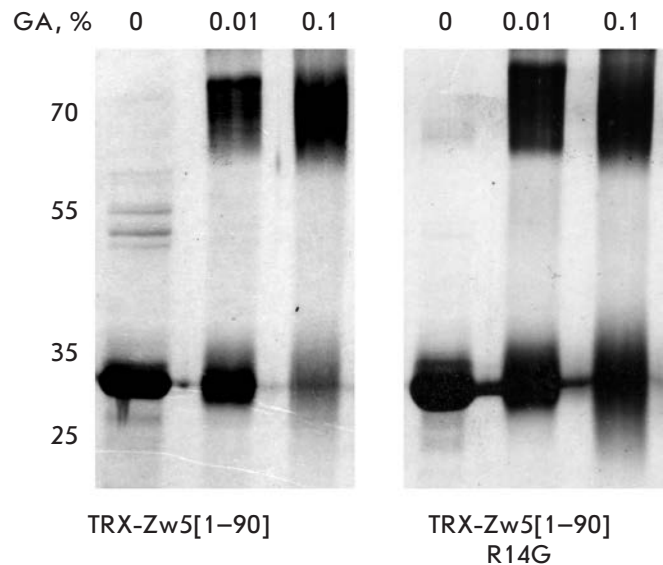


Рис. 3. Результаты химической сшивки при помощи глутаральдегида (GA) ZAD-домена белка Zw5 дикого типа и содержащего мутацию R14G, слитых с тиоредоксином (TRX). Концентрация белка 10 мкМ

под контролем актинового промотора. Этими векторами трансфицировали клетки S2, и определяли распределение белков с использованием антител к эпитопу 3×FLAG, ламину и красителя TO-PRO-3 Iodide, который окрашивает ДНК (рис. 4). Белок Zw5-3×FLAG локализуется преимущественно



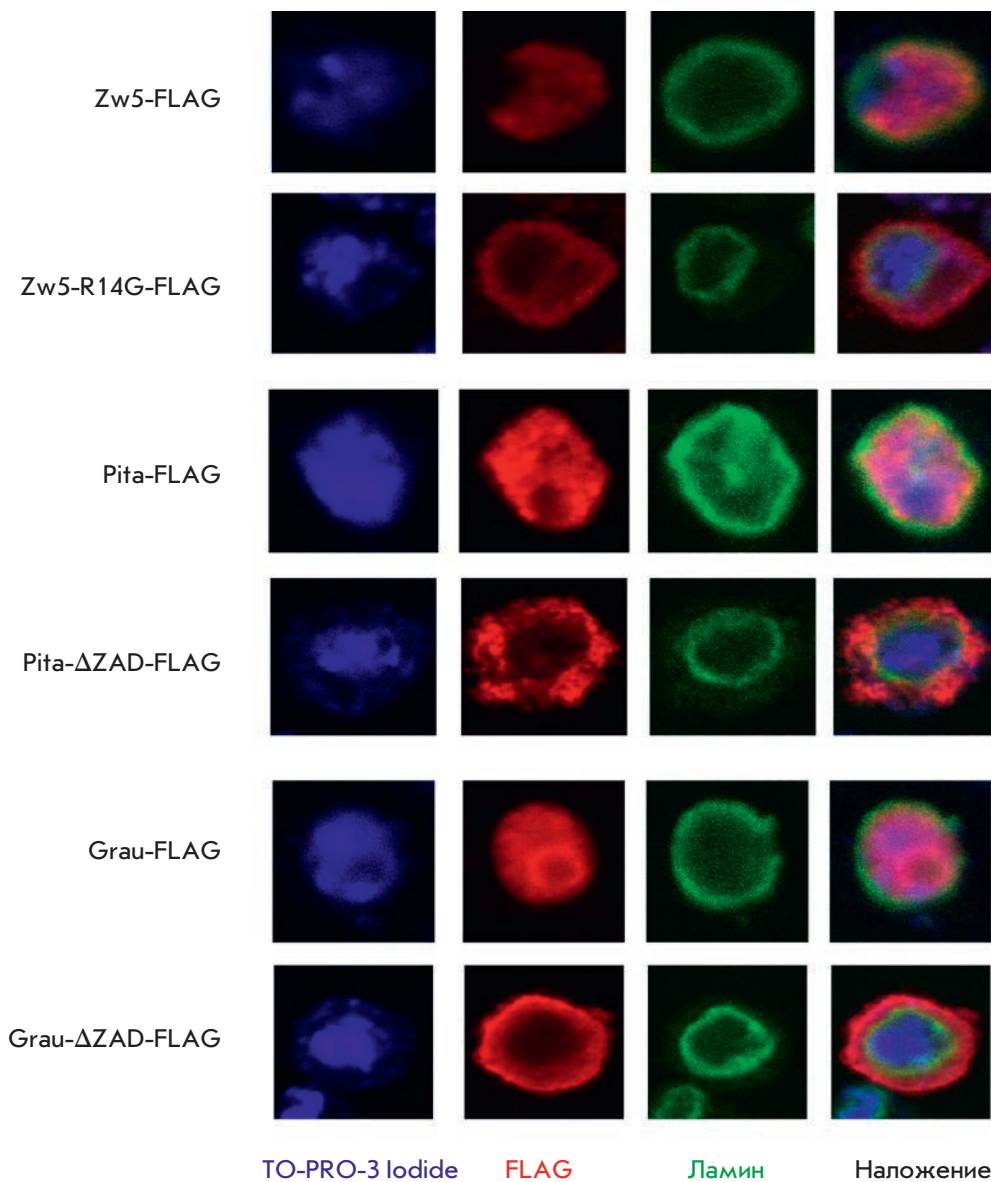


Рис. 4. Иммуноцитохимическое окрашивание S2-клеток, экспрессирующих белки с нарушенным ZAD-доменом и белки дикого типа, слитые с 3×FLAG-пептидом

в ядре. Неожиданно оказалось, что белок Zw5<sup>R14G</sup>-3×FLAG находится почти исключительно в цитоплазме. Таким образом, точечная мутация нарушает ядерную локализацию белка Zw5, что объясняет летальный эффект аллеля *zw5*<sup>62jl</sup>. По данным сервиса NucPred [17], белок Zw5 не содержит выраженных сигналов ядерной локализации.

Для выяснения роли ZAD-домена в ядерной локализации белков использовали два других хорошо изученных белка с ZAD-доменом: Pita и Grau [4, 8, 11]. Эти белки имеют одинаковую структуру, сходную с Zw5: ZAD-домен находится на N-конце, и группа доменов цинковых пальцев типа C2H2 образует кластер на C-конце (рис. 2Б). Показано, что домены типа «цинковые пальцы» могут определять ядерную локализацию белков [18, 19]. Согласно данным програм-

мы NucPred [17], Pita не имеет выраженных сигналов ядерной локализации (NLS), а у Grauzone выраженный NLS находится в центральной части (170–190 аминокислот). Сервис PredictProtein [20] предсказывает ядерную локализацию всех трех белков с низкой степенью значимости у Zw5 и Pita и с высокой – у Grauzone.

кДНК, кодирующие белки Grau и Pita с ZAD-доменом и без него, были слиты с эпитопом 3×FLAG и встроены в экспрессионный вектор под контролем актинового промотора (Act5C). Полученными конструкциями трансфицировали клетки S2, распределение белков изучали на препаратах с использованием антител к эпитопу 3×FLAG и ламину (рис. 4). Белки Pita-3×FLAG и Grau-3×FLAG находятся преимущественно в ядре. Окрашивание эндогенных

белков Grau, Zw5 и Pita (данные не представлены) выявило их равномерное ядерно-цитоплазматическое распределение. Делеция ZAD-домена приводила к локализации FLAG-антител преимущественно в цитоплазме, что объясняется потерей способности белков без ZAD-домена попадать в ядро клеток (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты предполагают, что точечная замена аргинина на глицин в положении 14 (R14G) ZAD-домена нарушает ядерную локализацию белка Zw5. R14 в ZAD-домене Zw5 соответствует пятому аминокислотному остатку ZAD-домена Grau. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, боковая цепь этого остатка экспонирована наружу и в то же время способна к образованию водородной связи с Q74 [4]. На основе этого авторы статьи [4] предположили, что аргинин-5 участвует в димеризации ZAD-домена Grau. Однако, согласно нашим результатам, аргинин-14 в составе ZAD-домена Zw5 не нужен для димеризации белка. Вероятно, структура ZAD-доменов может значительно различаться, что объясняет, почему ZAD-домены предпочтительно гомодимеризуются (неопубликованные данные).

Предполагаемая локализация аргинина-14 на поверхности ZAD-домена может объяснить роль этого остатка во взаимодействии с белками, которые регулируют импорт в ядро. У белков Pita и Grau ZAD-домены гомологичны между собой и с ZAD-доменом

Zw5 не более чем на 58%. Однако эти ZAD-домены также необходимы для локализации соответствующих белков в ядре.

Интересно, что с помощью биоинформатических подходов сигналы ядерной локализации были предсказаны в средней части Grau и не найдены в составе белков Pita и Zw5. При этом белок Pita представлен в клетках в виде двух изоформ, которые различаются наличием первых 60 аминокислот, входящих в состав ZAD-домена [по данным Flybase]. Согласно экспериментальным данным, локализация транскрипционных факторов с ZAD-доменом в клетке подвержена сложной регуляции. Так, изменение ядерно-цитоплазматической локализации белка Weckle в процессе развития было показано ранее [6]. ZAD-содержащий белок Trade Embargo, который связывается с хроматином, равномерно распределен между ядром и цитоплазмой [21].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашей работы показывают, что ядерно-цитоплазматическое распределение ZAD-содержащих транскрипционных факторов, по всей видимости, имеет важное регуляторное значение, а ZAD-домены играют ключевую роль в этом процессе. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00166).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Разин С.В., Борунова В. В., Максименко О.Г., Кантидзе О.Л. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. С. 277–288.
2. Chung H.R., Schafer U., Jackle H., Bohm S. // *EMBO Rep*. 2002. V. 3. P. 1158–1162.
3. Chung H.R., Lohr U., Jackle H. // *Mol. Biol. Evol*. 2007. V. 24. P. 1934–1943.
4. Jauch R., Bourenkov G.P., Chung H.R., Urlaub H., Reidt U., Jackle H., Wahl M.C. // *Structure*. 2003. V. 11. P. 1393–1402.
5. Payre F., Buono P., Vanzo N., Vincent A. // *Mol. Cell Biol*. 1997. V. 17. P. 3137–3145.
6. Chen L.Y., Wang J.C., Hyvert Y., Lin H.P., Perrimon N., Imler J.L., Hsu J.C. // *Curr. Biol*. 2006. V. 16. P. 1183–1193.
7. Li J., Gilmour D.S. // *EMBO J*. 2013. V. 32. P. 1829–1841.
8. Page A.R., Kovacs A., Deak P., Torok T., Kiss I., Dario P., Bastos C., Batista P., Gomes R., Ohkura H., et al. // *EMBO J*. 2005. V. 24. P. 4304–4315.
9. Gibert J.M., Marcellini S., David J.R., Schlotterer C., Simpson P. // *Dev. Biol*. 2005. V. 288. P. 194–205.
10. Gaszner M., Vazquez J., Schedl P. // *Genes Dev*. 1999. V. 13. P. 2098–2107.
11. Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V., Herold M., Zolotarev N., Jox T., Buxa M. K., Kirsch R., Bonchuk A., Fedotova A., et al. // *Genome Res*. 2015. V. 25. P. 89–99.
12. Kyrchanova O., Georgiev P. // *FEBS Lett*. 2014. V. 588. P. 8–14.
13. Matzat L.H., Lei E.P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1839. P. 203–214.
14. Maksimenko O., Georgiev P. // *Front. Genet*. 2014. V. 5. P. 28.
15. Sexton T., Cavalli G. // *Cell*. 2015. V. 160. P. 1049–1059.
16. Kyrchanova O., Chetverina D., Maksimenko O., Kullyev A., Georgiev P. // *Nucleic Acids Res*. 2008. V. 36. P. 7019–7028.
17. Brameier M., Krings A., MacCallum R.M. // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. P. 1159–1160.
18. Ito T., Azumano M., Uwatoko C., Itoh K., Kuwahara J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009. V. 380. P. 28–32.
19. Bruening W., Moffett P., Chia S., Heinrich G., Pelletier J. // *FEBS Lett*. 1996. V. 393. P. 41–47.
20. Rost B., Yachdav G., Liu J. // *Nucleic Acids Res*. 2004. V. 32. P. W321–326.
21. Lake C.M., Nielsen R.J., Hawley R.S. // *PLoS Genet*. 2011. V. 7. P. e1002005.

УДК 577.218

# Полногеномный анализ метилирования ДНК мононуклеарных клеток крови больных различными формами рассеянного склероза

О. Г. Кулакова<sup>1,2\*</sup>, М. Р. Кабилов<sup>3</sup>, Л. В. Данилова<sup>4,5</sup>, Е. В. Попова<sup>1</sup>, О. А. Батурина<sup>3</sup>,  
Е. Ю. Царева<sup>1,2</sup>, Н. М. Баулина<sup>1,2</sup>, И. С. Киселев<sup>1,2</sup>, А. Н. Бойко<sup>1</sup>, А. В. Фаворов<sup>4,5</sup>,  
О. О. Фаворова<sup>1,2</sup>, В. В. Власов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, Россия

<sup>2</sup>Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А, Россия

<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8, Россия

<sup>4</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3, Россия

<sup>5</sup>Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

\*E-mail: olga.koulakova@gmail.com

Поступила в редакцию 02.02.2016

Принята к печати 25.04.2016

**РЕФЕРАТ** Рассеянный склероз (РС) – это тяжелое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы с полигенным типом наследования. Помимо генетических факторов, важную роль в развитии и течении РС могут играть эпигенетические механизмы, в первую очередь метилирование ДНК, влияющее на экспрессию генов. В настоящей работе для поиска дифференциально метилированных CpG-сайтов, ассоциированных с развитием двух основных клинических форм заболевания – ремиттирующего РС (РРС) и первично-прогрессирующего РС (ППРС), впервые проведен полногеномный анализ профиля метилирования ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови больных РРС и ППРС в сравнении со здоровыми индивидами контрольной группы. Проведено также прямое сравнение профилей метилирования ДНК у пациентов с РРС и ППРС. При всех попарных сравнениях выявлены существенные различия в профилях метилирования. При иерархической кластеризации по уровню метилирования обнаруженных дифференциально метилированных сайтов (ДМС) и при визуализации данных с помощью метода главных компонент наблюдается четкое объединение образцов ДНК каждой из сравниваемых групп в отдельный кластер. У больных ППРС в сравнении со здоровыми индивидами выявлено большее число ДМС, чем у больных РРС в сравнении со здоровыми индивидами (67 против 30). Более половины всех ДМС расположены в генах, что превышает число, ожидаемое при случайном распределении ДМС среди проб. В случае РРС большая часть ДМС гипометилирована, при ППРС – гиперметилирована. В CpG-островках и соседних областях расположено 60% ДМС, выявляемых при сравнении РРС с контролем, и 79% – при сравнении ППРС с контролем. Прямое сравнение двух форм РС выявило 51 ДМС, из которых большая часть (82%) гиперметилирована при ППРС. В целом, показано, что ППРС отличается от РРС большими изменениями в паттерне метилирования ДНК. Полученные результаты свидетельствуют об участии метилирования ДНК в развитии РС. Впервые показано, что эпигенетический механизм метилирования ДНК вовлечен в формирование клинически различных форм РС – РРС и ППРС.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** метилирование ДНК, мононуклеарные клетки крови, рассеянный склероз, эпигенетика.  
**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ДМС – дифференциально метилированный сайт; МНК – мононуклеарные клетки периферической крови; РС – рассеянный склероз; РРС – ремиттирующий РС; ППРС – первично-прогрессирующий РС; ЦНС – центральная нервная система; EDSS (Expanded Disability Status Scale) – расширенная шкала оценки степени инвалидизации; HLA (human leukocyte antigen) – главный комплекс гистосовместимости.

**ВВЕДЕНИЕ**

Рассеянный склероз (РС) – это тяжелое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС) со сложным комплексом патогенетических процессов, среди которых важнейшую роль играет хроническое аутоиммунное воспаление, направленное на миелиновую оболочку нейронов и приводящее к демиелинизации, гибели олигодендроцитов, разрушению аксонов, глиозу и нейродегенерации. Этиология РС остается не выявленной. Проведенные в последние годы полногеномные исследования ясно показали, что наблюдаемый тип наследования РС, характерный для полигенных заболеваний, действительно определяется совместным вкладом множества независимо действующих или взаимодействующих полиморфных генов [1–3]. Однако если исключить из рассмотрения гены главного комплекса гистосовместимости (HLA), то каждый из аллелей риска РС, взятый отдельно, дает относительно малый эффект: отношения шансов для отдельных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) находятся, за редкими исключениями, в диапазоне 1.1–1.3 [4]. Совокупный вклад всех генетических вариантов, идентифицированных при полногеномных исследованиях, может объяснить менее 27% наследуемости [5] – проблема, получившая название «недостающей», или «потерянной» наследуемости (missing heritability). Эти наблюдения, а также низкий уровень конкордантности РС у монозиготных близнецов [6], влияние некоторых факторов внешней среды [7] и большая распространенность РС среди женщин [8] привели к предположению о том, что, помимо генетических факторов, важную роль в развитии и течении РС могут играть эпигенетические механизмы.

Эпигенетические модификации представляют собой различные функциональные изменения в геноме организма, которые влияют на экспрессию генов в различных клетках или тканях, но не связаны с изменением нуклеотидной последовательности ДНК. Один из наиболее хорошо изученных эпигенетических механизмов – метилирование ДНК, самым распространенным вариантом которого является присоединение метильной группы к цитозиновым основаниям в составе CpG-динуклеотидов в позиции С5 цитозинового кольца. Этот процесс модулирует экспрессию близлежащих генов. Хотя глобальное метилирование ДНК довольно стабильная эпигенетическая модификация, передающаяся дочерним клеткам в ходе митоза, различные факторы внешней среды могут вызывать динамические изменения эпигенома в течение жизни. Полученные в последние годы результаты свидетельствуют о том, что эпигенетические модификации могут играть важную роль в формировании риска развития аутоиммунных

и нейродегенеративных заболеваний, в частности РС [9, 10].

Сравнительный анализ метилирования отдельных генов у больных РС и у здоровых доноров выявил гипометилирование в промоторной области гена *PAD2*, кодирующего пептидиларгининдезаминазу типа II, в белом веществе мозга [11] и в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК) [12]. Гиперметилирование гена протеинтирозинфосфатазы *SHP-1* обнаружено в МНК больных РС [13]. В последние пять лет проведено несколько сравнительных исследований полногеномного профиля метилирования ДНК больных РС и здоровых индивидов. Анализ метилома проводили как в клетках крови (МНК, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитах) [6, 14–16], так и в ткани белого вещества мозга [17]. Хотя все исследования проводили на небольшом количестве образцов, в CD4+ Т-лимфоцитах наблюдали дифференциальное метилирование генов HLA класса II и некоторых других генов иммунной системы, ассоциация которых с заболеванием была показана ранее [15], а в тканях белого вещества выявлено дифференциальное метилирование генов, связанных с выживаемостью олигодендроцитов [16].

РС характеризуется выраженной клинической гетерогенностью [8]. В цитированных работах объектом эпигенетических исследований были больные с наиболее распространенной формой РС – ремиттирующим РС (РРС), для которого характерно чередование периодов обострения и ремиссии. Примерно у 10–15% больных наблюдается первично-прогрессирующий РС (ППРС), проявляющийся непрерывным нарастанием неврологического дефицита с начала заболевания. Протекает ППРС значительно тяжелее, чем РРС; уже на ранних стадиях ППРС отчетливо выражены признаки атрофии мозга. Пока не предложено какого-либо специфического лечения больных ППРС, а все известные в настоящее время иммуномодулирующие препараты и кортикостероиды, применяемые при РРС, в этом случае малоэффективны.

В настоящей работе впервые проведен полногеномный анализ профиля метилирования ДНК в МНК больных РРС и ППРС в сравнении со здоровыми индивидами контрольной группы для поиска дифференциально метилированных CpG-сайтов, ассоциированных с развитием двух основных клинических форм заболевания, а также сравнили профили метилирования ДНК у пациентов с РРС и ППРС.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ****Характеристика больных РС и контролей**

В работу включены 14 больных РРС (девять женщин и пять мужчин) и восемь больных ППРС (шесть



женщин и два мужчины) в возрасте от 29 до 58 лет. Диагноз поставлен согласно критериям МакДональда в последней версии 2010 года [18]. Средний балл по шкале инвалидизации (EDSS) у больных РС составлял  $2.32 \pm 0.82$ , у больных ППРС –  $4.29 \pm 0.39$ . Включенные в исследование больные никогда не принимали иммуномодулирующих препаратов. В контрольную группу вошли шесть женщин и двое мужчин в возрасте от 28 до 50 лет без острых или хронических неврологических заболеваний. Все они проживали в Московском регионе; оба их родителя были этническими русскими (по данным анкетирования). От всех участников получено информированное согласие на проведение генетических исследований.

### Выделение ДНК и анализ полногеномного метилирования

Образцы периферической крови больных РС (8 мл) собирали в пробирки с EDTA (Vacuette® EDTA Tubes, Greiner Bio-One). Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) выделяли с помощью центрифугирования на градиенте фиколл-гипака. Геномную ДНК выделяли с помощью набора DNA Midi Kit (Qiagen, Santa Clara, CA, США) по методике производителя. Бисульфитную конверсию геномной ДНК проводили при помощи набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research). Уровень метилирования ДНК анализировали на сканере iScan (Illumina) с использованием чипов Infinium HumanMethylation450 BeadChip [19] в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН).

### Биоинформатический анализ

Первичная обработка данных и их нормализация были выполнены с помощью специально разработанных скриптов на языке программирования R [20].

Оценку уровня метилирования каждого CpG-сайта в образце проводили с помощью вычисления показателя бета (beta-value), который представляет собой отношение интенсивности сигнала метилирования данной пробы к общей интенсивности этой пробы (суммы интенсивностей метилированного и неметилированного сигнала). Значение бета варьирует от 0 (неметилированная проба) до 1 (полностью метилированная проба). Вычисление значений показателя бета для каждой пробы в каждом образце проводили с помощью пакета methylumi [21].

Из последующего анализа были исключены пробы, содержащие однонуклеотидный полиморфизм на расстоянии до 10 п.н. от исследуемого CpG-сайта, и пробы, перекрывание которых с повторяющимися последовательностями ДНК обнаружено на расстоянии до 15 п.н. от исследуемого CpG-сайта. Исключены

также пробы, у которых величина  $p$  значимости обнаружения сигнала (detection  $p$ -value) была больше 0.05 более чем в 5% образцов, а также пробы, расположенные в X и Y хромосомах. В итоге, из исходных примерно 485 000 CpG-сайтов анализировали 384 138.

CpG-сайт считали дифференциально метилированным (ДМС), если различия между уровнями его метилирования в двух группах удовлетворяли двум условиям: абсолютные величины разности средних по группам значений показателя бета должны быть  $> 0.1$ , а соответствующая величина  $p < 0.01$ . Локализацию индивидуального CpG-сайта в CpG-островке определяли с использованием аннотации UCSC в hg19; соседние области (shore) локализованы в 2 т.п.н. от CpG-островков, отдаленные области (shelf) – в 2 т.п.н. от соседних областей (shore) [19]. Для оценки величины  $p$  использовали  $t$ -тест Стьюдента, модифицированный по эмпирическому методу Байеса и предоставляемый пакетом limma [22] в программном обеспечении R. Малый размер выборки не позволял вводить поправки на число гипотез (проб).

Визуализацию сигналов ДМС с помощью метода главных компонент (principal component analysis, PCA) и построение карт интенсивности сигналов (heatmap) осуществляли с использованием стандартных методов среды R и специально разработанных скриптов на языке программирования R [22].

### РЕЗУЛЬТАТЫ

С целью изучения возможности вовлечения эпигенетического механизма метилирования ДНК в развитие разных форм РС мы провели полногеномное профилирование сайтов метилирования ДНК из МНК периферической крови в репрезентативных группах больных РС, больных ППРС и здоровых доноров (контроль) и сравнили образцы больных РС с контрольными образцами, образцы больных ППРС с контрольными образцами, а также образцы больных РС и ППРС между собой.

Карты интенсивности сигналов ДМС, выявленных при этих трех типах сравнения, представлены на рис. 1А–В. Всего обнаружено 136 ДМС, наблюдавшихся при одном или более попарном сравнении. Сравнительный анализ метилирования ДНК при всех трех попарных сравнениях выявил существенные различия в профилях метилирования. При иерархической кластеризации по уровню метилирования 136 ДМС наблюдается четкое объединение образцов ДНК больных каждой из сравниваемых групп в отдельный кластер. Визуальное сравнение интенсивности сигналов ДМС (соотношение синего и желтого цветов) указывает на более высокий уровень метилирования ДНК больных ППРС, чем в контроле и у больных РС.

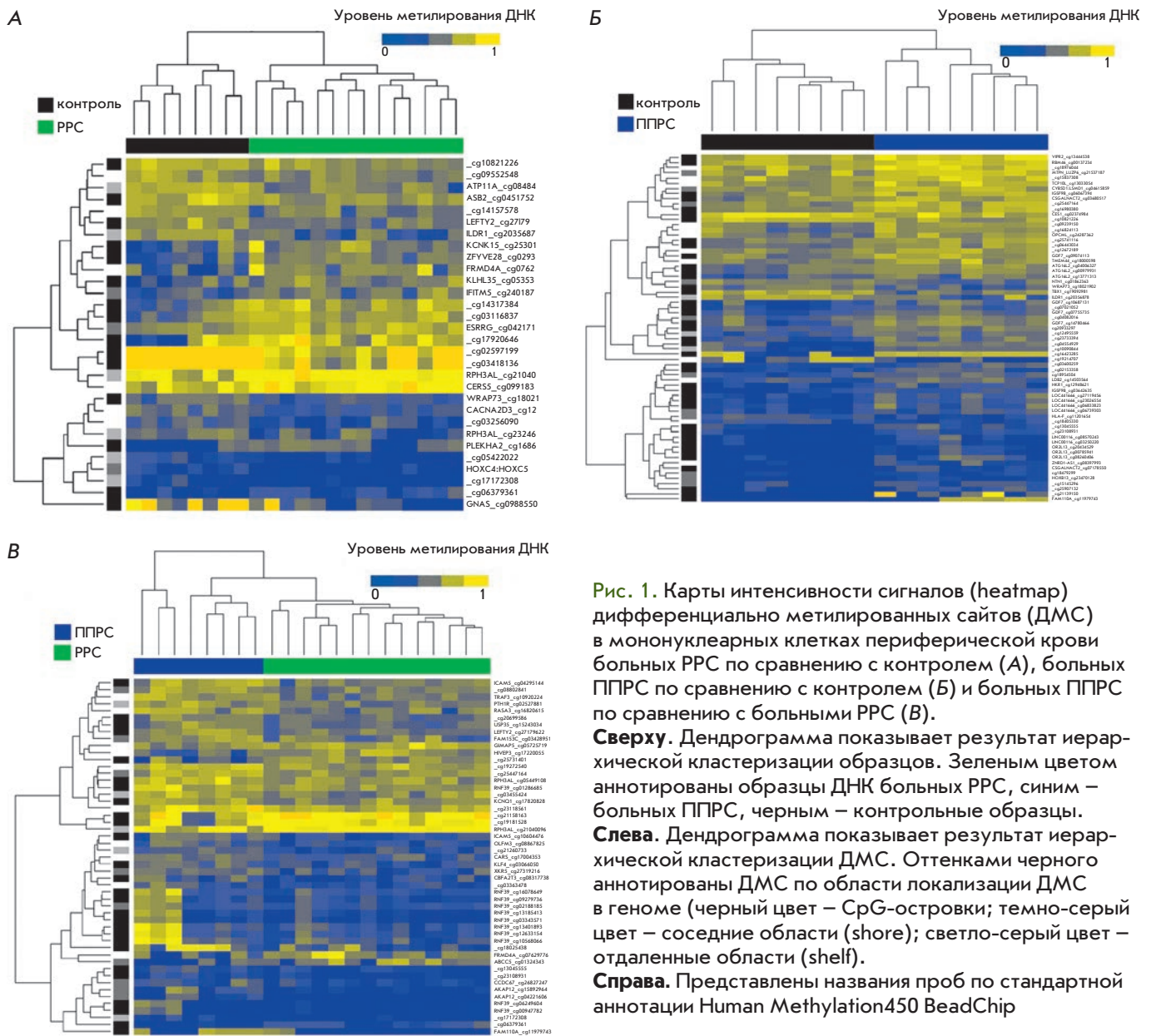


Рис. 1. Карты интенсивности сигналов (heatmap) дифференциально метилированных сайтов (ДМС) в мононуклеарных клетках периферической крови больных PPC по сравнению с контролем (А), больных ППРС по сравнению с контролем (Б) и больных ППРС по сравнению с больными PPC (В).

**Сверху.** Дендрограмма показывает результат иерархической кластеризации образцов. Зеленым цветом аннотированы образцы ДНК больных PPC, синим – больных ППРС, черным – контрольные образцы. **Слева.** Дендрограмма показывает результат иерархической кластеризации ДМС. Оттенками черного аннотированы ДМС по области локализации ДМС в геноме (черный цвет – CpG-островки; темно-серый цвет – соседние области (shore); светло-серый цвет – отдаленные области (shelf)). **Справа.** Представлены названия проб по стандартной аннотации Human Methylation450 BeadChip

Проведена визуализация данных для этих ДМС с помощью метода главных компонент (рис. 2). Видно, что включенные в исследование образцы хорошо дискриминируются в трехмерном пространстве первых трех главных компонент в три группы, и эти группы соответствуют трем фенотипам: PPC, ППРС и отсутствие этих заболеваний.

Характеристика найденных ДМС представлена в табл. 1. При сравнении больных PPC со здоровыми донорами (контроль) выявлены различия в уровнях метилирования 30 ДМС, больных ППРС с контрольной группой – 67 ДМС, а при сравнении двух форм PC обнаружено различие в уровне метилирования

51 сайта. В случае PPC большая часть проб гипометилирована в сравнении с контролем (из 30 ДМС гиперметилированы только 43%). Напротив, у больных ППРС число гиперметилированных проб повышено как по сравнению с контролем (86% проб гиперметилированы), так и по сравнению с больными PPC (82% проб гиперметилированы).

Более половины ДМС расположены в генах: 18 из 30 при сравнении PPC vs контроль, 38 из 67 – при ППРС vs контроль, 35 из 51 при сравнении ППРС vs PPC (табл. 1). Поскольку в платформе HumanMethylation450 генные пробы составляют примерно треть всех проб [19], можно констатировать

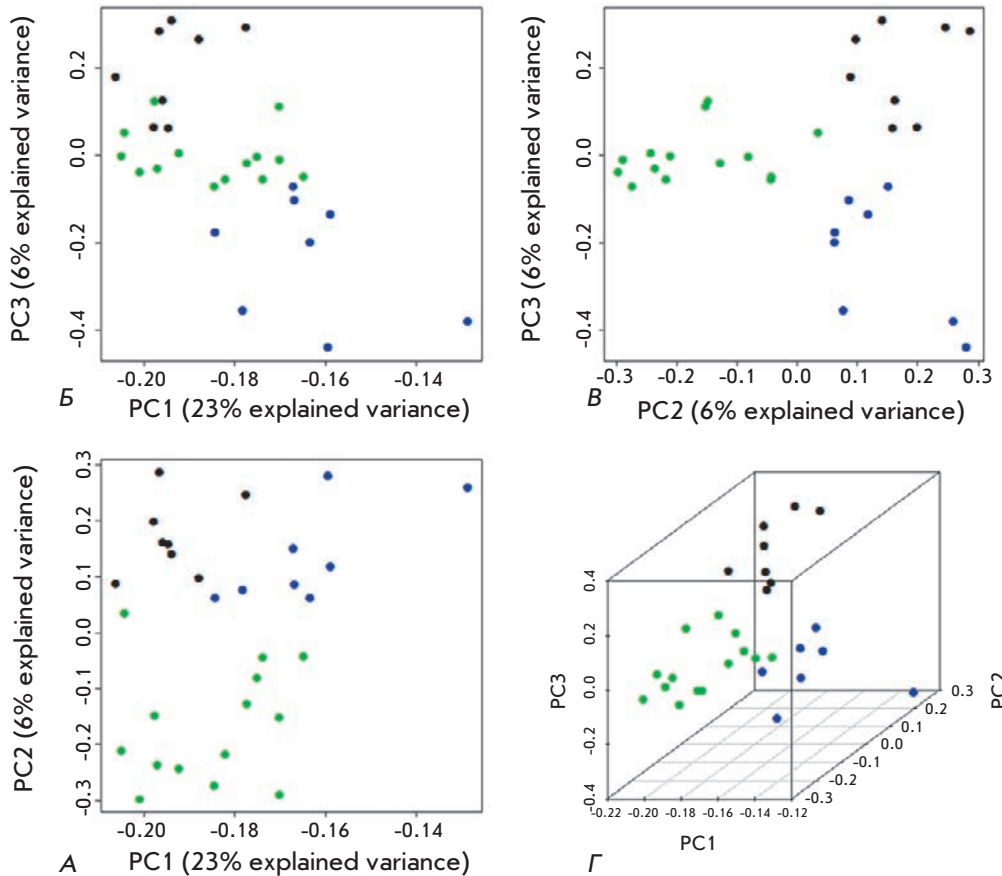


Рис. 2. Двумерная (2D) (А–В) и трехмерная (3D) (Г) кластеризация образцов в пространстве главных компонент (principal component analysis, PCA) дифференциально метилированных сайтов. Зеленые точки – образцы больных РРС, синие – образцы больных ППРС, черные – образцы контрольных индивидов. По осям: главные компоненты PC1, PC2, PC3, в скобках для каждой главной компоненты указана объясняемая ею доля вариабельности данных

определенное превышение числа наблюдаемых внутригенных ДМС над ожидаемым при случайном распределении ДМС среди проб. Некоторые гены содержат по несколько ДМС; поэтому число генов с ДМС меньше – 17, 25 и 22 соответственно. Список этих генов (отдельно белоккодирующих, которых большинство, и белокнекодирующих) также представлен в табл. 1. 53% генов содержат ДМС с более высоким уровнем метилирования в первой группе при сравнении РРС vs контроль, 76% – при сравнении ППРС vs контроль и 86% – при сравнении ППРС vs РРС. В гене *RPH3AL* обнаружены два ДМС, из которых один характеризуется повышенным, а второй – пониженным уровнем метилирования при сравнении больных РРС со здоровыми индивидами и при сравнении больных ППРС с РРС.

Согласно принятому в работе критерию, CpG-сайт считается ДМС при 10% разнице в средних уровнях его метилирования в сравниваемых группах (абсолютные величины разности средних по группам значений показателя бета должны быть > 0.1). Некоторые ДМС характеризовались более суще-

ственными различиями в уровне метилирования. При сравнении групп больных РРС и здоровых индивидов абсолютное значение разности средних значений показателя бета для пяти сайтов изменялось более чем на 20%. Из этих сайтов три находятся в генах: средний уровень метилирования сайтов *cg07629776 (FRMD4A)* и *cg16866567 (PLEKHA2)* в группе больных РРС повышен на 21.5 и 25.1% соответственно, а сайта *cg09885502 (GNAS)* – понижен на 43.5% в группе больных РРС по сравнению с контролем. При сравнении больных ППРС со здоровыми индивидами для шести сайтов из 67 абсолютное значение разности средних значений показателя бета отличалось между группами более чем на 20%. При этом наибольшая разница в уровне метилирования, а именно, его повышение на 41%, наблюдалась для сайта *cg11979743* в гене *FAM110A*, и это единственный из шести сайтов, расположенный в гене. При прямом сравнении ППРС и РРС обнаружено семь ДМС, уровень метилирования которых изменялся более чем на 20% (диапазон 20.1–31.9%). Из них пять ДМС находятся в трех генах: средний

Таблица 1. Характеристика дифференциально метилированных сайтов (ДМС), выявленных при сравнительном анализе метилирования ДНК из МНК больных разными формами РС и здоровых индивидов (контроль)

Сравниваемые группы	PPC vs контроль	ПППС vs контроль	ПППС vs PPC
Количество ДМС	30	67	51
Из них ДМС с более высоким уровнем метилирования в первой из сравниваемых групп	13 (43%)	58 (86%)	42 (82%)
Количество ДМС в генах	18	38	35
Количество генов, содержащих ДМС	17	25	22
Из них генов, содержащих ДМС с более высоким уровнем метилирования в первой из сравниваемых групп	9 (53%)	19 (76%)	19 (86%)
Белоккодирующие гены, содержащие ДМС (число ДМС в гене) <sup>#</sup>	ASB2 ATP11A CACNA2D3 CERS5 ESRRG FRMD4A GNAS HOXC4-HOXC6 IFITM5 ILDR1 KCNK15 KLHL35 LEFTY2 PLEKHA2 RPH3AL (2)* WRAP73 ZFYVE28	ATG16L2 (3) CES1 CSGALNACT2 (2) CYB5D1;LSMD1 FAM110A GDF7 (4) HKR1 HLA-F HOXB13 IGSF9B (2) ILDR1 LDB2 MTPN;LUZP6 NTN1 OPCML OR2L13 (3) RBM46 TBX1 TCP10L TMEM44 VIPR2 WRAP73	ABCC5 AKAP12 (2) CARS CBFA2T3 CCDC67 FAM110A FRMD4A GIMAP5 HIVEP3 ICAM5 (2) KCNQ1 KLF4 LEFTY2 OLFM3 PTH1R RASA3 RNF39 (11) RPH3AL (2)* TRAF3 USP35 XKR5
Белокнекодирующие гены, содержащие ДМС (число ДМС в гене) <sup>#</sup>	-	LINC00116 (2) ZNRD1-AS1 LOC441666 (4)	FAM153C

Примечание. Жирным шрифтом отмечены гены, в которых обнаружены ДМС с повышенным уровнем метилирования в первой из сравниваемых групп.

\*В гене *RPH3AL* выявлены два ДМС, один с повышенным уровнем метилирования, другой – с пониженным.

<sup>#</sup> Указано число ДМС, расположенных в каждом гене, если их более одного.

Таблица 2. Локализация дифференциально метилированных сайтов (ДМС), выявленных при сравнительном анализе метилирования ДНК из МНК больных разными формами РС и здоровых индивидов (контроль), относительно CpG-островков генома человека

Локализация ДМС	Число ДМС при различных сравнениях групп индивидов		
	PPC vs контроль	ПППС vs контроль	ПППС vs PPC
Любая (общее число ДМС)	30 (100%)	67 (100%)	51 (100%)
В CpG-островках (island)	15 (50%)	42 (63%)	27 (53%)
В соседних областях («берег», shore)	3 (10%)	11 (16%)	9 (18%)
В отдаленных областях («шельф», shelf)	6 (20%)	2 (3%)	5 (10%)
В прочих областях («море», sea)	6 (20%)	12 (18%)	10 (19%)

Примечание. Локализацию индивидуального CpG-сайта в CpG-островке (island) определяли с использованием UCSC-аннотации в hg19; соседние области (shore) локализованы в 2 т.п.н. от CpG-островков; отдаленные области (shelf) – в 2 т.п.н. от соседних областей (shore); области, не относящиеся к упомянутым трем категориям, обозначены как «sea».



уровень метилирования сайта cg11979743 (*FAM110A*) повышен на 31.9%, а cg01324343 (*ABCC5*) – понижен на 21.8% в группе больных ППРС по сравнению с больными РРС. В третьем гене, *RNF39*, найдено 11 ДМС, средний уровень метилирования трех из них (cg13401893, cg12633154, cg10568066) повышен на 20.1–21.0% в группе больных ППРС.

Анализ локализации выявленных ДМС показал, что более половины из них находятся в CpG-островках и близлежащих зонах (табл. 2; см. также рис. 1). Это распределение примерно соответствует доле таких проб среди всех проб платформы [19]. Сравнение больных РРС с контролем показывает, что 50% ДМС расположено в CpG-островках и 10% – в соседних с ними областях, в случае больных ППРС доля таких ДМС возрастает до 63 и 16% соответственно, а при сравнении ППРС с РРС – 53 и 18% (табл. 2). Таким образом, метилирование ДНК при ППРС затрагивает функционально более значимые области генома.

Совокупность полученных данных складывается в целостную картину: ППРС отличается от РРС большими изменениями в паттерне метилирования ДНК. Действительно, при ППРС большее число ДМС выявляется в геноме и его (известной) кодирующей части, причем значительно больше половины ДМС и в геноме, и в генах гиперметилированы. Кроме того, при ППРС большее число ДМС, выявляемых при сравнении с контролем, локализовано в CpG-островках и соседних областях (79%), тогда как при РРС их доля составляет 60%.

## ОБСУЖДЕНИЕ

С целью установить, участвуют ли эпигенетические механизмы в формировании клинически различных форм РС, мы впервые провели полногеномный анализ метилирования ДНК в МНК больных двумя формами РС – РРС и ППРС – и сравнили профили их метилирования со здоровыми индивидами и между собой. Выявлены существенные различия в профилях метилирования ДНК: при попарном сравнении этих трех групп (14 больных РРС, восемь больных ППРС, восемь индивидов контрольной группы) обнаружено 136 ДМС, характеризующихся различием средних показателей бета  $> 0.1$  и величиной  $p < 0.01$  по *t*-тесту Стьюдента. При трехмерной визуализации этих ДМС с помощью метода главных компонент образцы ДНК больных каждой из сравниваемых групп объединяются в отдельный кластер, что свидетельствует об устойчивом вовлечении дифференциального спектра метилирования ДНК в развитие разных форм РС.

Анализ спектра ДМС показал, что ППРС, более агрессивная, чем РРС, клиническая форма РС, от-

личается от РРС большими изменениями в спектре метилирования ДНК при сравнении с нормой. При этом среди ДМС количество сайтов с более высоким уровнем метилирования ДНК у больных ППРС выше, чем в контрольной группе и при РРС. В то же время сравнение РРС с группой контроля выявляет гипометилирование более половины ДМС. Сравнить полученные результаты с опубликованными данными мы можем только в случае РРС. Выявлено значимое гиперметилирование ДНК CD8+ Т-лимфоцитов у больных РРС [14], в то время как в CD4+ Т-лимфоцитах и в цельной крови не наблюдали изменений общего уровня метилирования ДНК [14] либо отмечали его небольшое уменьшение [15].

Анализ локализации дифференциально метилированных при РС сайтов показал, что более половины из них расположены или в CpG-островках, или во фланкирующих зонах (в диапазоне 2 т.п.н. от CpG-островка, так называемый «берег») (см. табл. 2), что с высокой вероятностью указывает на функциональное значение наблюдаемого метилирования ДНК, которое, как известно, заключается в блокировании экспрессии ряда генов.

Мы провели поиск информации о функциях обнаруженных нами ДМС-содержащих генов, используя базу данных генов человека GeneCards [23], ресурс Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) Gene [24] и ряд других источников. Сравнение групп больных РРС и здоровых индивидов выявляет различия в метилировании генов, которые кодируют белки, участвующие в развитии иммунного ответа (*ASB2*, *LEFTY2*, *PLEKHA2*), в метаболизме липидов (*ILDR1*, *CERS5*), везикулярном транспорте (*RPH3AL*, *ZFYVE28*) и работе ионных каналов (*ATP11A*, *CACNA2D3*, *KCNK15*), а также в регуляции экспрессии многих генов (*ESRRG*, *HOXC4–HOXC6*). Среди них заслуживает отдельного внимания ген *ESRRG*, кодирующий эстроген-подобный рецептор гамма. Этот орфанный рецептор относится к семейству ядерных рецепторов и работает как активатор транскрипции ряда генов, в том числе гена основной ДНК-метилтрансферазы соматических клеток млекопитающих – ДНК-метилтрансферазы 1 (*DNMT1*), за счет прямого связывания с промотором [25] и тем самым регулирует уровень метилирования ДНК в клетке.

Данные о генах, дифференциально метилированных в МНК больных РРС по сравнению со здоровыми индивидами, полученные в нашей работе, не совпадают с результатами других исследований [6, 14–17]. Это не вызывает особого удивления, поскольку к настоящему времени сравнительный анализ метилирования ДНК больных РРС и здоровых

индивидов проводили только в клетках цельной крови, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитах [6, 14–16] и в тканях белого вещества мозга [17] и также не наблюдали совпадения результатов для клеток и тканей разного типа. Несовпадение результатов может быть связано не только с использованием разных популяций клеток, но и с разными критериями выбора ДМС.

Анализ функций генов, дифференциально метилированных у больных ПППС по сравнению со здоровыми индивидами, показал, что среди них есть группа генов, продукты которых в той или иной степени участвуют в развитии и дифференцировке нервной системы (*GDF7*, *MTPN*, *VIPR2*, *NTN1*, *TBX1*), в функционировании опиоидных рецепторов (*OPCML*) и в метаболизме различных ксенобиотиков, включая кокаин и героин (*CES1*). Метилирование генов этой функциональной направленности не было выявлено при сравнении больных РС и здоровых индивидов. При ПППС дифференциальное метилирование затронуло также гены, участвующие в развитии иммунного ответа (*HLA-F*, *MTPN*, *VIPR2*), в регуляции экспрессии многих генов (*HKR1*, *HOXB13*, *LDB2*, *TCP10L*, *TBX1*), в процессах аутофагии (*ATG16L2*), гемостаза (*FAM110A*) и в функционировании внеклеточного матрикса (*CSGALNACT2*).

Среди дифференциально метилированных генов, выявленных при сравнении каждой из форм РС с контролем, обнаружено совпадение всего двух генов – *ILDR1* и *WRAP73(WDR8)*, причем и у больных РС, и у больных ПППС уровень метилирования ДНК был ниже, чем у здоровых индивидов. Точное функциональное значение продуктов каждого из этих генов до конца не выяснено, однако активность рецептора *ILDR1*, по крайней мере частично, связывают с метаболизмом липидов [26], а содержащий консервативные WD-повторы белок *WRAP73* может формировать мультимерные комплексы с другими белками, участвуя в митозе, передаче сигнала в клетке [27] и в формировании ресничек [28].

В нашей работе впервые выявлены гены, метилирование которых отличается у больных двумя основ-

ными формами РС. Продукты этих генов участвуют в развитии и функционировании клеток иммунной системы (*HIVEP3*, *GIMAP5*, *TRAF3*), в регуляции экспрессии многих генов (*AKAP12*, *RASA3*, *CBFA2T3*), в процессах деградации (*USP35*), в работе эндокринной системы (*PTH1R*). Среди них заслуживают отдельного внимания два гена. Так, ген *ICAM5* кодирует дендрит-специфичную молекулу адгезии суперсемейства иммуноглобулинов, которая в ЦНС участвует во взаимодействии нервных клеток друг с другом и с клетками иммунной системы [29]. Из 35 ДМС, обнаруженных при сравнении ПППС vs РС и расположенных в генах, 11 были локализованы в гене *RNF39* и характеризовались более высоким уровнем метилирования ДНК при ПППС. У трех из этих ДМС разница в уровнях метилирования превышала 20%. Ген *RNF39* расположен в области генов HLA класса I. Функция *RNF39* пока не выяснена, однако показана ассоциация полиморфных вариантов этого гена с РС [30] и некоторыми другими аутоиммунными заболеваниями [31]. Гиперметилирование этого гена в CD4+ Т-лимфоцитах выявлено также у больных системной красной волчанкой [32].

Результаты полногеномного анализа профилей метилирования ДНК в МНК больных РС, полученные в нашей работе, свидетельствуют об участии метилирования ДНК – одного из основных способов передачи эпигенетической информации у млекопитающих – в развитии РС. Впервые показано, что эпигенетический механизм метилирования ДНК вовлечен в формирование клинически различных форм РС – РС и ПППС, причем в случае ПППС метилирование, судя по всему, приводит к подавлению экспрессии большего числа генов. ●

*Работа поддержана грантами РФФИ № 13-04-40279-Н (ЛД, АФ), 13-04-40280-Н (МК, ОБ, ВВ) и 13-04-40281-Н (ЕП, НБ, АБ) в рамках комплексного проекта 13-00-40277-К и грантом РНФ № 14-14-00605 (ОК, ЕЦ, ИК).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gourraud P.A., Harbo H.F., Hauser S.L., Baranzini S.E. // *Immunol. Rev.* 2012. V. 248. P. 87–103.
- Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Бойко А.Н. // *Генетика.* 2010. Т. 46. С. 302–313.
- Lvovs D., Фаворова О.О., Фаворов А.В. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 3. С. 62–75.
- Bashinskaya V.V., Kulakova O.G., Boyko A.N., Favorov A.V., Favorova O.O. // *Hum. Genet.* 2015. V. 134. P. 1143–1162.
- Lill C.M. // *Front. Neurol.* 2014. V. 5. P. 130.
- Baranzini S.E., Mudge J., van Velkinburgh J.C., Khankhanian P., Khrebtukova I., Miller N.A., Zhang L., Farmer A.D., Bell C.J., Kim R.W., et al. // *Nature.* 2010. V. 464. P. 1351–1356.
- O’Gorman C., Lucas R., Taylor B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 11718–11752.
- Бойко А.Н., Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Гусев Е.И. // *Рас-сеянный склероз / Под ред. Гусева Е.И. и др. М.: Реал Тайм, 2011. С. 7–43.*
- Landgrave-Gomez J., Mercado-Gomez O., Guevara-Guzman R. // *Front. Cell Neurosci.* 2015. V. 9. P. 58.
- Meda F., Folci M., Baccarelli A., Selmi C. // *Cell Mol. Immunol.* 2011. V. 8. P. 226–236.
- Mastronardi F.G., Noor A., Wood D.D., Paton T., Moscarello M.A. // *J. Neurosci. Res.* 2007. V. 85. P. 2006–2016.
- Calabrese R., Zampieri M., Mechelli R., Annibali V., Guastafierro T., Ciccarone F., Coarelli G., Umeton R., Salvetti M., Caiafa P. // *Mult. Scler.* 2012. V. 18. P. 299–304.

13. Kumagai C., Kalman B., Middleton F.A., Vyshkina T., Massa P.T. // *J. Neuroimmunol.* 2012. V. 246. P. 51–57.
14. Bos S.D., Page C.M., Andreassen B.K., Elboudwarej E., Gustavsen M.W., Briggs F., Quach H., Leikfoss I.S., Bjolgerud A., Berge T., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0117403.
15. Graves M., Benton M., Lea R., Boyle M., Tajouri L., Macartney-Coxson D., Scott R., Lechner-Scott J. // *Mult. Scler.* 2013. V. 20. P. 1033–1041.
16. Maltby V.E., Graves M.C., Lea R.A., Benton M.C., Sanders K.A., Tajouri L., Scott R.J., Lechner-Scott J. // *Clin. Epigenetics.* 2015. V. 7. P. 118.
17. Huynh J.L., Garg P., Thin T.H., Yoo S., Dutta R., Trapp B.D., Haroutunian V., Zhu J., Donovan M.J., Sharp A.J., et al. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. P. 121–130.
18. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., et al. // *Ann. Neurol.* 2011. V. 69. P. 292–302.
19. Bibikova M., Barnes B., Tsan C., Ho V., Klotzle B., Le J.M., Delano D., Zhang L., Schroth G.P., Gunderson K.L., et al. // *Genomics.* 2011. V. 98. P. 288–295.
20. <http://www.R-project.org>
21. <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/methylumi.html>
22. Smyth G.K. // *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor* / Ed. R. Gentleman V.C., etc. New York: Springer, 2005. P. 397–420.
23. <http://www.genecards.org>
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
25. Zhang Y., Wang L. // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. P. 1269–1275.
26. Chandra R., Wang Y., Shahid R.A., Vigna S.R., Freedman N.J., Liddle R.A. // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. P. 3343–3352.
27. Shen K.F., Osmani S.A. // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. P. 3842–3856.
28. Kurtulmus B., Wang W., Ruppert T., Neuner A., Cerikan B., Viol L., Sanchez R.D., Gruss O.J., Pereira G. // *J. Cell Sci.* 2015. V. 129. P. 621–636.
29. Tian L., Rauvala H., Gahmberg C.G. // *Trends Immunol.* 2009. V. 30. P. 91–99.
30. Cree B.A., Rioux J.D., McCauley J.L., Gourraud P.A., Goyette P., McElroy J., De Jager P., Santaniello A., Vyse T.J., Gregersen P.K., et al. // *PLoS One* 2010. V. 5. P. e11296.
31. Kurata R., Nakaoka H., Tajima A., Hosomichi K., Shiina T., Meguro A., Mizuki N., Ohono S., Inoue I., Inoko H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 401. P. 533–537.
32. Renauer P., Coit P., Jeffries M.A., Merrill J.T., McCune W.J., Maksimowicz-McKinnon K., Sawalha A.H. // *Lupus Sci. Med.* 2015. V. 2. P. e000101.

УДК 577.175.82

# Влияние дофамина, секретлируемого мозгом в общую систему циркуляции, на синтез пролактина гипофизом в онтогенезе

Ю. О. Никишина<sup>1</sup>, А. Я. Сапронова<sup>1\*</sup>, М. В. Угрюмов<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26<sup>2</sup>Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000, Москва, Мясницкая ул., 20

\*E-mail: anna\_sapronova@mail.ru; mugrumov@mail.ru

Поступила в редакцию 09.12.2015

Принята к печати 14.04.2016

**РЕФЕРАТ** Исследование направлено на изучение эндокринной функции мозга в процессе развития организма. Ранее в нашей лаборатории было показано, что источником дофамина в общей системе циркуляции у крыс до формирования гематоэнцефалического барьера является головной мозг. В представленной работе получены прямые доказательства того, что дофамин, секретлируемый мозгом непосредственно в общую систему циркуляции в этот период онтогенеза, ингибирует секрецию пролактина лактотрофами гипофиза. Полученные результаты создают основу для принципиально нового понимания роли мозга в нейроэндокринной регуляции развития и функционирования периферических органов-мишеней, в данном случае – гипофиза.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** гематоэнцефалический барьер, гипофиз, дофамин, мозг, онтогенез, пролактин.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; 6-ГДА – 6-гидроксидофамин; ДА – дофамин; ДАА – декарбоксилаза ароматических аминокислот; ПРЛ – пролактин; ТГ – тирозингидроксилаза; L-ДОФА – L-диоксифенилаланин.

## ВВЕДЕНИЕ

У взрослых животных головной мозг и особенно гипоталамус являются центральным звеном системы нейроэндокринной регуляции важнейших функций и поддержания постоянства внутренней среды организма. Особое внимание привлекают формирование и функционирование нейроэндокринной системы регуляции в онтогенезе, поскольку в процессе развития гипоталамические нейроромоны и гормоны эндокринных желез контролируют не столько функциональную активность органов-мишеней, сколько их развитие. В последнем случае действие этих сигнальных молекул носит необратимый (импринтинговый, морфогенетический) характер [1–3]. Согласно сложившейся к концу 1980-х годов концепции, до своего полного созревания, т.е. до формирования межнейронных синаптических связей и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), мозг не участвует в нейроэндокринной регуляции периферических органов. Только после окончательной дифференцировки нейронов и установления синаптической нейротрансмиссии он берет под свой контроль гипофиз, а через него и все остальные эндокринные железы [4, 5].

В последние годы представления о роли мозга в нейроэндокринной регуляции в онтогенезе претерпели существенные изменения. При анализе опубликованных данных и результатов собственных исследований в нашей лаборатории было замечено, что нейроны начинают синтезировать и выделять сигнальные молекулы задолго до формирования межнейронных синаптических связей и ГЭБ [6–8]. Это наблюдение позволило сформулировать гипотезу, согласно которой до формирования ГЭБ мозг функционирует как эндокринный орган, выделяя в общую систему циркуляции физиологически активные вещества и влияя таким образом на развитие и функционирование периферических органов и клеток-мишеней [8].

В данной гипотезе можно выделить два основных положения:

1) мозг является источником сигнальных молекул в общей системе циркуляции с момента образования нейронов и до окончательного формирования синаптических связей и закрытия ГЭБ;

2) сигнальные молекулы, секретлируемые мозгом в общую систему циркуляции в данный период онто-



генеза, способны оказывать прямое парааденогипофизарное эндокринное влияние на периферические органы-мишени.

Первое положение гипотезы нашло подтверждение в работах нашей лаборатории. На модели обратимого специфического ингибирования синтеза катехоламинов в мозге неонатальных животных [9] получены прямые доказательства того, что в раннем постнатальном периоде, еще до формирования ГЭБ, мозг является источником дофамина в общей системе циркуляции.

В ходе проверки справедливости второго положения в экспериментах *in vitro* и *ex vivo* в нашей лаборатории получены данные, согласно которым дофамин в той концентрации, в которой он находится в общей системе циркуляции, оказывает ингибирующее влияние на выделение пролактина лактотрофами гипофиза [10].

У взрослых животных нейроэндокринная регуляция осуществляется в основном через гипоталамо-гипофизарную портальную систему циркуляции. В перинатальном периоде развития крыс в отсутствие ГЭБ теоретически регуляция может осуществляться как через портальную, так и через общую систему циркуляции. Однако до сих пор не получены данные о вкладе каждого из путей в нейроэндокринную регуляцию функционирования и развития периферических органов. Ответ на данный вопрос принципиально важен не только для доказательства эндокринной функции мозга, но и для понимания развития и функционирования системы нейроэндокринной регуляции в онтогенезе.

В связи с этим цель нашей работы состояла в изучении влияния дофамина, секретлируемого мозгом в общую систему циркуляции, на синтез пролактина гипофизом в онтогенезе. На модели хронического специфического выключения синтеза дофамина в мозге неонатальных крыс с помощью нейротоксина 6-гидроксидофамина мы попытались оценить:

1) морфофункциональное состояние дофаминергических нейронов тубероинфундибулярной системы мозга;

2) эндокринное влияние дофамина мозгового происхождения через общую систему циркуляции на синтез и выделение пролактина лактотрофами гипофиза.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Животные, эксперименты

В работе использовали 90 самцов крыс Вистар на второй день постнатального развития (П2). Для получения модели хронического специфического выключения синтеза ДА в мозге крысам в боковые желудочки

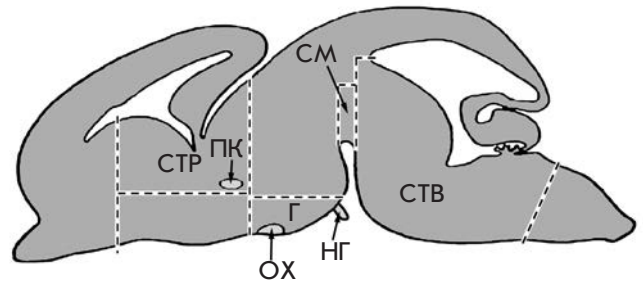


Рис. 1. Схема выделения структур мозга после введения нейротоксина. СТР – стриатум, ПК – передняя комиссура, Г – медиобазальный гипоталамус, НГ – ножка гипофиза, СМ – средний мозг, СТВ – ствол мозга, ОХ – оптическая хиазма

мозга стереотаксически вводили 100 мкг 6-гидроксидофамина (6-ГДА, Sigma, США) – специфический нейротоксин катехоламинергических нейронов, а контрольным животным – 0.9% NaCl [11]. Для того чтобы вызвать избирательную гибель только дофаминергических нейронов и сохранить норадренергические, за 30 мин до введения 6-ГДА подкожно вводили 25 мг/кг десметилимипромина (ДМИ) – ингибитор обратного захвата норадреналина и, следовательно, 6-ГДА в норадренергические нейроны. Через 72 ч после инъекции 6-ГДА у крыс под наркозом (хлоралгидрат, 400 мг/кг, Sigma, США) выделяли отделы мозга согласно рис. 1. Образцы замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  до проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД).

Для определения активности тирозингидроксилазы (ТГ) через 72 ч после стереотаксической инъекции 6-ГДА и за 30 мин до получения образцов всем животным (опытным и контрольным) внутрибрюшинно вводили ингибитор декарбоксилазы ароматических аминокислот (ДАА) – 3-дигидроксibenзилгидразин (NSD-1015, Sigma, США) в концентрации 100 мг/кг веса тела [12]. Затем под наркозом выделяли медиобазальный гипоталамус и остальную часть мозга. Активность ТГ в собранных образцах оценивали по накоплению *L*-диоксифенилаланина (*L*-ДОФА), измеренному с помощью ВЭЖХ-ЭД.

Количество моно- и биферментных нейронов в аркуатном ядре крыс оценивали иммуногистохимическим методом. С этой целью через 72 ч после стереотаксической инъекции 6-ГДА проводили транскардиальную перфузию сначала 0.02 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7.2–7.4) в течение 10–15 мин, а затем охлажденным (до  $+4^{\circ}\text{C}$ ) 4% параформальдегидом на 0.2 М фосфатном буфере (pH 7.3) в течение 15 мин. Затем выделяли мозг и проводили

постфиксацию в 4% параформальдегиде в течение 12 ч при +4°C. После этого мозг промывали в 0.02 М ФСБ (3 раза по 15 мин), инкубировали в 20% сахарозе в течение 24 ч при +4°C и замораживали в гексане при -40°C. До проведения иммуногистохимического анализа образцы хранили в кельвинаторе при -70°C.

У животных под наркозом собирали кровь из сердца, центрифугировали (7000 об/мин, 20 мин, +4°C), а затем в плазме крови иммуноферментным методом определяли пролактин (ПРЛ).

При определении ПРЛ в ткани гипофиза гормон предварительно экстрагировали в 0.05 М карбонатно-бикарбонатном буфере [10].

Содержание мРНК ПРЛ определяли в передней доле гипофиза, выделенной после стереотаксических инъекций. Каждая проба содержала материал от трех крыс. До выделения РНК образцы хранили в кельвинаторе при -70°C.

### Высокоэффективная жидкостная хроматография

Содержание катехоламинов и метаболитов в ткани мозга определяли при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ с электрохимической детекцией [11].

### Иммуногистохимия

ТГ и ДАА выявляли на срезах медиобазального гипоталамуса толщиной 20 мкм, приготовленных на криостате и монтированных на стекла. Срезы последовательно инкубировали с: (а) 3% бычьим сывороточным альбумином (Sigma, США) и 0.3% Triton X-100 (Sigma, США) на 0.02 М ФСБ в течение 30 мин при +20°C; (б) 1% лаурилсульфатом натрия (SDS, Sigma, США) на 0.02 М ФСБ в течение 3 мин при +20°C; (в) поликлональными антителами овцы к ТГ (1 : 700) (Chemicon, США) и поликлональными антителами кролика к ДАА (1 : 300) (Abscam, США) на 0.02 М ФСБ, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин и 0.1% Triton X-100 в течение 24 ч при +20°C; (г) с FITC-конъюгированными антителами осла против гамма-глобулинов овцы (1 : 40) (FITC antisheep, Sigma, США) и Cy3-конъюгированными антителами козы против гамма-глобулинов кролика (1 : 500) (CY3 antirabbit, Sigma, США) на 0.02 М ФСБ в течение 2 ч при +20°C. После каждой инкубации, кроме последней, срезы отмывали в 0.02 М ФСБ в течение 15 мин. После последней инкубации срезы промывали в 0.02 М ФСБ в течение 1 ч, а затем заключали в гидрофильную среду Mowiol (Calbiochem, Германия).

Срезы гипоталамуса после двойного мечения на ТГ и ДАА исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Observer Z1, оснащенного фильтрами для FITC (для ТГ), Cy3 (для ДАА), с использованием программного обеспечения AxioVision 4.8.

### Иммуноферментный анализ

Содержание ПРЛ в ткани передней доли гипофиза, образцах плазмы определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов SPiBio-Rat Prolactin EIA Kit (Bertin Pharma, Франция).

### ПЦР в реальном времени

Суммарную РНК выделяли с применением TRI Reagent (Sigma, США) согласно протоколу производителя. Для удаления примеси геномной ДНК выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (Fermentas, США). РНК переосаждали в 4 М LiCl, концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, США). κДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы M-MLV и гексамерных олигонуклеотидов (Fermentas, США).

ПЦР в реальном времени проводили на автоматическом амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием смеси qPCRmix-HS SYBR+ROX (Fermentas, США) и специфических олигонуклеотидов («Литех», Россия): смысловая последовательность 5'-АТАGATGATTGGGAGGGGAAGAG-3'; антисмысловая последовательность 5'-САТСАТСАGСАGGAAGAGTGTC-3'. Значения, полученные для каждого образца, нормировали на экспрессию гена «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Уровень экспрессии гена *GAPDH* определяли с использованием праймеров: смыслового - 5'-СТGACATGCCGCTGGAGAAA-3' и антисмыслового - 5'-TGGAAGAATGGGAGTTGCTGTTGA-3'.

Относительную экспрессию гена рассчитывали методом ΔΔCt с учетом эффективности ПЦР. Эффективность ПЦР определяли методом построения стандартных кривых [13].

### Статистическая обработка

Статистическую обработку данных выполняли при помощи интегрированных программ GraphPad Prism Version 6.0 для Windows (GraphPad Software, США). Данные представлены в виде: среднее арифметическое ± средняя ошибка среднего (M ± m). Статистическую значимость результатов определяли с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента (*t*-тест) и непараметрического *U*-критерия Манна-Уитни (*U*-тест).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Концентрация дофамина в различных отделах мозга

Через 72 ч после введения 6-ГДА концентрация ДА в стриатуме снижалась на 92%, в среднем мозге

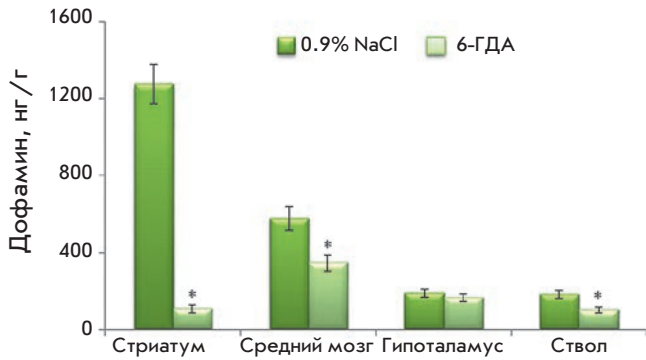


Рис. 2. Концентрация дофамина в различных областях мозга через 72 ч после стереотаксического введения 100 мкг 6-ГДА в боковые желудочки мозга на фоне подкожного введения 25 мг/кг ДМИ; в контроле вводили 25 мг/кг ДМИ и 0.9% NaCl. \* – Статистически значимые различия между контролем и опытом

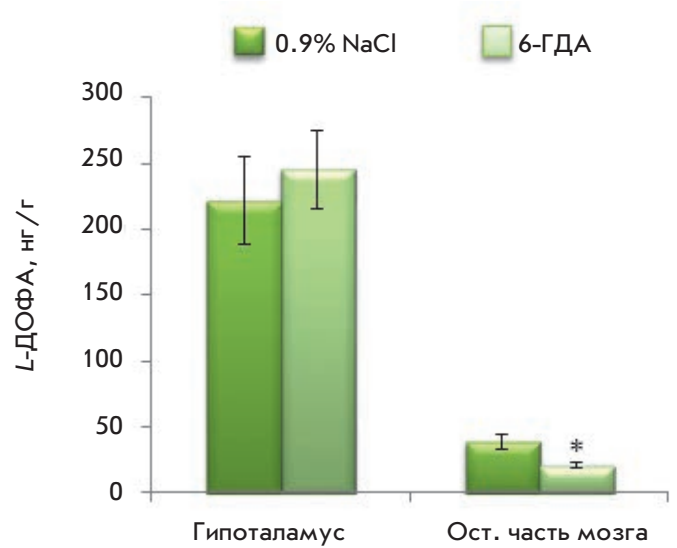


Рис. 3. Активность тирозингидроксилазы, оцениваемая по накоплению дигидроксифенилаланина (L-ДОФА) через 30 мин после введения ингибитора ДАА – NSD 1015, в гипоталамусе и остальной части мозга на модели хронического ингибирования синтеза дофамина в мозге с помощью 6-ГДА. \* – Статистически значимые различия между контролем и опытом

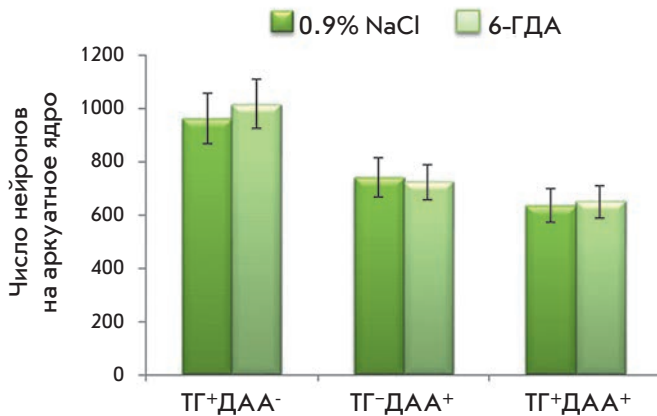


Рис. 4. Количество моноферментных ТГ<sup>+</sup>ДАА<sup>-</sup>, моноферментных ТГ<sup>-</sup>ДАА<sup>+</sup> и биферментных ТГ<sup>+</sup>ДАА<sup>+</sup> нейронов в аркуатном ядре через 72 ч после введения 100 мкг 6-ГДА в боковые желудочки мозга на фоне системного введения 25 мг/кг ДМИ; в контроле вводили 25 мг/кг ДМИ и 0.9% NaCl

на 40%, в стволе на 44%. В то же время в гипоталамусе концентрация ДА не менялась по сравнению с контролем (рис. 2).

#### Активность ТГ в различных отделах мозга

Активность ТГ оценивали по уровню накопления L-ДОФА после введения ингибитора ДАА – NSD 1015. При моделировании дефицита синтеза ДА в мозге неонатальных крыс концентрация L-ДОФА в гипоталамусе не менялась по сравнению с контролем, в то время как в остальной части мозга наблюдалось ее статистически значимое снижение (рис. 3).

#### Количество моно- и биферментных нейронов в аркуатном ядре

Через 72 ч после введения 6-ГДА в боковые желудочки мозга крыс количество моноферментных ТГ<sup>+</sup>ДАА<sup>-</sup>, моноферментных ТГ<sup>-</sup>ДАА<sup>+</sup> и биферментных ТГ<sup>+</sup>ДАА<sup>+</sup> нейронов в аркуатном ядре не менялось по сравнению с контролем (рис. 4, 5)

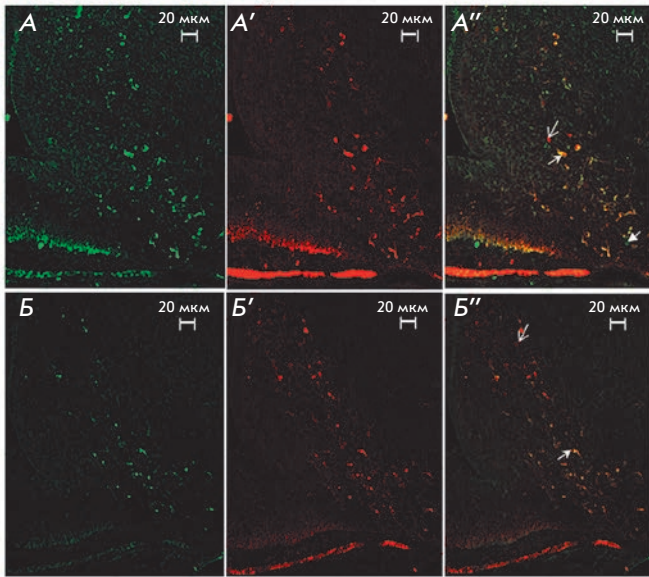
#### Пролактин в гипофизе и плазме крови

Через 72 ч после введения 100 мкг 6-ГДА в боковые желудочки мозга крыс концентрация пролактина в плазме крови статистически значимо увеличивалась на 70%, а в гипофизе на 48%. В то же время содержание мРНК пролактина в гипофизе увеличилось в 2.5 раза (рис. 6).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

У взрослых животных ДА, поступающий из гипоталамуса к гипофизу, регулирует функционирование периферических мишеней только через портальную систему циркуляции. В то же время согласно нашей гипотезе у неонатальных животных ДА в отсутствие ГЭБ может также поступать из всех популяций нейронов непосредственно в общую систему циркуляции. Ранее в экспериментах *in vitro* мы показали, что дофамин в той концентрации, в которой он со-





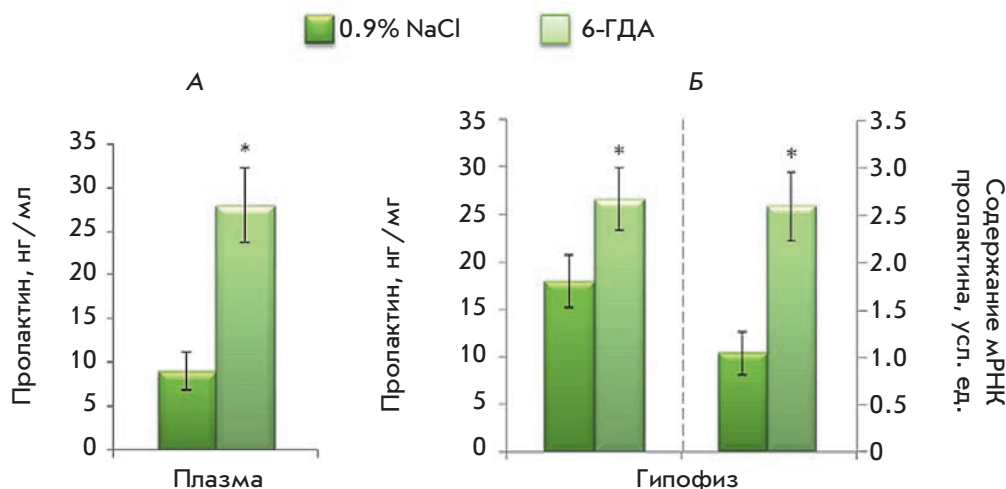
**Рис. 5.** Флуоресцентная микроскопия. Изображения нейронов аркуатного ядра, меченных по тирозингидроксилазе (А, Б), декарбоксилазе ароматических аминокислот (А', Б') и совмещенное изображение (А'', Б'') в контроле (А, А', А'') и после стереотаксического введения 6-ГДА (Б, Б', Б''). Стрелками отмечены нейроны разного фенотипа

держится в периферической крови неонатальных крыс, ингибирует секрецию пролактина гипофизом [10, 14]. Однако в условиях *in vivo* лактотрофы находятся под постоянным тоническим воздействием ДА, тогда как в условиях *in vitro* клетки гипофиза долгое время содержатся в среде без ДА, что, по мнению некоторых ученых, может качественно менять физиологию клетки [15]. Кроме того, этот подход

не позволяет однозначно сказать, что регуляция осуществляется именно через общую систему циркуляции, так как концентрации ДА в периферической и портальной крови на данном этапе онтогенеза могут быть сопоставимыми.

Анализ опубликованных данных позволил нам предположить, что эту проблему можно решить путем ингибирования синтеза ДА в мозге с помощью 6-ГДА – специфического нейротоксина катехоламинергических нейронов, который попадает в клетку с помощью специфических переносчиков ДА и норадреналина и ингибирует процесс окислительного фосфорилирования [16].

В связи с тем, что уровень экспрессии мембранного переносчика дофамина в нейронах медиобазального гипоталамуса достаточно низкий и механизмы захвата у неонатальных животных развиты еще достаточно слабо [17, 18], мы предположили, что использование 6-ГДА при моделировании дефицита ДА в мозге неонатальных крыс позволит нам разобщить описанные выше пути регуляции функциональной активности лактотрофов гипофиза. В связи с этим нами разработана модель специфического выключения синтеза дофамина в мозге новорожденных крыс. В этой модели уровень дофамина в мозге снижался на 54%, при этом в плазме крови снижение было еще более резким (70%) [11]. На основании имеющихся данных нельзя сделать однозначный вывод о том, что эффекты, которые будут наблюдаться на модели, обусловлены только ДА, поступающим из мозга в общую систему циркуляции. Для того чтобы оценить, влияет ли нейротоксин на ДА-синтезирующие нейроны медиобазального гипоталамуса, мы, в первую очередь, определили содержание ДА и его метаболитов в этой области после введения 6-ГДА. Показано, что в нашей модели уровень ДА в медиобазальном



**Рис. 6.** Концентрация пролактина в плазме крови (А) и концентрация пролактина и содержание его мРНК в гипофизе (Б) через 72 ч после введения 100 мкг 6-ГДА в боковые желудочки мозга на фоне системного введения 25 мг/кг ДМИ; в контроле вводили 25 мг/кг ДМИ и 0.9% NaCl. \* – Статистически значимые различия между контролем и опытом



гипоталамусе не меняется по сравнению с контролем, в то время как в стриатуме, среднем мозге и стволе снижается статистически значимо. Эти данные можно рассматривать как интегральный показатель того, что секреторная активность гипоталамуса не меняется под действием токсина.

ДА синтезируется из аминокислоты тирозина с помощью двух ферментов: ТГ и ДАА. В данной цепи реакций скоростьюлимитирующим этапом является синтез *L*-ДОФА из тирозина под действием ТГ [19]. Поэтому в качестве прямого показателя синтеза ДА в нашей модели мы оценивали активность ТГ, определяя накопление *L*-ДОФА в медиобазальном гипоталамусе после ингибирования второго фермента синтеза ДА – ДАА. Оказалось, что уровень *L*-ДОФА в данной области не менялся по сравнению с контролем, т.е. активность ТГ не меняется под действием нейротоксина. В то же время в остальной части мозга концентрация *L*-ДОФА снижалась в 2 раза по сравнению с контролем.

Степень дегенерации нейронов мозга под действием 6-ГДА оценивают в основном методом иммуногемечения по ТГ. Однако известно, что, помимо истинно ДАергических нейронов, экспрессирующих оба фермента синтеза ДА, существуют также нейроны, содержащие только один из ферментов [20–22]. В нашей лаборатории ранее было показано, что в аркуатном ядре у крыс в перинатальном периоде развития число моноферментных нейронов значительно превышает число биферментных. Так, на Э21 количество моноферментных нейронов в этой области составляет 99%, а биферментных всего 1%. На стадии П9 биферментные нейроны составляют 38% [23]. При этом показано, что моноферментные нейроны способны осуществлять совместный синтез ДА [24, 25]. Кроме того, при функциональной недостаточности тубероинфундибулярной системы гипоталамуса, вызванной введением в мозг 6-ГДА, у взрослых животных увеличивается число как ТГ-, так и ДАА-содержащих моноферментных нейронов [26]. По-видимому, такая реакция представляет собой проявление компенсаторных процессов. В связи с этим на модели дефицита ДА мы оценили количество нейронов в аркуатном ядре с помощью двойного иммуногемечения по ТГ и ДАА. Оказалось, что количество биферментных, моноферментных ТГ-содержащих и моноферментных ДАА-содержащих нейронов не менялось по сравнению с контролем.

Таким образом, мы получили доказательство того, что специфическое выключение синтеза ДА в мозге с помощью нейротоксина 6-ГДА не меняет морфо-

функциональное состояние медиобазального гипоталамуса. Это означает, что если на этой модели будут наблюдаться изменения в синтезе ПРЛ, то они будут обусловлены влиянием ДА исключительно через общую систему циркуляции.

В следующей серии экспериментов мы оценили влияние ДА, секретлируемого мозгом в общую систему циркуляции, на синтез пролактина гипофизом. Ранее в нашей лаборатории было показано, что ингибиторное влияние ДА на секрецию пролактина впервые обнаруживается на Э21 [27], т.е. в анализируемый период этот механизм должен быть достаточно зрелым. Оказалось, что при снижении уровня ДА в плазме крови на 73% концентрация ПРЛ увеличилась на 70%. Этот показатель характеризует уровень выделения ПРЛ лактотрофами гипофиза. Столь значительное увеличение концентрации ПРЛ в плазме в ответ на снижение концентрации ДА говорит о том, что дофамин, секретлируемый мозгом в общую систему циркуляции, оказывает ингибирующее влияние на выделение пролактина лактотрофами гипофиза. При этом концентрация ПРЛ в гипофизе увеличивается на 48%. По-видимому, ДА, поступающий к гипофизу через общую систему циркуляции, не только ингибирует выделение ПРЛ, но и влияет на его синтез. Чтобы подтвердить влияние ДА на синтез ПРЛ в нашей модели, мы оценили уровень мРНК ПРЛ. Оказалось, что уровень экспрессии мРНК ПРЛ в гипофизе животных с дефицитом ДА в 2.5 раза выше, чем в контроле.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нам удалось показать, что в раннем постнатальном периоде до формирования ГЭБ ДА, выделяемый мозгом в общую систему циркуляции, оказывает ингибирующее влияние на синтез и выделение ПРЛ лактотрофами гипофиза. Согласно нашей гипотезе об эндокринной функции мозга до формирования ГЭБ в раннем постнатальном периоде возможны два пути дофаминовой регуляции секреции ПРЛ гипофизом: ДАергическими нейронами гипоталамуса через портальную систему циркуляции и другими популяциями ДАергических нейронов через общую систему циркуляции. Можно предположить, что на протяжении исследуемого нами периода онтогенеза регуляция функционирования лактотрофов гипофиза через общую систему циркуляции вносит существенный вклад в регуляцию секреции ПРЛ. ●

*Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-15-01122).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gorski R.A., Lakoski J.M., Perez-Polo J.R., Rassin D.K., Gustavson C.R., Watson C.S. Neural control of reproductive function. New York: Alan R. Liss Inc., 1988. P. 33–44.
2. Lauder J.M. // Trends Neurosci. 1993. V. 16. № 6. P. 233–240.
3. Ugrumov M.V. // Int. J. Dev. Biol. 1997. V. 41. P. 809–816.
4. Fuse Y. // Reprod. Fertil. Dev. 1996. V. 8. № 1. P. 1–21.
5. O'shaughnessy P., Baker P., Sohnius U., Haavisto A. // Endocrinology. 1998. V. 139. № 3. P. 1141–1146.
6. Borisova N.A., Sapronova A.Y., Proshlyakova E.V., Ugrumov M.V. // Neuroscience. 1991. V. 43. № 1. P. 223–229.
7. Ugrumov M.V., Popov A.P., Vladimirov S.V., Kasmambetova S., Novodjilova A.P., Tramu G. // Neuroscience. 1994. V. 58. P. 161–165.
8. Ugrumov M.V. // Neurochem. Res. 2010. V. 35. № 6. P. 837–850.
9. Сайфетярова Ю.Ю., Дегтярева Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. // Нейрохимия. 2011. Т. 28. № 3. С. 192–199.
10. Сайфетярова Ю.Ю., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. // ДАН. 2012. Т. 443. № 6. С. 1–4.
11. Зубова Ю.О., Сайфетярова Ю.Ю., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. // ДАН. 2014. Т. 454. № 4. С. 481–484.
12. Carlsson A., Lindqvist M. // J. Neural Transmission. 1973. V. 34. № 2. P. 79–91.
13. Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. // Curr. Protocols Mol. Biol. 2006. P. 15.8.1–15.8.28.
14. Бондаренко Н.С., Зубова Ю.О., Сапронова А.Я., Волина Е.В., Угрюмов М.В. // Бюл. экп. биологии и медицины. 2015. Т. 159. № 3. С. 268–273.
15. Ben-Jonathan N., Hnasko R. // Endocrine Rev. 2001. V. 22. № 6. P. 724–763.
16. Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M.F., Benabid A.L., Sadoul R., Verna J.M. // Progress Neurobiol. 2001. V. 65. № 2. P. 135–172.
17. Yokoyama C., Okamura H., Ibata Y. // Brain Res. Bull. 1993. V. 30. № 5. P. 551–559.
18. Elsworth J.D., Roth R.H. // Exp. Neurol. 1997. V. 144. № 1. P. 4–9.
19. Nagatsu T., Sawada M. // Cell. Mol. Neurobiol. 2006. V. 26. № 4–6. P. 779–800.
20. Meister B., Hökfelt T., Steinbusch H.W., Skagerberg G., Lindvall O., Geffard M., Cuello A.C., Goldstein M. // J. Chem. Neuroanat. 1987. V. 1. № 1. P. 59–64.
21. Okamura H., Kitahama K., Nagatsu I., Geffard M. // Neurosci. Lett. 1988. V. 95. № 1. P. 347–353.
22. Ugrumov M.V. // Adv. Pharmacol. 2013. V. 68. P. 37–91.
23. Ershov P.V., Ugrumov M.V., Calas A., Makarenko I.G., Krieger M., Thibault J. // J. Chem. Neuroanat. 2002. V. 24. № 2. P. 95–107.
24. Ugrumov M.V., Melnikova V.I., Lavrentyeva A.V., Kudrin V.S., Rayevsky K.S. // Neuroscience. 2004. V. 124. № 3. P. 629–635.
25. Ugrumov M., Taxi J., Pronina T., Kurina A., Sorokin A., Sapronova A., Calas A. // Neuroscience. 2014. V. 277. P. 45–54.
26. Ershov P.V., Ugrumov M.V., Calas A., Krieger M., Thibault J. // J. Chem. Neuroanat. 2005. V. 30. № 1. P. 27–33.
27. Melnikova V.I., Orosco M., Rouch C., Calas A., Nicolaidis S., Proshlyakova E.V., Sapronova A.Y., Ugrumov M.V. // Eur. J. Endocrinol. 1998. V. 139. № 3. P. 337–342.

УДК 577.152.161, 577.151.02

# Идентификация новых структурных фрагментов для дизайна ингибиторов лактатдегидрогеназы А

Д. К. Нилов<sup>1\*</sup>, А. В. Куликов<sup>2</sup>, Е. А. Прохорова<sup>3</sup>, В. К. Швядас<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

\*E-mail: nilov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 20.01.2016

Принята к печати 05.04.2016

**РЕФЕРАТ** Лактатдегидрогеназа А играет важную роль в метаболизме глюкозы в опухолевых клетках человека и представляет собой перспективную мишень для химиотерапии. С использованием компьютерного скрининга сульфонов и экспериментальной проверки ингибиторных свойств выявлены молекулярные фрагменты, способные связываться в активном центре данного фермента и реализовать водородные связи заряженной сульфогруппы с гуанидиновой группой Arg168, а также дополнительные взаимодействия с петлей 96–111 в закрытой конформации. Показано, что сульфогруппа занимает положение, соответствующее карбоксильной группе субстрата и его структурных аналогов, а присоединенная посредством линкера бензотиазольная группа располагается на участке связывания кофермента NADH. Показана важность объединения отдельных структурных элементов ингибитора с помощью линкера, установлены пути дальнейшей модификации структуры для создания более эффективных ингибиторов лактатдегидрогеназы А.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** докинг, ингибитор, лактатдегидрогеназа, молекулярное моделирование, сульфогруппа, сульфонаты.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ЛДГ-А – изоформа А лактатдегидрогеназы.

## ВВЕДЕНИЕ

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует превращение продукта гликолиза пирувата в лактат, сопровождающееся окислением NADH до NAD<sup>+</sup> (рис. 1). В здоровом организме человека изоформа А ЛДГ (ЛДГ-А) находится преимущественно в скелетных мышцах, изоформа В – в сердечной мышце, С – в яичках [1, 2]. Во многих опухолевых клетках наблюдается изменение метаболизма, называемое эффектом Варбурга: активация превращения пирувата с помощью ЛДГ и снижение окисления пирувата в митохондриях [3, 4]. Одна из причин усиления гликолитической активности – увеличенная экспрессия ЛДГ-А [5, 6]. Этот фермент считается перспективной мишенью в терапии опухолей, так как играет важную роль в обеспечении жизни и пролиферации опухолевых клеток [7–9]. В этой связи представляет интерес поиск селективных ингибиторов ЛДГ-А человека и изучение их влияния на клеточном уровне.

Известно несколько классов ингибиторов [10, 11], большинство из которых содержат в своей структуре карбоксильную группу. В качестве примера можно привести структурный аналог субстрата оксамат и его многочисленные производные [12, 13]. Ключевыми для связывания пирувата и оксамата являются водородные связи карбоксильной группы с консервативным остатком Arg168 [14, 15]. Также в связывании субстрата, кофермента и ингибиторов участвуют остатки подвижной петли 96–111 [16], среди которых можно отметить Arg105 (стабилизирует переходное состояние в ходе превращения субстрата). Установлены кристаллические структуры комплексов ЛДГ-А человека, в которых петля 96–111 представлена в закрытой или открытой конформации в зависимости от строения ингибитора [17–19]. В последнее время при разработке ингибиторов ЛДГ-А предприняты попытки поиска соединений, способных взаимодействовать с участками связыва-

ния субстрата и кофермента [20, 21]. Перспективным путем решения этой задачи представляется поиск молекулярных фрагментов – небольших молекул, способных образовать специфические взаимодействия с выбранными участками белка. В дальнейшем такие фрагменты, соединенные посредством подходящего линкера, могут стать основой новых, более эффективных ингибиторов фермента. Анализ опубликованных данных о связывании субстрата, а также производных оксаминовой и малоновой кислоты указывает на важность электростатических взаимодействий с гуанидиновой группой Arg168 в активном центре ЛДГ-А. С учетом этого фактора была поставлена цель – изучить возможность использования отрицательно заряженной сульфогруппы при дизайне структуры новых ингибиторов.

Сульфозамещенные производные нафталина **2** и **3** (рис. 1) упоминались в работе, посвященной поиску ингибиторов ЛДГ из малярийного паразита *Plasmodium falciparum*, однако они проявили лишь слабую ингибиторную активность [22]. Кристаллографическая структура комплекса **2** с ЛДГ из *P. falciparum* (PDB ID 1u4s) показала, что сульфогруппа ингибитора взаимодействует с Arg171 (соответствует Arg168 в ЛДГ-А человека). Предположили, что ингибитор **2** связывается схожим образом с апоформой и комплексом ЛДГ–кофермент, не конкурируя с NADH. Необходимо отметить важные различия в устройстве активного центра ЛДГ паразита и человека, главным образом, связанные с расположением кофермента и подвижной петли активного центра, которая в ЛДГ человека короче на пять остатков [23]. Это позволяет предположить, что структурные фрагменты ингибиторов ЛДГ-А человека на основе сульфонатов должны отличаться от соединений **2** и **3**. В ранее проведенном исследовании мы создали модели ЛДГ-А человека для поиска ингибиторов, конкурентных по отношению к субстрату и к коферменту, а также определили структурные критерии отбора потенциальных ингибиторов [24]. Разработанная методика использована для скрининга молекулярных фрагментов с сульфогруппой, которые могли бы стать аддитивными компонентами дизайна более эффективных ингибиторов ЛДГ-А.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Компьютерный скрининг ингибиторов ЛДГ-А проводили среди низкомолекулярных соединений из библиотеки Vitas-M [25]. С помощью программы ACD/Spectrus DB 14.0 [26] отобрали соединения, содержащие сульфогруппу и удовлетворяющие правилу трех [27, 28]. Это правило определяет диапазон физико-химических параметров, которым характеризуются молекулярные фрагменты (молекулярная

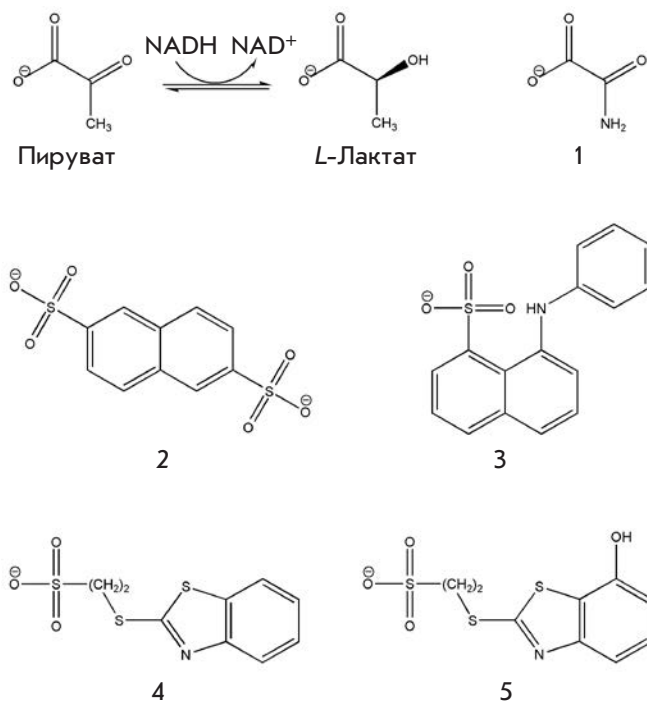


Рис. 1. Химические структуры субстратов и ингибиторов (1–5) ЛДГ-А человека. **1** – оксамат, **2** – нафталин-2,6-дисульфонат, **3** – 8-(фениламино)нафталин-1-сульфонат, **4** – 2-(бензотиазол-2-илсульфанил)-этансульфонат, **5** – 2-(7-гидроксибензотиазол-2-илсульфанил)-этансульфонат

масса < 300, log P ≤ 3, доноры водородной связи ≤ 3, акцепторы водородной связи ≤ 3, вращаемые связи ≤ 3). Молекулярный докинг соединений из созданной сфокусированной библиотеки проводили с использованием программы Lead Finder 1.1.15 [29, 30] в режиме «extra precision» и моделей ЛДГ-А человека (со связанной молекулой NADH и без нее), полученных в нашей предыдущей работе [24]. На первом этапе отбор ингибиторов осуществляли путем отбраковки соединений, при связывании которых с ЛДГ-А расстояние между серой сульфогруппы и углеродом гуанидиновой группы Arg168 составляло более 5.5 Å. В дальнейшем проверяли способность соединений, соответствующих критериям проведенной структурной фильтрации, образовывать водородные связи и гидрофобные контакты с остатками петли 96–111 [24]. Визуализацию и анализ структур осуществляли с помощью VMD 1.9.2 [31].

Ферментативную активность ЛДГ определяли с использованием препарата из мышц кролика (Sigma-Aldrich). Для приготовления растворов и проведения измерений использовали 0.1 М калий-



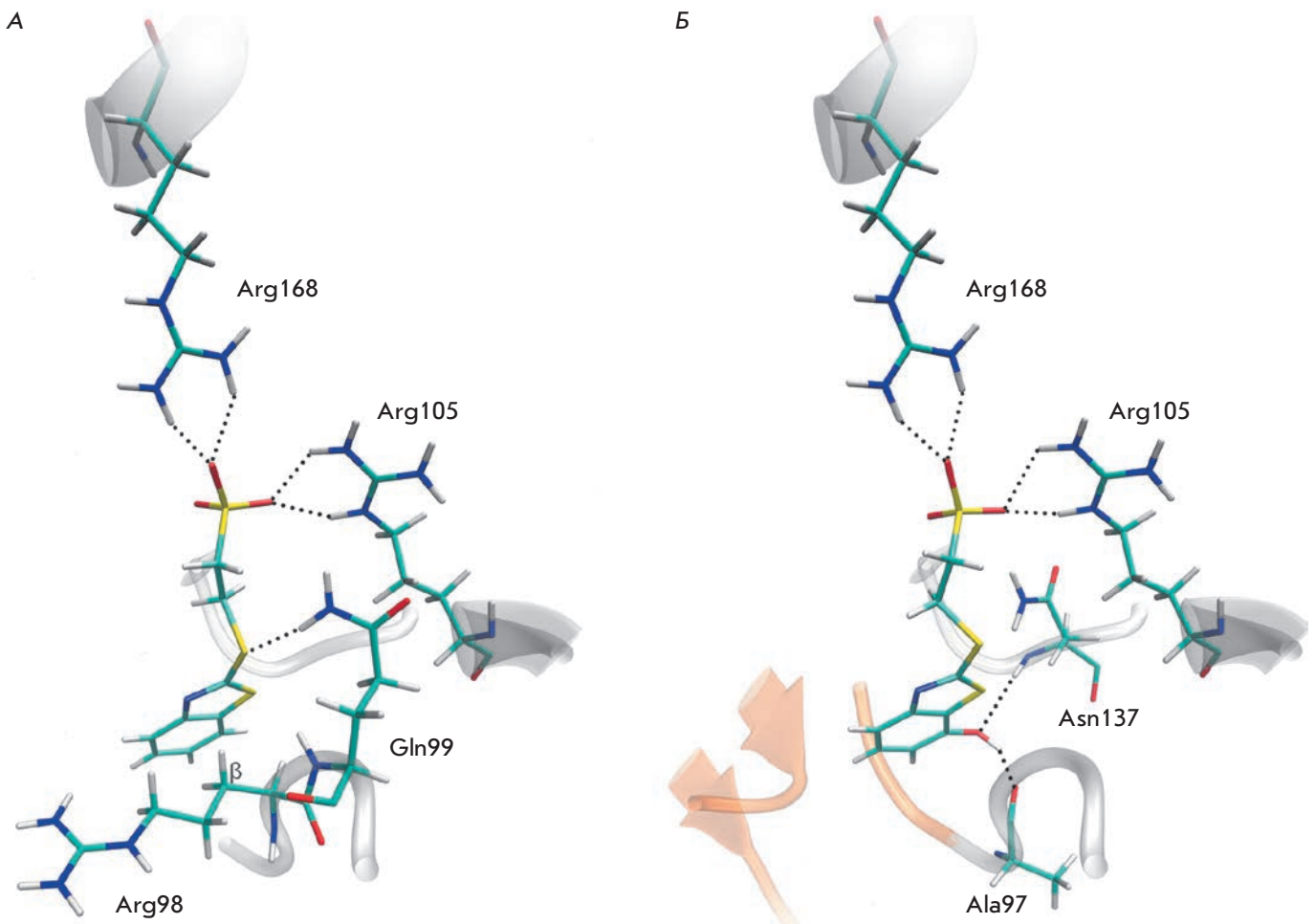


Рис. 2. Положения ингибиторов в активном центре ЛДГ-А человека, найденные в результате молекулярного моделирования. А – связывание соединения 4: показаны водородные связи сульфогруппы с Arg168, а также взаимодействия с остатками петли активного центра Arg98, Gln99 и Arg105. Б – связывание соединения 5: показаны дополнительные водородные связи гидроксильного заместителя с Ala97 и Asn137, не показано взаимодействие с Arg98 и Gln99. Оранжевым цветом отмечена область связывания адениновой части кофермента

фосфатный буфер, pH 7.0. Раствор фермента, содержащий 1% (г/мл) бычьего сывороточного альбумина (БСА), готовили непосредственно перед измерениями. Активность ЛДГ-А измеряли спектрофотометрически при 340 нм по уменьшению поглощения NADH в реакции превращения пирувата в лактат. Измерения проводили с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1800. В кювету помещали реакционную смесь, содержащую буфер, пируват (400 мкМ), NADH (20 мкМ) и ингибитор, термостатировали в течение 5 мин при 37°C, после чего начинали реакцию добавлением аликвоты фермента. Начальную скорость ферментативной реакции определяли в двух независимых опытах. Значения IC<sub>50</sub> (концентрация ингибитора, при которой активность

фермента снижена на 50%) определяли при варьировании концентрации ингибитора в диапазоне от 0 до 8 мМ.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллографические исследования показали, что сульфозамещенное производное 2 способно связываться только с открытой конформацией ЛДГ из *P. falciparum* с неупорядоченной петлей активного центра. Очевидно, что структурные фрагменты, содержащие сульфогруппу и способные связываться с ферментом в закрытой конформации, т.е. в тех условиях, когда можно ожидать эффективного взаимодействия с петлей 96–111, должны весьма сильно отличаться от соединений 2 и 3. Для выявления но-

вых фрагментов из библиотеки низкомолекулярных соединений были отобраны сульфоновые кислоты и их соли (71 соединение). Соединения докировали в активный центр разработанных ранее моделей ЛДГ-А человека, после чего анализировали их способность осуществлять важное электростатическое взаимодействие с остатком Arg168, а также дополнительные взаимодействия с остатками петли 96–111 в закрытой конформации. В результате проведенного скрининга выбран наиболее перспективный ингибитор – соединение **4**, способное эффективно связываться с апоформой ЛДГ-А ( $\Delta G^{\text{calc}} = -9.9$  ккал/моль).

Экспериментально изучали ингибиторные свойства соединения **4** в отношении к ЛДГ из мышц кролика, активный центр которой обладает высоким структурным сходством с ЛДГ-А человека [32], определенное значение  $IC_{50}$  составило 1.2 мМ. Интересно, что ингибитор **4** связывается схожим образом с исследованным ранее производным оксамата STK381370 ( $\Delta G^{\text{calc}} = -7.9$  ккал/моль,  $IC_{50}$  5 мМ) [24], образуя дополнительные контакты с петлей 96–111, однако эффективность его взаимодействия выше. Полученные результаты свидетельствуют о том, что используемая модель закрытой конформации фермента адекватно симулирует связывание соединений разных классов.

Локализация структурного фрагмента с заряженной сульфогруппой на участке связывания субстрата приводит к стабилизации положения ингибитора за счет образования водородных связей с гуанидиновыми группами Arg168 и Arg105 (рис. 2А). Чрезвычайно большое значение для дизайна ингибиторов ЛДГ-А имеет способ соединения отдельных элементов структуры. Так, например, благодаря гибкости линкера, связывающего сульфогруппу и бензотиазольную группу, возможна реализация одновременных взаимодействий соединения **4** как с участком связывания субстрата, так и никотинамидного нуклеотида NADH. Тиоэфирный линкер образует водородную связь с боковой цепью Gln99, а бензотиазольная группа, расположенная на участке первого остатка рибозы кофермента, образует выгодный гидрофобный контакт с  $C^{\beta}$ -атомом боковой цепи Arg98. Необходимо отметить, что перечисленные взаимодействия с остатками Arg98, Gln99 и Arg105 реализуются только при переходе петли активного центра в закрытую конформацию и важны для ее стабилизации. Также при связывании сульфоната имеют место дополнительные взаимодействия: характерные для оксамата водородные связи между сульфогруппой, Asn137 и Thr247, гидрофобные контакты линкера с Ile241 и бензотиазольной группы с Val30, водородная связь гетероатома кольца с карбоксамидом Asn137 (на рисунке не показаны).

Среди изученных в ходе скрининга сульфопроизводных представлены структуры без гибкого линкера (в том числе, производные нафталина), с линкером, удлинённым на одно метиленовое звено, а также с бензолом, пирролом и пиридином на участке бензотиазола **4**. Все эти соединения характеризовались худшей энергией связывания и не обладали способностью вступать во взаимодействия, достаточные для стабилизации петли 96–111 в закрытой конформации. Это указывает на то, что структура остова **4** является наиболее оптимальной для связывания в активном центре и может служить основой для дальнейших модификаций. Так, например, введение гидроксильной группы в положение 7 позволяет этому заместителю занять место 3'-ОН-группы первого остатка рибозы NADH и образовать соответствующие водородные связи с остовами Ala97 и Asn137 (соединение **5**, рис. 2Б). Расчет энергии связывания ( $\Delta G^{\text{calc}} = -10.9$  ккал/моль) показывает, что данная модификация приводит к дополнительному энергетическому выигрышу. Увеличение эффективности ингибирования фермента при введении заместителей в бензотиазольную группу говорит о перспективности дальнейшего поиска структурных фрагментов и путей их объединения с целью получения аддитивного (а, может быть, и синергического) эффекта при создании новых ингибиторов ЛДГ-А.

## ВЫВОДЫ

Целью настоящей работы был поиск новых молекулярных фрагментов для дизайна ингибиторов ЛДГ-А, способных реализовать характерное для субстратов и ранее описанных ингибиторов взаимодействие заряженной кислотной группы с Arg168 и аминокислотными остатками петли активного центра на участке связывания субстрата, а также взаимодействие с участком связывания кофермента. В результате компьютерного скрининга и экспериментальной проверки ингибиторных свойств обнаружены новые фрагменты, включающие сульфогруппу, линкер и бензотиазольную группу. Проведенные исследования позволили выявить наиболее значимые взаимодействия и аминокислотные остатки, которые принимают участие в стабилизации положения ингибиторов с сульфогруппой (Ala97, Arg98, Gln99, Arg105, Arg168) в закрытой конформации фермента. Таким образом, апробирована методология поиска новых ингибиторов ЛДГ-А, и установлены пути дальнейшей оптимизации их структуры. ●

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-08-01251).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kolappan S., Shen D.L., Mosi R., Sun J., McEachern E.J., Vocado D.J., Craig L. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2015. V. 71. P. 185–195.
2. Everse J., Kaplan N.O. // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1973. V. 37. P. 61–133.
3. Warburg O. // *Science.* 1956. V. 124. P. 269–270.
4. Hamanaka R.B., Chandel N.S. // *J. Exp. Med.* 2012. V. 209. P. 211–215.
5. Goldman R.D., Kaplan N.O., Hall T.C. // *Cancer Res.* 1964. V. 24. P. 389–399.
6. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Sivridis E., Bougioukas G., Didilis V., Gatter K.C., Harris A.L. // *Br. J. Cancer.* 2003. V. 89. P. 877–885.
7. Fantin V.R., St.-Pierre J., Leder P. // *Cancer Cell.* 2006. V. 9. P. 425–434.
8. Le A., Cooper C.R., Gouw A.M., Dinavahi R., Maitra A., Deck L.M., Royer R.E., Vander Jagt D.L., Semenza G.L., Dang C.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 2037–2042.
9. Miao P., Sheng S., Sun X., Liu J., Huang G. // *IUBMB Life.* 2013. V. 65. P. 904–910.
10. Granchi C., Bertini S., Macchia M., Minutolo F. // *Curr. Med. Chem.* 2010. V. 17. P. 672–697.
11. Granchi C., Paterni I., Rani R., Minutolo F. // *Future Med. Chem.* 2013. V. 5. P. 1967–1991.
12. Yu Y., Deck J.A., Hunsaker L.A., Deck L.M., Royer R.E., Goldberg E., Vander Jagt D.L. // *Biochem. Pharmacol.* 2001. V. 62. P. 81–89.
13. Choi S.R., Beeler A.B., Pradhan A., Watkins E.B., Rimoldi J.M., Tekwani B., Avery M.A. // *J. Comb. Chem.* 2007. V. 9. P. 292–300.
14. Dunn C.R., Wilks H.M., Halsall D.J., Atkinson T., Clarke A.R., Muirhead H., Holbrook J.J. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1997. V. 332. P. 177–184.
15. Read J.A., Winter V.J., Eszes C.M., Sessions R.B., Brady R.L. // *Proteins.* 2001. V. 43. P. 175–185.
16. Gerstein M., Chothia C. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 220. P. 133–149.
17. Ward R.A., Brassington C., Breeze A.L., Caputo A., Critchlow S., Davies G., Goodwin L., Hassall G., Greenwood R., Holdgate G.A., et al. // *J. Med. Chem.* 2012. V. 55. P. 3285–3306.
18. Dragovich P.S., Fauber B.P., Corson L.B., Ding C.Z., Eigenbrot C., Ge H., Giannetti A.M., Hunsaker T., Labadie S., Liu Y., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. V. 23. P. 3186–3194.
19. Fauber B.P., Dragovich P.S., Chen J., Corson L.B., Ding C.Z., Eigenbrot C., Giannetti A.M., Hunsaker T., Labadie S., Liu Y., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. V. 23. P. 5533–5539.
20. Moorhouse A.D., Spiteri C., Sharma P., Zloh M., Moses J.E. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2011. V. 47. P. 230–232.
21. Kohlmann A., Zech S.G., Li F., Zhou T., Squillace R.M., Commodore L., Greenfield M.T., Lu X., Miller D.P., Huang W.S., et al. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. P. 1023–1040.
22. Connors R., Schambach F., Read J., Cameron A., Sessions R.B., Vivas L., Easton A., Croft S.L., Brady R.L. // *Mol. Biochem. Parasitol.* 2005. V. 142. P. 137–148.
23. Dunn C.R., Banfield M.J., Barker J.J., Higham C.W., Moreton K.M., Turgut-Balik D., Brady R.L., Holbrook J.J. // *Nat. Struct. Biol.* 1996. V. 3. P. 912–915.
24. Нилов Д.К., Прохорова Е.А., Швядас В.К. // *Acta Naturae.* 2015. Т. 7. № 2 (25). С. 62–68.
25. ST(K/L) collection. Vitas-M Laboratory, Ltd, <http://www.vitasmlab.com>. 2012.
26. ACD/Spectrus DB, version 14.01. Advanced Chemistry Development, Inc., <http://www.acdlabs.com>. 2012.
27. Congreve M., Carr R., Murray C., Jhoti H. // *Drug Discov. Today.* 2003. V. 8. P. 876–877.
28. Lipinski C.A. // *Drug Discov. Today Technol.* 2004. V. 1. P. 337–341.
29. Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Chem. Inf. Model.* 2008. V. 48. P. 2371–2385.
30. Novikov F.N., Stroylov V.S., Stroganov O.V., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Mol. Model.* 2009. V. 15. P. 1337–1347.
31. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graphics.* 1996. V. 14.1. P. 33–38.
32. Swiderek K., Panczakiewicz A., Bujacz A., Bujacz G., Paneth P. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 12782–12789.

УДК 578.2

# Анализ доменов белков капсида и NS5A вируса гепатита С, активирующих каскад Nrf2/ARE

О. А. Смирнова<sup>1</sup>, О. Н. Иванова<sup>1</sup>, Ф. Ш. Мухтаров<sup>1</sup>, В. Л. Туницкая<sup>1</sup>, Ю. Янсонс<sup>2</sup>,  
М. Г. Исагулянц<sup>2,3</sup>, С. Н. Кочетков<sup>1</sup>, А. В. Иванов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32

<sup>2</sup>Riga Stradins University, Latvia, Riga LV-1007, Dzirciema Street, 16

<sup>3</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Иванковского Министерства здравоохранения РФ, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика М.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 16

\*E-mail: aivanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.03.2016

Принята к печати 27.06.2016

**РЕФЕРАТ** Инфицирование вирусом гепатита С (ВГС) вызывает хроническое заболевание печени, которое сопровождается развитием различных патологий и метаболических нарушений. Одним из механизмов патогенеза ВГС считается возникновение в инфицированных клетках окислительного стресса, вызываемого белками вирусного капсида и NS5A. Оба белка активируют систему защиты клетки от окислительного стресса, регулируемую фактором транскрипции Nrf2. В настоящей работе установлено, что данная активация опосредована доменом 1 белка NS5A и двумя фрагментами белка капсида. Показано, что активация фактора Nrf2 каждым белком осуществляется с использованием двух механизмов, один из которых опосредован активными формами кислорода (АФК) и протеинкиназой С, а второй – АФК-независимой активацией казеинкиназы 2 и фосфоинозитид-3-киназы. АФК-зависимый механизм стимулировался фрагментом 37–191 а.о. белка капсида, а АФК-независимый – фрагментом 1–36 а.о., что впервые показало независимость двух механизмов активации фактора Nrf2. Кроме того, сделан вывод о том, что внутриклеточная локализация белков ВГС и различия в их биологических свойствах не играют роли в регуляции системы защиты клетки от окислительного стресса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус гепатита С, окислительный стресс, регуляция, фактор транскрипции, Nrf2.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АФК – активные формы кислорода; а.о. – аминокислотный остаток; ВГС – вирус гепатита С; ОС – окислительный стресс.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С (ВГС) вызывает широко распространенное и опасное заболевание печени человека. В большинстве случаев заражение ВГС приводит к хроническому гепатиту, при котором велик риск развития фиброза и цирроза печени, а также гепатоцеллюлярной карциномы и различных метаболических нарушений (стеатоз, сахарный диабет типа 2, нарушения метаболизма железа и другие патологии) [1]. Многочисленные фундаментальные и клинические исследования выявили ряд патогенетических механизмов ВГС, среди которых важную роль играет окислительный стресс (ОС) [2]. ОС представляет собой состояние клетки, при котором нарушается баланс между активными формами кислорода (АФК)

и нейтрализующими их низкомолекулярными соединениями (антиоксидантами) и ферментами, вовлеченными в защиту от ОС (так называемые ферменты фазы II). Биосинтез многих ферментов метаболизма антиоксидантов и ферментов фазы II контролируется фактором транскрипции Nrf2 (nuclear factor erythroid-2 – related factor 2), который связывается с общим регуляторным элементом ARE (Antioxidant Response Element) в промоторах генов [3]. В отсутствие стресса фактор Nrf2 находится в цитоплазме в комплексе с белком-партнером Keap1. При повышении уровня АФК комплекс разрушается либо вследствие фосфорилирования фактора Nrf2 различными протеинкиназами, либо в результате модификации Keap1, после чего свободный фактор



транскрипции перемещается в ядро и активирует транскрипцию генов ферментов метаболизма антиоксидантов и ферментов фазы II, в частности, гемоксигеназы 1 (HO-1) и NADPH:хиноноксидоредуктазы 1 (Nqo1) [3, 4].

Вирус гепатита С не только вызывает ОС, но и активирует фактор Nrf2 [2]. Ключевую роль в обоих случаях играют вирусные белки – капсидный и NS5A [4–7]. Ранее мы установили, что эти белки активируют систему защиты при помощи двух механизмов, один из которых опосредован АФК и протеинкиназой С, а другой заключается в АФК-независимой активации фактора Nrf2 казеинкиназой 2 и фосфоинозитид-3-киназой [4]. Однако нельзя исключать, что оба пути активации Nrf2 индуцируются неким общим регулятором, расположенным выше в каскаде, все участники которого до сих пор не известны. Задача настоящей работы состояла в том, чтобы выявить наличие (или отсутствие) такой регуляции и определить структурные элементы белков капсида и NS5A, принимающие участие в механизмах активации Nrf2/ARE-каскада.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линия клеток гепатомы человека Huh7.5 любезно предоставлена С. Rice (Рокфеллеровский университет, США). Плаزمида pCMV-core, кодирующая полноразмерный белок капсида ВГС генотип 1b (274933RU), описана ранее [4]. Плазмиды, кодирующие фрагменты 1–36, 37–191 и 1–151 а.о. белка капсида, сконструированы на основе вектора pVax1 [8], а плазмиды, кодирующие полноразмерный белок NS5A ВГС генотип 1b (AJ238799) и его индивидуальные домены D1 (1–249 а.о.), D2 (250–355 а.о.) и D3 (356–447 а.о.), созданы на основе вектора pCMV-Tag3B [7].

В качестве ингибиторов протеинкиназ использовали Ro 31-8220, вортманнин и 5,6-дихлор-1-β-D-рибофуранозилбензимидазол (DRB) (Sigma).

### Культуральные работы

Клетки Huh7.5 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальную сыворотку крупного рогатого скота (HyClone, США), 2 мМ глутамина, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина, при 37°C во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

### Работа с репортерной плазмидой

Клетки Huh7.5 высевали на 24-луночные планшеты, трансфицировали смесью репортерной плазмиды pP-ARE (0.25 мкг) [4] и целевой экспрессионной плазмиды (0.25 мкг) с использованием реагента Turbofect. Через 30 ч лизировали клетки и измеряли активность люциферазы как описано ранее [4].

### Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени

Клетки Huh7.5 трансфицировали описанным выше методом, через 40 ч отбирали культуральную среду, выделяли суммарную РНК, проводили обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени согласно [4].

### Вестерн-блоттинг

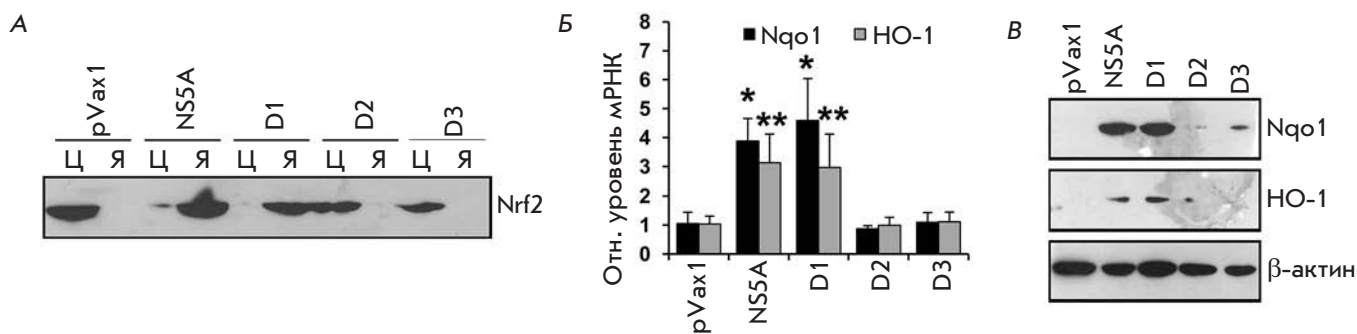
Клетки Huh7.5 трансфицировали на 6-луночных планшетах, лизировали через 40 ч после трансфекции, дальнейшие манипуляции проводили как описано ранее [4], используя моноклональные антитела мыши к гемоксигеназе 1 (ab13248), NADPH:хиноноксидоредуктазе 1 (ab28947) и β-актину (ab3280) фирмы Abcam (Великобритания), а также вторичные антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (sc-2005) компании Santa-Cruz (США). Для анализа внутриклеточной локализации фактора Nrf2 клетки лизировали, фракции цитоплазматических и ядерных белков разделяли с использованием коммерческого набора NE-PER (Thermo Scientific). Nrf2 детектировали в каждой фракции методом иммуноблоттинга, используя поликлональные антитела кролика к Nrf2 (sc-722) и вторичные антитела к IgG кролика (sc-2004) фирмы Santa-Cruz.

### Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали, используя программу StatPlus (AnalystSoft, Канада). Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическую значимость различий вычисляли, используя парный критерий Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Участие фрагментов белков капсида и NS5A в активации каскада Nrf2/ARE анализировали тремя методами: оценивали относительные уровни экспрессии двух ферментов фазы II (Nqo1, HO-1) и определяли внутриклеточную локализацию фактора Nrf2. Показано, что из всех описанных доменов белка NS5A только домен 1 (остатки 1–249 а.о.) обладает способностью активировать фактор Nrf2, т.е. вызывать его транслокацию из цитоплазмы в ядро (рис. 1А) и усиливать экспрессию Nrf2-зависимых генов (рис. 1Б,В). Примечательно, что из трех доменов белка NS5A лишь домен 1 обладает определенной трехмерной структурой [9], в то время как домены 2 и 3 неструктурированы [10, 11]. Наши данные также свидетельствуют о том, что именно домен 1 обладает прооксидантной активностью [7]. Кроме того, показано, что способность белка NS5A активировать

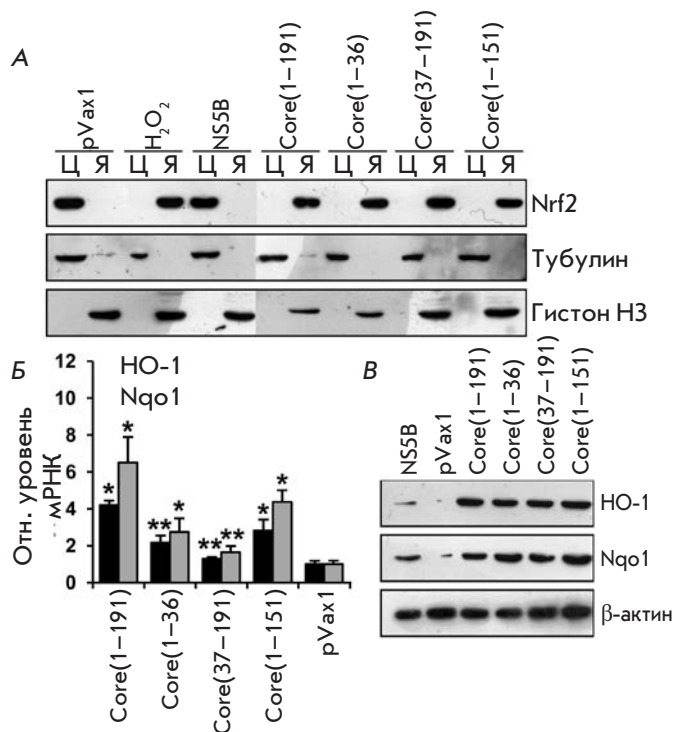


**Рис. 1.** Активация каскада Nrf2 / ARE доменом 1 белка NS5A приводит к транслокации фактора транскрипции Nrf2 из цитоплазмы в ядро (А) и активации экспрессии генов, кодирующих NAD(P)H:хинооксидоредуктазу 1 (Nqo1) и гемоксигеназу (HO-1) человека (Б, В). Внутриклеточную локализацию фактора Nrf2 определяли путем разделения фракций цитоплазматических (Ц) и ядерных (Я) белков и детекции фактора Nrf2 в них методом иммуноблоттинга. Уровни экспрессии Nqo1 и HO-1 оценивали методами обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (Б) и иммуноблоттинга (В). \* $p < 0.01$  и \*\* $p < 0.05$  по сравнению с pVax1

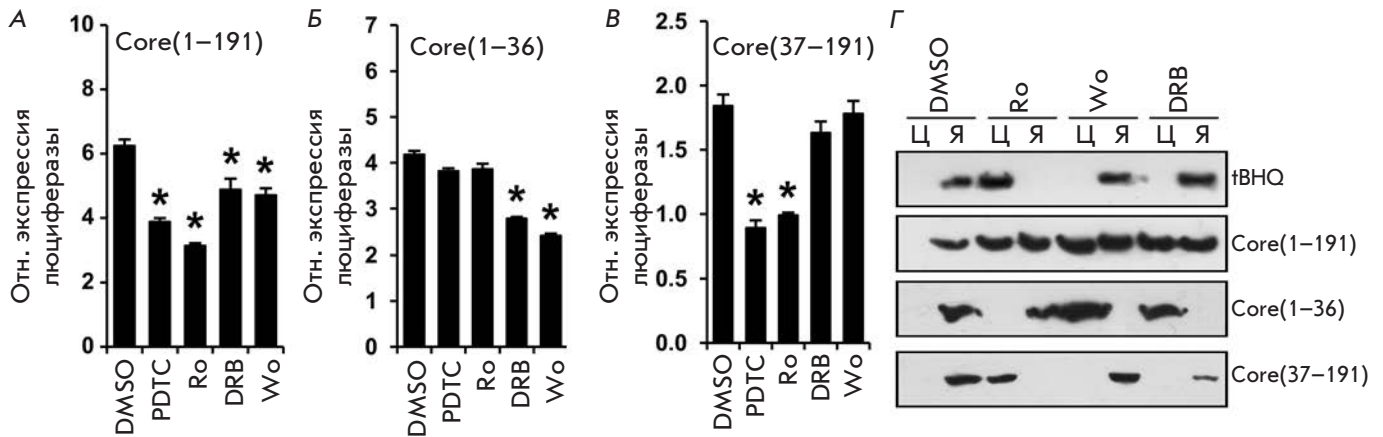
каскад Nrf2/ARE не связана ни с его посттрансляционной модификацией – фосфорилированием доменов 2 и 3 [12], ни со способностью нарушать экспрессию интерферона  $\beta$  в ответ на ВГС-инфекцию [1].

Для изучения вклада различных фрагментов белка капсида (1–191 а.о.) в активацию каскада Nrf2/ARE использовали его укороченные фрагменты 1–36 и 37–191 а.о., каждый из которых проявил способность вызывать окислительный стресс с помощью различных механизмов [8]. Кроме того, использовали фрагмент 1–151 а.о., который активировал все АФК-продуцирующие ферменты, как и полноразмерный белок капсида, но локализовался не на эндоплазматическом ретикулуме, а в ядре, как и форма 1–36. Установлено, что все укороченные формы белка капсида активировали фактор Nrf2 (рис. 2А) и экспрессию Nrf2-зависимых генов (рис. 2Б,В). Таким образом, в структуре белка капсида есть как минимум два участка, обладающих способностью активировать каскад Nrf2/ARE.

Известно, что активация каскада Nrf2/ARE может происходить при участии разнообразных протеинкиназ, включая протеинкиназу С, казеинкиназу 2, фосфоинозитид-3-киназу, р38, митоген-активируемые протеинкиназы ERK1/2 и JNK и киназу гликогенсинтазы 3 (GSK3), причем вклад каждой киназы зависит от стимула и типа клеток ([3, 4] и ссылки в них). В случае каждого фрагмента белка для установления механизма активации использовали антиоксидант пирролидиндитиокарбамат (PDTC), а также ингибиторы протеинкиназы С (Ro 31-8220, Ro), казеинкиназы 2 (DRB) и фосфоинозитид-3-киназы (вортманнин, Wo), т.е. тех ферментов, которые, по нашим данным, участвуют в активации Nrf2 полноразмерным белком NS5A. Используя репор-



**Рис. 2.** Фрагменты 1–36 а.о. и 37–191 а.о. белка капсида (Core) вируса гепатита С активируют каскад Nrf2/ARE, вызывая перенос фактора транскрипции Nrf2 из цитоплазмы в ядро (А) и активируя экспрессию генов, кодирующих NAD(P)H:хинооксидоредуктазу 1 (Nqo1) и гемоксигеназу (HO-1) человека (Б, В). Внутриклеточную локализацию фактора Nrf2 определяли, разделяя фракции цитоплазматических (Ц) и ядерных (Я) белков и определяя фактор Nrf2 в них методом иммуноблоттинга. Уровни экспрессии Nqo1 и HO-1 оценивали с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (Б) и иммуноблоттинга (В). \* $p < 0.01$  и \*\* $p < 0.05$  по сравнению с pVax1



**Рис. 3.** Фрагмент 1–36 а.о. белка капсида (Core) активирует каскад Nrf2/ARE по АФК-независимому механизму при участии казеинкиназы 2 и фосфоинозитид-3-киназы, а фрагмент 37–191 а.о. – по АФК-зависимому механизму при участии протеинкиназы С. Роль киназ и активных форм кислорода оценивали по уровню экспрессии люциферазы в клетках Huh7.5, трансфицированных репортерной плазмидой рР-ARE, и конструкций, кодирующих полноразмерный (А) белок капсида или его фрагменты 1–36 а.о. (Б) или 37–191 а.о. (В), или анализом внутриклеточной локализации фактора Nrf2 (Г). Внутриклеточную локализацию фактора Nrf2 определяли, выделяя фракции цитоплазматических (Ц) и ядерных (Я) белков и определяя фактор Nrf2 в них методом иммуноблоттинга. Через 18 ч после трансфекции в культуральную среду добавляли ингибиторы протеинкиназ Ro 31-8220 (Ro, ингибитор протеинкиназы С), DRB (ингибитор казеинкиназы 2) или вортманнин (Wo, ингибитор фосфоинозитид-3-киназы) индивидуально или совместно с антиоксидантом пирролидиндитиокарбаматом (PDTC). \**p* < 0.01

терную плазмиду рР-ARE, кодирующую люциферазу под контролем минимального ARE-элемента гена *Nqo1* человека [4], показано, что и фрагмент 1–36, и фрагмент 37–191 действительно активируют транскрипцию ARE-зависимых генов. Обработка антиоксидантом или ингибитором протеинкиназы С снижала уровень экспрессии люциферазы в случае полноразмерного белка капсида (рис. 3А) и предотвращала активацию в случае фрагмента 37–191 а.о. (рис. 3В). В клетках, экспрессирующих N-концевой фрагмент, экспрессию люциферазы блокировали только ингибиторы казеинкиназы и фосфоинозитид-3-киназы (рис. 3Б). Аналогичные результаты получены и при изучении действия ингибиторов протеинкиназ на транслокацию фактора Nrf2 (рис. 3Г). Примечательно, что в случае полноразмерного белка капсида ингибиторы всех трех протеинкиназ не предотвращали перенос Nrf2 в ядро, а лишь примерно в 2 раза снижали его, что свидетельствует о сопоставимом вкладе двух рассмотренных механизмов активации каскада.

Полученные нами данные о том, что N-концевой домен белка капсида ВГС активирует Nrf2 по АФК-независимому механизму при участии казеинкиназы 2 и фосфоинозитид-3-киназы, а фрагмент 37–191 – по АФК-зависимому пути при участии протеинкиназы С, позволили подтвердить полную независи-

мость этих двух механизмов. Более того, активация казеинкиназы 2 и фосфоинозитид-3-киназы происходит под действием того же домена белка капсида, который взаимодействует с различными белками клетки-хозяина, включая хеликазу DDX3, фактор транскрипции STAT1 и рецептор лимфотоксина β ([1, 8] и ссылки в них). Кроме того, оба механизма активации каскада Nrf2/ARE запускались как при локализации различных вариантов белка капсида в ядре (фрагменты 1–36 и 1–151), так и при локализации на поверхности эндоплазматического ретикулума (фрагменты 37–191 и 1–191). Это говорит о возможном запуске каскада в процессе биосинтеза белка капсида в эндоплазматическом ретикулуме.

### ВЫВОДЫ

В данной работе впервые установлены участки первичной структуры белков капсида и NS5A, активирующие каскад Nrf2/ARE. Показано, что АФК-зависимый и АФК-независимый механизмы этой активации не имеют общих регуляторов. ●

*Исследование влияния белков вируса на Nrf2/ARE-каскад выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-01021) (А.И.). Международное сотрудничество исследователей, включая работы*

*по конструированию плазмид, кодирующих белок капсида и его фрагменты, поддержано грантом Тематического партнерства Шведского института 09272\_2013. Юрис Янсонс частично*

*поддержан грантом VACTRAIN № 692293, Мария Исагуляню – грантом по координации и поддержке исследований BALTINFECT № 316275 программы Горизонты 2020.*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Lemon S.M., Walker C.M., Alter M.J., Yi M.-K. Hepatitis C virus // *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007. P. 1253–1304.
2. Ivanov A.V., Bartosch B., Smirnova O.A., Isagulians M.G., Kochetkov S.N. // *Viruses*. 2013. V. 5. № 2. P. 439–469.
3. Zhang M., An C., Gao Y., Leak R.K., Chen J., Zhang F. // *Prog. Neurobiol.* 2013. V. 100. P. 30–47.
4. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isagulians M.G. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 9. P. e24957.
5. Okuda M., Li K., Beard M.R., Showalter L.A., Scholle F., Lemon S.M., Weinman S.A. // *Gastroenterology*. 2002. V. 122. № 2. P. 366–375.
6. Gong G., Waris G., Tanveer R., Siddiqui A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 17. P. 9599–9604.
7. Smirnova O.A., Ivanova O.N., Bartosch B., Valuev-Elliston V.T., Mukhtarov F., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. // *Oxid Med. Cell Longev*. 2016. V. 2016. P. 8341937.
8. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Petrushanko I.Y., Ivanova O.N., Karpenko I.L., Alekseeva E., Sominskaya I., Makarov A.A., Bartosch B., Kochetkov S.N., et al. // *Viruses*. 2015. V. 7. № 6. P. 2745–2770.
9. Tellinghuisen T.L., Marcotrigiano J., Rice C.M. // *Nature*. 2005. V. 435. № 7040. P. 374–379.
10. Hanouille X., Verdegem D., Badillo A., Wieruszkeski J.M., Penin F., Lippens G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 381. № 4. P. 634–638.
11. Liang Y., Ye H., Kang C.B., Yoon H.S. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. № 41. P. 11550–11558.
12. Huang Y., Staschke K., De Francesco R., Tan S.L. // *Virology*. 2007. V. 364. № 1. P. 1–9.



УДК 577.1

# Дериватизация аминогликозидных антибиотиков трис(2,6-диметоксифенил)метилием

А. П. Топольян<sup>1</sup>, М. А. Беляева<sup>1</sup>, Е. Е. Быков<sup>2</sup>, П. В. Кудан<sup>3</sup>, Е. А. Рогожин<sup>1,2</sup>,  
Д. А. Стрижевская<sup>1</sup>, О. М. Иванова<sup>1</sup>, А. В. Устинов<sup>1</sup>, И. В. Михура<sup>1</sup>, И. А. Прохоренко<sup>1,2</sup>,  
В. А. Коршун<sup>1,2</sup>, А. А. Формановский<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11

<sup>3</sup>Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии, 109240, Москва, Устьинский пр., 4/14

\*E-mail: formanovsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.01.2016

Принята к печати 20.04.2016

**РЕФЕРАТ** Детекция аминогликозидных антибиотиков как методами масс-спектрометрии, так и высокоэффективной жидкостной хроматографии представляет серьезную проблему, поскольку а) углеводная природа молекул снижает их способность к ионизации по сравнению с другими органическими молекулами, особенно в методе МАЛДИ-МС; б) отсутствие в молекулах ароматических фрагментов и амидных связей делает невозможным применение обычных УФ-детекторов в ВЭЖХ. Разработанный нами ранее подход для дериватизации аминов с использованием трис(диметоксифенил)метилиевых солей успешно применен для селективной модификации аминогликозидных антибиотиков. Модификация происходит по аминогруппе при первичном атоме углерода; присоединяемый остаток имеет ароматическую природу и несет перманентный положительный заряд, что позволяет легко детектировать аминогликозидные антибиотики методами масс-спектрометрии и обращенно-фазовой ВЭЖХ как в индивидуальном виде, так и в смесях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аминогликозидные антибиотики, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, тритильный катион.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ГХ-МС – газовая хроматография/масс-спектрометрия; ИФА – иммуноферментный анализ; МАЛДИ-МС (MALDI MS) – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией; НСМО (LUMO) – низшая свободная молекулярная орбиталь; ТСХ – тонкослойная хроматография; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; СНСА – 1-циано-*n*-гидроксикоричная кислота; DMSO – диметилсульфоксид.

## ВВЕДЕНИЕ

Аминогликозиды представляют собой класс бактерицидных антибиотиков (преимущественно активных в отношении аэробной грамотрицательной микрофлоры, высокоэффективных при большинстве тяжелых инфекций (туберкулез, эндокардит, сепсис)) [1]. Действие аминогликозидов не зависит от фазы размножения микроорганизма, они необратимо связываются с белками 30S субъединицы бактериальных рибосом, нарушая тем самым синтез белка в них. Однако необходимость аэробных условий делает их применение менее эффективным в плохо снабжаемых кровью и омертвевших тканях. Еще одним фактором, влияющим на бактерицидную активность

аминогликозидов, оказывается рН среды – в кислой и нейтральной средах они менее эффективны, чем в слабощелочной среде. Главным недостатком этой группы лекарств является их высокая ото- и нефротоксичность [2, 3] по сравнению с другими антибиотиками, что требует проведения постоянного контроля их содержания не только в биологических жидкостях, но и в продуктах питания животного происхождения. За несколько десятилетий использования этих антибиотиков в клинической медицине разработано большое число лабораторных методов детекции аминогликозидов (с использованием ГХ-МС, ВЭЖХ, в том числе с дериватизацией, ИФА, капиллярного электрофореза и т.п.). Совсем недавно опубликованы

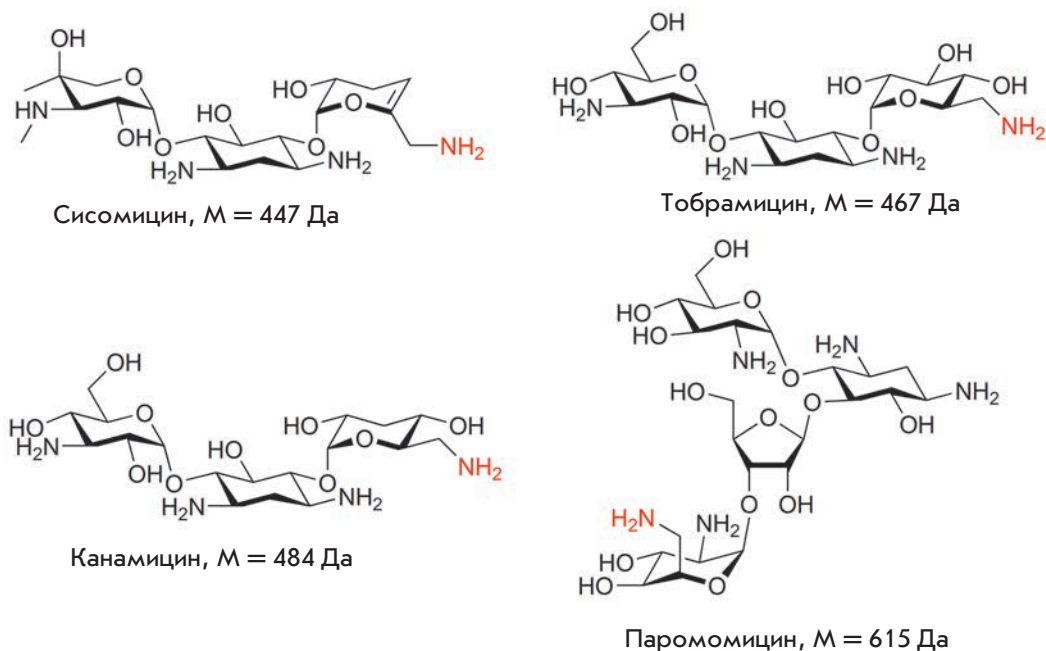


Рис. 1. Примеры структур аминогликозидных антибиотиков

два достаточно подробных обзора по этой тематике [4, 5]. Большое число публикаций [6–18] свидетельствует об актуальности проблемы и необходимости поиска удобных, простых и быстрых процедур, поскольку большинство существующих оказываются либо трудоемкими и долгими, либо предполагают использование дорогостоящих реагентов.

Молекулы аминогликозидных антибиотиков, как правило, содержат несколько аминогрупп (рис. 1). Помимо аминогрупп, непосредственно связанных с гетероциклом или алициклом, молекулы содержат аминогруппы, связанные с первичным атомом углерода (выделены красным цветом). Другая особенность аминогликозидов – прозрачность их растворов в УФ-диапазоне, поскольку в их молекулах отсутствуют сопряженные связи или ароматические фрагменты. Поэтому их невозможно анализировать с помощью ВЭЖХ с УФ-детектором. Обилие гидроксильных групп и аминогрупп, способных образовывать водородные связи, затрудняет высвобождение индивидуальных молекул, что сильно снижает эффективность ионизации аминогликозидов в масс-спектрометрии, например, по сравнению с пептидами близкой массы. Кроме того, обнаружение аминогликозидов в МАЛДИ масс-спектрометрии может осложняться попаданием сигналов вещества в область «шумов» матрицы.

Недавно нами был разработан мягкий метод дериватизации низкомолекулярных аминов реакцией

с катионом трис(2,6-диметоксифенил)метилия **1** [19]. Образующиеся производные 9,10-дизамещенного акридиниевого катиона ( $Q^+-R$ ) обладают перманентным положительным зарядом (рис. 2). В результате дериватизации происходит также увеличение массы молекулы на постоянную величину (инкремент массы +359 Да), что позволяет успешно детектировать методом масс-спектрометрии МАЛДИ амины даже самой малой массы [19]. В то же время модификация гидрофильных алифатических молекул гидрофобным ароматическим катионом  $Q^+$  может иметь перспективы с точки зрения обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детекцией.

Представляло интерес выяснить применимость этого метода для определения данного класса лекарственных препаратов. В настоящей работе представлен качественный метод обнаружения дериватизи-

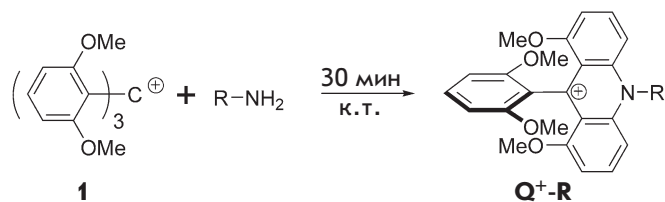


Рис. 2. Общая схема метода дериватизации аминов с использованием трис(2,6-диметоксифенил)метилевых солей (тетрафторбората или гексафторфосфата)

рованных неотщепляемой масс-спектрометрической меткой аминокликозидных антибиотиков с помощью масс-спектрометрии и ВЭЖХ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

В работе использовали следующие растворители: диметилсульфоксид, ацетонитрил (Panreac), остальные растворители – отечественного производства («Химмед» и «ЭКОС-1») квалификации «х. ч.» (гексан, метанол, дихлорметан, этилацетат, хлороформ, этанол) и «ос. ч.» (толуол, ацетон). Дихлорметан перегоняли над гидридом кальция, ДМФА перегоняли над гидридом кальция в вакууме и хранили над молекулярными ситами 3Å. Реактивы и сорбенты: триэтиламин, 1,3-диметоксибензол, *n*-бутиламин (Sigma-Aldrich-Fluka, США), аминокликозидные антибиотики канамицин (ОАО «Биохимик», г. Саранск, Россия), сисомицин, тобрамицин, паромомицин (Минхимпром СССР), алюминиевые пластины для тонкослойной хроматографии со слоем силикагеля (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) или оксида алюминия, силикагель и оксид алюминия (активность I) для колоночной хроматографии (Merck, США).

### Оборудование и условия

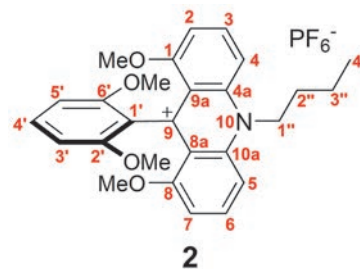
1D и 2D (COSY, HMBSC, HSQC) спектры ЯМР регистрировали при 500 МГц (<sup>1</sup>H), 125.7 МГц (<sup>13</sup>C) на спектрометре Bruker AC-500. Спектры калиброваны по остаточным сигналам протонов растворителя, DMSO-*d*<sub>6</sub> (δ<sub>H</sub> 2.50 м.д. и δ<sub>C</sub> 39.7 м.д.) или CD<sub>3</sub>CN (δ<sub>H</sub> 1.94 м.д. для <sup>1</sup>H и δ<sub>C</sub> 1.32 м.д.); химические сдвиги приведены относительно SiMe<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C). Визуализацию ТСХ-пластин проводили с помощью ультрафиолетовой лампы при 254 и 360 нм. Масс-спектры регистрировали с использованием времяпролетного масс-анализатора Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером (длина волны 337 нм), работающим при частоте 50 Гц в режиме регистрации положительно заряженных ионов с применением рефлектрона. Анализ и препаративное разделение модифицированных аминокликозидных антибиотиков проводили с помощью ОФ-ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила на хроматографе Agilent Technologies 1200 Series на обращенно-фазовой колонке Synergi Polar RP (4.5 × 250 мм) в следующих условиях: скорость потока 0.9 мл/мин, 15–50% 80% MeCN + 0.1% TFA за 30 мин, 50–70% за 20 мин, 70–90% за 10 мин, 90% за 5 мин, изократич. в течение 5 мин. Поглощение определяли при 285 нм. Анализ конверсии соединения (1) в соединение (2) проводили с помощью ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила на хроматографе Agilent 1100 Series с мульт-

тиволным детектором на основе диодной матрицы на обращенно-фазовой колонке Symmetry C<sub>8</sub>, Waters в следующих условиях: скорость потока 1 мл/мин, градиент ацетонитрила – от 50 до 70% за 20 мин, от 70 до 98% за 10 мин.

Для проведения дериватизации, растворения анализов и матричных соединений использовали ацетонитрил (HPLC-grade, J.T. Baker), метанол (HPLCgrade, Merck), хлороформ (HPLC-grade, Merck), ультрачистую воду типа I, полученную с использованием системы Milli-Q (Millipore). В качестве матриц применяли 2,5-дигидроксibenзойную, синапиновую и 1-циано-4-гидроксикоричную кислоты (раствор 20 мг/мл в ацетонитриле с добавкой 0.1% трифторуксусной кислоты). Раствор образца (0.5 мкл) в смеси с раствором матрицы (0.5 мкл) наносили в лунку стальной мишени (MTP 384 massive target gold plate T, Bruker Daltonics, Германия) и высушивали на воздухе.

### Гексафторфосфат трис(2,6-диметоксифенил)-карбения (1) [20–22]

К раствору 1,3-диметоксибензола (10.0 г, 72.4 ммоль) в 100 мл тетрагидрофурана при перемешивании в атмосфере аргона и охлаждении до –20°C прибавляли по каплям 2.5 М раствор *n*-бутиллития (30 мл, 76 ммоль). Через 1 ч медленно добавляли раствор диэтилкарбоната (2.85 г, 24 ммоль) в тетрагидрофуране (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 сут. Растворитель удаляли при пониженном давлении. К остатку при перемешивании добавляли 200 мл диэтилового эфира, 50 мл дихлорметана и 30 мл HPF<sub>6</sub>. Через 3 ч растворитель удаляли при пониженном давлении, затирали в 300 мл диэтилового эфира и отделяли выпавшие фиолетовые кристаллы. Получали 31.0 г (76%) соединения 1. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (CD<sub>3</sub>CN, δ<sub>H</sub>, м.д.): 3.55 (м, 18H, OCH<sub>3</sub>), 6.61 (6д, 6H, J 8.54 Гц), 7.63 (3т, 3H, J 8.54 Гц). Масс-спектр (МАЛДИ, m/z, CHCA): 423.15.



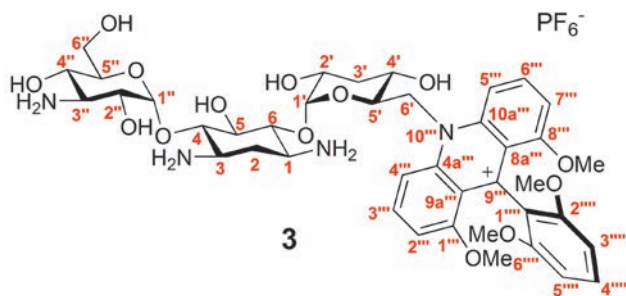
### Гексафторфосфат 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(бутил)акридиния (2)

К раствору гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)метилия (1) (1.0 г, 1.76 ммоль) в ацетонитриле (15 мл) при перемешивании при комнатной темпе-

ратуре в атмосфере аргона добавляли *n*-бутиламин (350 мкл, 3.52 ммоль). Цвет раствора изменялся от фиолетового к красному. Через 1 ч растворитель удаляли при пониженном давлении, твердый осадок затирали в диэтиловом эфире, образовавшийся красный осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе при пониженном давлении. Получали 1.0 г соединения **2** (98%). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (CD<sub>3</sub>CN, δ<sub>H</sub>, м. д.): 1.15 (т, 3H, J 7.3 Гц, H-4"), 1.73–1.80 (м, 2H, H-3"), 2.16–2.22 (м, 2H, H-2"), 3.57 (с, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.59 (с, 6H, OCH<sub>3</sub>), 5.06–5.09 (м, 2H, H-1"), 6.81 (д, 2H, J 8.5 Гц, H-3', H-5'), 7.12 (д, 2H, J 8.2 Гц, H-2, H-7), 7.45–7.48 (м, 1H, H-4'), 7.93 (д, 2H, J 9.2 Гц, H-4, H-5), 8.20–8.24 (м, 2H, H-3, H-6). <sup>13</sup>C-ЯМР-спектр (CD<sub>3</sub>CN, δ<sub>C</sub>, м. д.): 12.96 (4"), 19.61 (3"), 29.52 (2"), 52.37 (1"), 55.64 (OCH<sub>3</sub>), 56.76 (OCH<sub>3</sub>), 103.74 (3', 5'), 106.50 (2, 7), 109.26 (4, 5), 119.67 (1'), 119.89 (9), 129.40 (4'), 139.87 (3, 6), 141.61 (1, 8), 155.79 (2', 6'), 157.18 (8a, 9a), 160.58 (4a, 10a). Масс-спектр (МАЛДИ, m/z, CHSA): 432.30.

**Общая методика получения конъюгатов гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)-метилия с аминокуглеводами (аминоглюцитолом, тобрамицином, паромомицином, сисомицином)**

К 150 мкл 0.5 × 10<sup>-2</sup> М раствора гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)метилия в ацетонитриле добавляли 1 экв. соответствующего аминокуглевода в 200 мкл карбонатного буфера (рН 9.55). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Анализ конъюгатов проводили прямо из реакционной смеси без дополнительной очистки.



**Гексафторфосфат 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(6'-дезаканамицин-6'-ил)-акридиния (3)**

К раствору сульфата канамицина (7.8 мг, 0.015 ммоль) в 2 мл буферного раствора (рН 9.55) при перемешивании добавляли 2.8 мг (0.005 ммоль) гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)метилия (**1**) в ацетонитриле. Реакционную смесь выдерживали в течение 30 мин и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ. Получали 10.9 мг соединения (**3**) (74%). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (DMSO-d<sub>6</sub>, δ<sub>H</sub>, м. д.): 1.69–1.72 (м, 1H, H-2), 2.31–2.33 (м, 1H, H-2), 3.17–3.22 (м, 1H, H-3"),

3.36 (м, 1H, H-2'), 3.38 (м, 1H, H-1/H-3), 3.40 (м, 1H, H-4'), 3.45 (м, 1H, H-1/H-3), 3.48 (м, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.50 (м, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.51 (м, 1H, H-3'), 3.52 (м, 1H, H-6"), 3.53 (м, 1H, H-4"), 3.56 (м, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.57 (м, 1H, H4/6), 3.60 (м, 1H, H-6"), 3.66 (м, 1H, H4/6), 3.68 (м, 1H, H-2"), 3.73 (м, 1H, H-5), 3.76 (м, 1H, H-5"), 4.57–4.60 (м, 1H, H-5'), 4.74 (с, 1H, OH), 5.03 (д, J 3.7 Гц, 1H, H-1"), 5.26 (с, 1H, OH), 5.32 (м, 1H, H-1'), 5.35 (м, 1H, H-6'), 5.55 (м, 1H, H-6'), 6.49 (м, 1H, OH), 6.79–6.83 (м, 2H, H-3''', H-5'''), 6.91 (с, 1H, OH), 7.17 (м, 1H, H-2'''), 7.20 (м, 1H, H-7'''), 7.42–7.45 (т, 1H, J 8.5 Гц, H-4'''), 8.18 (м, 1H, H-3'''), 8.19 (м, 1H, H-6'''), 8.33–8.35 (м, 1H, H-5'''), 8.45 (м, 1H, H-4'''). <sup>13</sup>C-ЯМР-спектр (DMSO-d<sub>6</sub>, δ<sub>C</sub>, м. д.): 27.48 (2), 46.78 (1/3), 49.28 (1/3), 53.34 (6'), 55.32 (3'), 55.87 (OCH<sub>3</sub>), 57.06 (OCH<sub>3</sub>), 59.49 (6''), 65.28 (4'), 68.39 (2''), 70.49 (5'), 70.94 (5), 70.98 (2'), 72.33 (4'), 72.58 (3'), 73.08 (5''), 80.33 (6/4), 83.46 (4/6), 95.66 (1'), 99.28 (1''), 103.57 (3'''/5'''), 103.79 (3'''/5'''), 106.50 (2''), 106.75 (7'''), 110.78 (5'''), 111.12 (4'''), 117.60 (1'''), 119.21 (2'''/6'''), 119.30 (2'''/6'''), 129.19 (4'''), 139.08 (3'''), 139.68 (6'''), 142.32 (1'''/8'''), 143.00 (8'''/1'''), 155.65 (9'''), 156.39 (10a'''/4a'''), 158.37 (9a'''/8a'''), 159.63 (8a'''/9a'''), 159.70 (4a'''/10a'''). Масс-спектр (МАЛДИ, m/z, CHSA): 843.67.

**Методика дериватизации смеси антибиотиков**

Смешали по 10 мкл 0.005 М растворов каждого антибиотика (канамицина, сисомицина, тобрамицина и паромомицина) в карбонатном буфере (рН 9.55). К полученному раствору добавили 100 мкл карбонатного буфера (рН 9.55) и 50 мкл 0.005 М раствора соли **1** в ацетонитриле. Пробы для анализа отбирали прямо из реакционной смеси.

**Экспериментальная оценка значения рK<sub>R+</sub> соединения 2 [21, 22]**

Для оценки значения рK<sub>R+</sub> соединения **2** был приготовлен ряд растворов в смеси H<sub>2</sub>O/ DMSO/Bu<sub>4</sub>NOH с различным содержанием DMSO при постоянной концентрации вещества. Стоковый раствор исходного соединения добавляли непосредственно перед спектрофотометрическими измерениями. В сильноосновных условиях в системе присутствуют как карбокатион R<sup>+</sup>, так и его неионизированная форма в виде соответствующего тританола ROH, имеющие максимальное поглощение при различных длинах волн. Полученные значения оптической плотности в области максимального поглощения карбокатиона (λ = 289 нм) использовали для расчета соотношения [R<sup>+</sup>]/[ROH]. Для определения значения рK<sub>R+</sub> были построены зависимости log([R<sup>+</sup>]/[ROH]) от функций основности H<sub>-</sub> и C<sub>-</sub>, значения которых в каждом растворе определяются мольным содержанием DMSO. С учетом погрешности измерений полученное значение рK<sub>R+</sub> составляет 18.1 ± 0.5.



### Квантово-химические расчеты

Структуры участников модельного механизма превращений рассчитывали посредством программного пакета Gaussian-09 [23] полуэмпирическим методом PM3 с полной оптимизацией геометрических параметров молекул реагентов и продуктов. Последующее вычисление частот нормальных колебаний по стандартной процедуре пакета Gaussian-09 показало, что рассчитанные структуры отвечают критериям стационарной точки (минимумы и седловые точки ППЭ). Результаты расчетов визуализировали при помощи программы ChemCraft [24].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения оптимальных условий функционализации аминов была изучена реакция гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)метилия **1** с *n*-бутиламином (рис. 3).

Установлено, что при избытке амина полная конверсия исходного субстрата **1** в единственный продукт **2** завершается уже при комнатной температуре в течение 10 мин в ацетонитриле. Полнота превращения легко контролируется обычной ОФ-ВЭЖХ, поскольку соединение **2** поглощает свет в УФ-диапазоне (рис. 4). Реакция не требует каких-либо специальных условий.

Структура аддукта **2** была подтверждена с помощью 1D и 2D ЯМР-спектроскопии с полным отнесением сигналов в спектрах ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C (см. «Экспериментальную часть»). Механизм образования вещества **2**, по-видимому, включает ипсо-атаку аминогруппы в ортоположение одного из бензольных колец с последующим элиминированием метокси-группы в виде метанола и повторным нуклеофильным замещением во второе кольцо [21].

В сильнощелочной среде окрашенный катион **2** способен присоединять гидроксид-анион и переходить в бесцветный тританол. Один из параметров для оценки стабильности карбокатиона – величина  $pK_{R^+}$ , физический смысл которой заключается в значении pH, при котором равны концентрации катионной (окрашенной) и неокрашенной формы. Для соединения **2** экспериментальная оценка дает значение  $pK_{R^+} \approx 18$ , что свидетельствует об исключительно высокой стабильности катиона: даже в слабощелочных условиях доля катионной формы составляет 100%.

Квантово-химический расчет полуэмпирическим методом PM3 показывает, что для катиона **1** характерна структура пропеллерного типа (рис. 5А). Рассчитанная геометрическая конфигурация катиона **2** (на примере  $Q^+-Et$ ) характеризуется ярко выраженным выведением диметоксифенильной

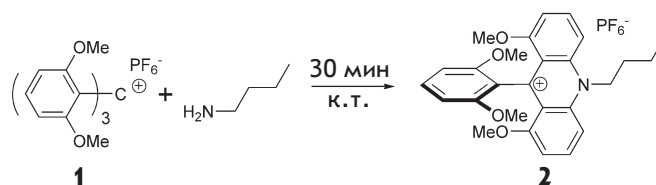


Рис. 3. Схема реакции катиона **1** с *n*-бутиламином

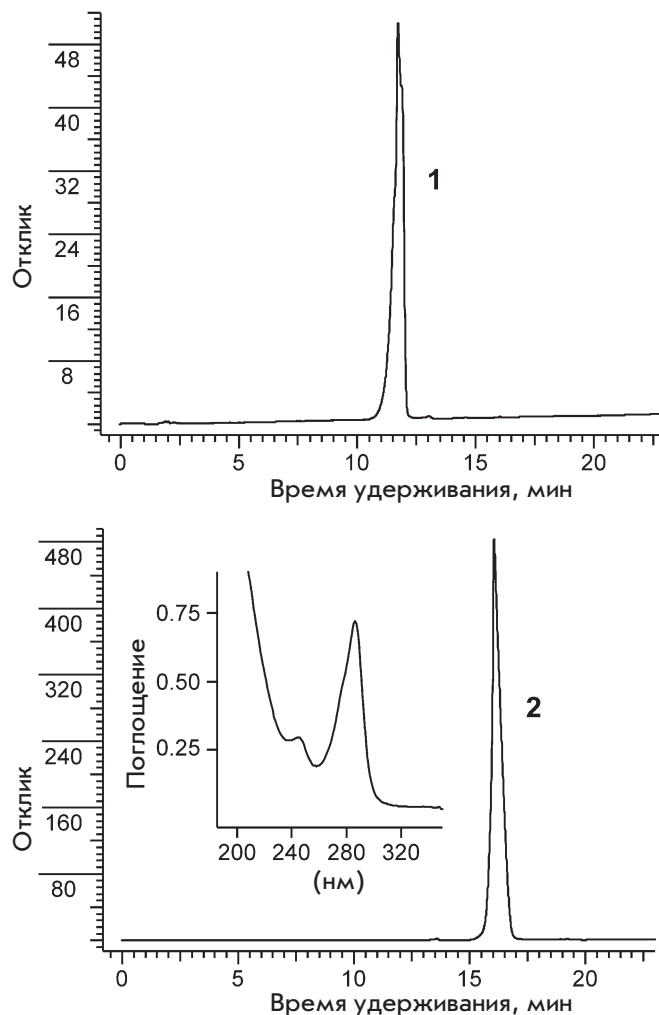


Рис. 4. Профиль ОФ-ВЭЖХ исходного соединения **1** (верхний) и реакционной смеси с **1** с *n*-бутиламином (нижний). Условия – в «Экспериментальной части». На врезке – спектр поглощения вещества **2**

группы в плоскость, ортогональную акридиновому фрагменту, и высокой симметрией (рис. 5Б).

Также были оценены формальные заряды, которые составляют 0.324 на С-атоме и 0.300 на N-атоме центрального кольца акридинового фрагмента. С этим распределением зарядов совпадает и рассчитанная плотность HСМО-орбитали на тех же ато-

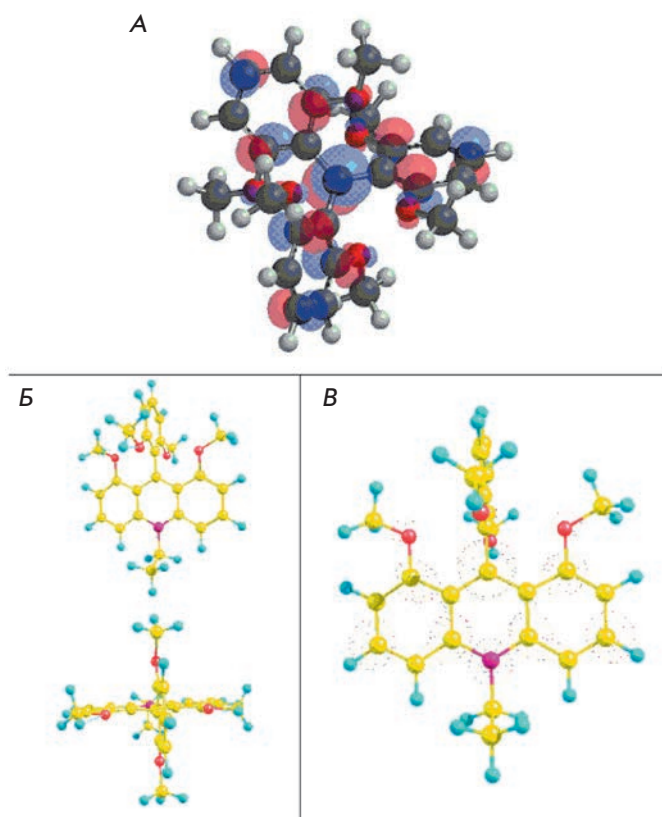


Рис. 5. Рассчитанные методом РМЗ – конфигурация НСМО-орбитали исходного гексаметокситрильного карбокатиона (А); 3D-структура катиона  $Q^+-Et$  (Б); конфигурация НСМО-орбитали катиона  $Q^+-R$  (В). Б и В – атомы углерода показаны желтым цветом, кислорода – красным, азота – розовым, водорода – бирюзовым

мах (рис. 5В). Таким образом, положительный заряд в большей степени локализован на центральном атоме углерода и резонансная структура **2a** лучше отражает строение веществ типа  $Q^+-R$  (рис. 6).

Затем была изучена дериватизация простейшего аминокглевода, аминоклюцитола. Аминоклюцитол в свободном виде невозможно определить методом масс-спектрометрии МАЛДИ из-за небольшой молекулярной массы (181 Да) и затрудненной ионизуемости молекулы. Контролируя методом ТСХ исчезновение пятна исходного аминспирта при действии на него избытка дериватирующего агента, установлено, что реакция проходит за 30 мин при комнатной температуре, и в спектре МАЛДИ-МС виден четкий сигнал, соответствующий ожидаемой массе конъюгата (рис. 7).

Для изучения возможности аналогичной дериватизации аминоклюцидных антибиотиков мы выбрали канамицин, сисомидин, паромомидин, тобрамицин

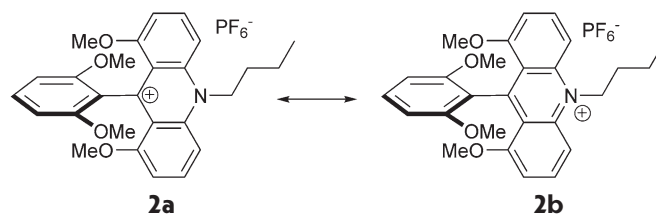


Рис. 6. Резонансные структуры соединения **2**

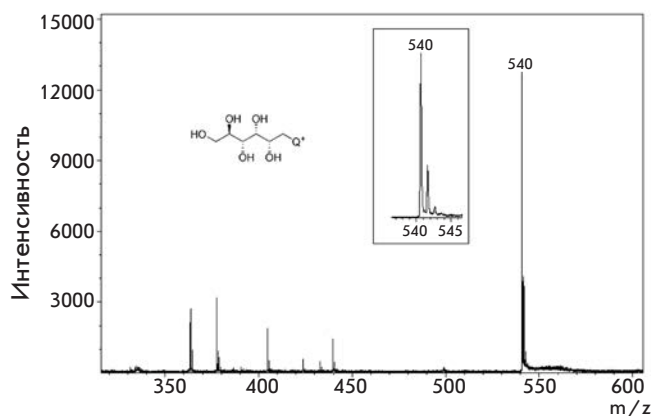


Рис. 7. Масс-спектр МАЛДИ конъюгата **1** с аминоклюцитолом (матрица – синапиновая кислота)

(рис. 1). Поскольку коммерчески доступный препарат канамицина выпускается в форме сульфата канамицина, образец был растворен в карбонатном буфере (рН 9.55). Как и в случае с *n*-бутиламином, реакция идет практически с полной конверсией (рис. 8).

Особенностью строения исследуемых аминоклюцидов является присутствие нескольких аминоклюцидов, и модификация может проходить по любой из них. Однако реакция протекает гладко и дает один основной продукт (рис. 8), который был выделен препаративно методом ОФ-ВЭЖХ. Анализ 2D ЯМР-спектров вещества **3** показал, что дериватизация проходит селективно по аминоклюциде первичного атома углерода (см. «Экспериментальную часть»). По-видимому, это связано с более высокой стерической доступностью этой аминоклюциды по сравнению с аминоклюцидами, непосредственно связанными с атомами углерода шестичленных циклов и экранированными соседними гидроксильными группами.

Продукт дериватизации легко детектируется масс-спектрометрически: при нанесении в ячейку мишени масс-спектрометра  $2 \times 10^{-12}$  моль конъюгата **3** в спектре МАЛДИ-МС (рис. 9) наблюдается соответствующий сигналу вещества отчетливый пик с высоким соотношением сигнал/шум. Стоит отме-

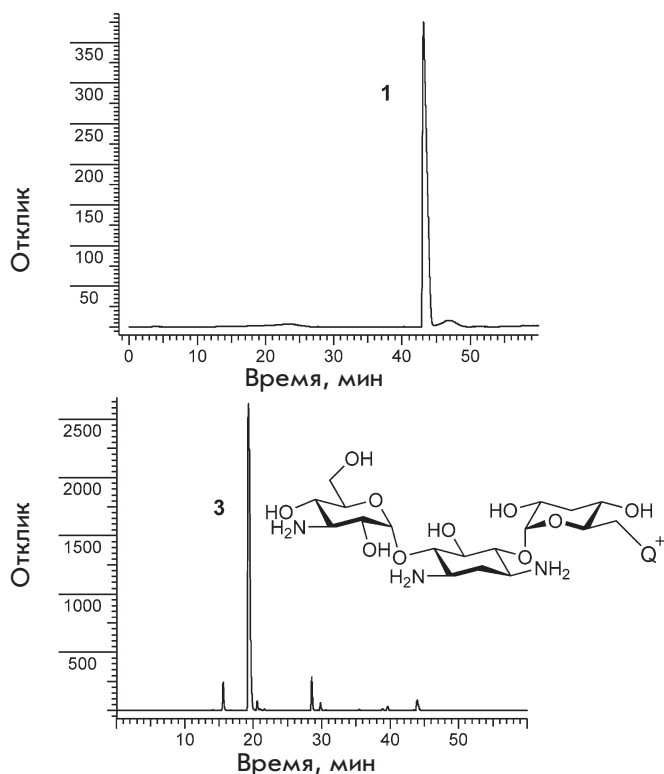


Рис. 8. Профиль ВЭЖХ соединения **1** (верхний) и конъюгата **3** (**1** с канамицином) (нижний). Условия см. в «Экспериментальной части»

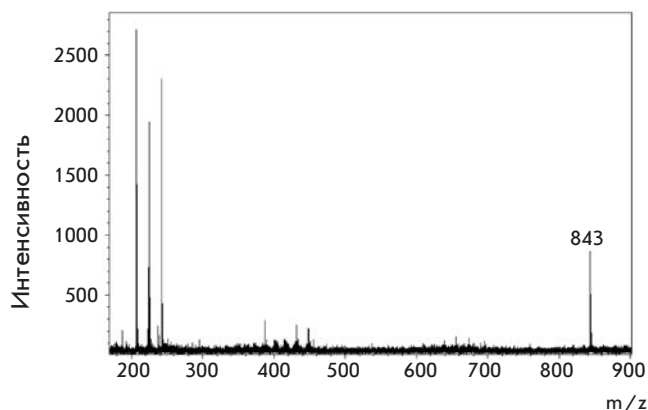


Рис. 9. Пик в масс-спектре конъюгата **3** при нанесении  $2 \times 10^{-12}$  моль вещества в ячейку мишени для масс-спектрометра (матрица – синапиновая кислота) (s/n 47.2)

тить, что увеличение массы исследуемого вещества на 359 Да позволяет сместить сигнал в спектре в сторону бóльших значений, что исключает перекрывание с сигналами матрицы.

Чтобы ответить на вопрос, как дериватизация влияет на чувствительность обнаружения канамицина в МАЛДИ-МС, был проведен эксперимент по со-

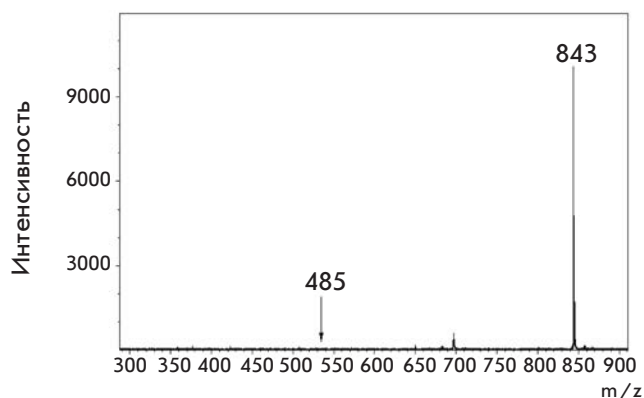


Рис. 10. Спектр МАЛДИ-МС эквимольной смеси соединения **3** ( $m/z$  843 (s/n 301.3)) и немодифицированного канамицина ( $m/z$  485 (s/n 1.8)  $[M+H]^+$ ) (матрица – синапиновая кислота)

вместной детекции канамицина и продукта его дериватизации. На рис. 10 представлен спектр МАЛДИ-МС эквимольной смеси немодифицированного канамицина и соединения **3**.

Интенсивность пика тритил/акридиниевого производного настолько высокая, что превосходит интенсивность пика немодифицированной антибиотика не менее чем на два порядка, и визуально полностью нивелирует его. При увеличении соотношения канамицин/канамицин- $Q^+$  до 200 : 1 видно, что интенсивности сигналов становятся одного порядка, но интенсивность пика производного **3** все равно превосходит таковую для немодифицированного соединения (рис. 11). Таким образом,  $Q^+$ -дериватизация снижает предел обнаружения канамицина в МАЛДИ-МС на несколько порядков.

При обработке канамицина избытком соли **1** продуктом все равно остается соединение **3**: реакционная способность остальных аминогрупп значительно уступает активности группы  $-CH_2NH_2$ . Это свойство было использовано для одновременной детекции нескольких аминогликозидных антибиотиков с помощью масс-спектрометрии. На смесь четырех антибиотиков действовали избытком соли **1** и регистрировали МАЛДИ-масс-спектр образующихся аддуктов (рис. 12). В полученном масс-спектре видны сигналы аддуктов канамицин- $Q^+$  (**3**) ( $m/z$  843, s/n 142.8), сисомицин- $Q^+$  ( $m/z$  806, s/n 166.4), тобрамицин- $Q^+$  ( $m/z$  826, s/n 233.2) и паромомицин- $Q^+$  ( $m/z$  974, s/n 56.7).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный метод дериватизации аминоксодержащих углеводов позволяет определять их с помощью масс-спектрометрии МАЛДИ и ОФ-ВЭЖХ

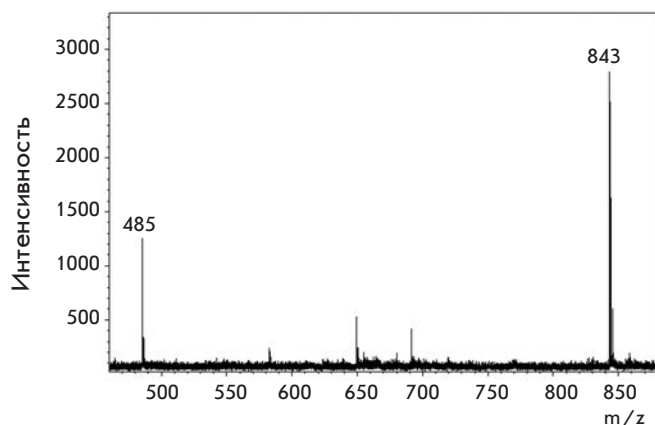


Рис. 11. Спектр МАЛДИ-МС смеси канамицина ( $m/z$  485 ( $s/n$  49.1)  $[M+H^+]$ ) и конъюгата **3** ( $m/z$  843 ( $s/n$  89.5)) в соотношении концентраций 200 : 1 (0.01 М : 0.00005 М) (наносили по 0.9 мкл каждого) (матрица – 1-циано-4-гидроксикоричная кислота)

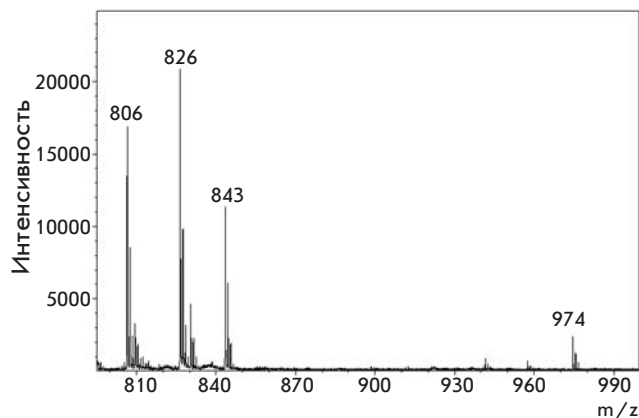


Рис. 12. Спектр МАЛДИ-МС смеси модифицированных антибиотиков (матрица – синапиновая кислота). Условия в «Экспериментальной части»

с УФ-детектором. Показано, что модификация идет по аминогруппе, связанной с первичным атомом углерода. Дериватизация позволяет увеличить чувствительность масс-спектрометрической детекции аминогликозидов на несколько порядков. Преимуществами метода являются экспрессность, экспериментальная простота и доступность реагентов. ●

Авторы выражают благодарность Н.В. Бовину за предоставленный аминоклюцитол и Р.С. Борису за полезное обсуждение. Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Siegenthaler W.E., Bonetti A., Luthy R. // Am. J. Med. 1986. V. 80. № 6B. P. 2–14.
- Jackson J., Chen C., Buising K. // Curr. Opin. Infect. Dis. 2013. V. 26. № 6. P. 516–525.
- Becker B., Cooper M.A. // ACS Chem. Biol. 2013. V. 8. № 1. P. 105–115.
- Tian Y., Chen G., Guo L., Guo X., Mei X. // Food Anal. Meth. 2015. V. 8. № 7. P. 1842–1857.
- Farouk F., Azzazy H.M.E., Niessen W.M.A. // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 890. P. 21–43.
- Diez C., Guillarme D., Spörri A.S., Cognard E., Ortelli D., Edder P., Rudaz S. // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 882. P. 127–139.
- Li R., Liu Y., Cheng L., Yang C., Zhang J. // Anal. Chem. 2014. V. 86. № 19. P. 9372–9375.
- Zengin A., Tamer U., Caykara T. // Anal. Chim. Acta. 2014. V. 817. P. 33–41.
- Котова В.Ю., Рыженкова К.В., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. // Прикл. биохим. микробиол. 2014. Т. 50. № 1. С. 112–117.
- Dijkstra J.A., Sturkenboom M.G.G., van Hateren K., Koster R.A., Greijdanus B., Alffenaar J.-W.C. // Bioanalysis. 2014. V. 6. № 16. P. 2125–2133.
- Li D., He S., Deng Y., Ding G., Ni H., Cao Y. // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2014. V. 93. № 1. P. 47–52.
- Sharma T.K., Ramanathan R., Weerathunge P., Mohammad-taheri M., Daima H.K., Shukla R., Bansal V. // Chem. Commun. 2014. V. 50. № 100. P. 15856–15859.
- Bijleveld Y., de Haan T., Toersche J., Jorjani S., van der Lee J., Groenendaal F., Dijk P., van Heijst A., Gavilanes A.W.D., de Jonge R., et al. // J. Chromatogr. B. 2014. V. 951/952. P. 110–118.
- Korany M.A.-T., Haggag R.S., Ragab M.A., Elmallah O.A. // J. Chrom. Sci. 2014. V. 52. № 8. P. 837–847.
- Воронежцева О.В., Ермолаева Т.Н. // Сорбц. хром. проц. 2011. Т. 11. № 1. С. 68–76.
- Левин Г.Я., Соснина Л.Н. // Антибиот. химиотер. 2014. Т. 59. № 3/4. С. 10–11.
- Chen J., Li Z., Ge J., Yang R., Zhang L., Qu L., Wang H., Zhang L. // Talanta. 2015. V. 139. P. 226–232.
- Wang Y., Ji S., Zhang F., Zhang F., Yang B., Liang X. // J. Chromatogr. A. 2015. V. 1403. P. 32–36.
- Топольян А.П., Стрижевская Д.А., Слюндина М.С., Беляева М.А., Иванова О.М., Коршун В.А., Устинов А.В., Михура И.В., Формановский А.А., Борисов Р.С. // Масс-спектрометрия. 2015. Т. 12. № 4. С. 253–258.
- Martin J.C., Smith R.G. // J. Am. Chem. Soc. 1964. V. 86. № 11. P. 2252–2256.
- Laursen B.W., Krebs F.C. // Chem. Eur. J. 2001. V. 7. № 8. P. 1773–1783.
- Laursen B.W., Krebs F.C., Nielsen M.F., Bechgaard K., Christensen J.B., Harrit N. // J. Am. Chem. Soc. 1998. V. 120. № 47. P. 12255–12263.
- Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., et al. // Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- <http://www.chemcraftprog.com/>



УДК 577.112; 577.181

# Мини-бактенецины ChVac7.5N $\alpha$ и ChVac7.5N $\beta$ – антимикробные пептиды из лейкоцитов козы *Capra hircus*

О. В. Шамова<sup>1,3</sup>, Д. С. Орлов<sup>1,3</sup>, М. С. Жаркова<sup>1</sup>, С. В. Баландин<sup>2</sup>, Е. В. Ямщикова<sup>1</sup>,  
Д. Кнаппе<sup>4</sup>, Р. Хоффманн<sup>4</sup>, В. Н. Кокряков<sup>1,3</sup>, Т. В. Овчинникова<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

<sup>4</sup>Leipzig University, Deutscher Platz 5, D-04103 Leipzig, Germany

\*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 10.11.2015

Принята к печати 10.03.2016

**РЕФЕРАТ** Антимикробные пептиды (АМП) нейтрофилов играют важную роль в осуществлении защитных функций организма человека и животных. Из лейкоцитов домашней козы *Capra hircus* нами выделены два пептида (средние молекулярные массы 2895.5 и 2739.3 Да), обладающие высокой антимикробной активностью и представляющие собой N-концевые фрагменты (1–22 и 1–21) пролин-богатого пептида бактенецина 7.5 козы, структура гена которого представлена в базах данных, но соответствующий белковый продукт до настоящего времени не был выделен. Полученные АМП названы мини-бактенецинами (mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-ChVac7.5N $\beta$ ) по аналогии с описанным ранее C-концевым фрагментом бактенецина 7.5, выделенным из лейкоцитов овцы [Anderson, Yu, 2003]. Мини-бактенецины козы в концентрации 0.5–4 мкМ проявляют высокую антимикробную активность в отношении грамотрицательных бактерий, включая устойчивые к ряду применяемых в медицине антибиотиков штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, а также некоторых штаммов грамположительных бактерий (*Listeria monocytogenes* EGD, *Micrococcus luteus*). Исследуемые пептиды, как и большинство пролин-богатых АМП, оказывают антимикробное действие без существенного повреждения бактериальных мембран, обладают липополисахарид-связывающей активностью. Мини-бактенецины не токсичны по отношению к культивируемым клеткам человека, что дает основание рассматривать их как перспективные прототипы новых антибактериальных терапевтических препаратов. Обнаружение высокоактивных фрагментов антимикробного пептида в нейтрофилах козы свидетельствует в пользу гипотезы о том, что фрагментация АМП кателицидинового семейства важна для образования функционально активных молекул, в ряде случаев более активных, чем полноразмерные пептиды, и может играть значимую роль в антиинфекционной защите.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антимикробные пептиды, кателицидины, мини-бактенецины.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АМП – антимикробные пептиды; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ПААГ – полиакриламидный гель; ПБ-АМП – пролин-богатые антимикробные пептиды; ЭФ – электрофорез; MALDI-TOF-MS – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбционной ионизацией; MRSA – устойчивый к метициллину золотистый стафилококк, PG-1 – протегрин 1.

## ВВЕДЕНИЕ

В защите человека и животных от возбудителей инфекционных заболеваний участвуют антимикробные пептиды (АМП) – катионные молекулы, содержащиеся в лейкоцитах, клетках барьерного эпителия и некоторых других типах клеток. Кроме антимикроб-

ной активности АМП обладают и иными свойствами, в том числе иммуномодулирующими, что позволяет рассматривать эти соединения как прототипы новых антибиотических лекарственных средств комплексного действия. С этой точки зрения особый интерес представляют АМП семейства кателицидинов – об-

ширной группы пептидов, широко распространенных у позвоночных. Пептиды данного семейства образуются из белков-предшественников путем протеолитического отщепления N-концевой части (кателиноподобного домена) от C-концевого участка, представляющего собой зрелый АМП. Протеолиз происходит при активации нейтрофильных гранулоцитов и клеток барьерного эпителия при инфекционных процессах. У некоторых кателицидинов, например, кателицидина человека LL-37, процессингу подвергается и молекула зрелого АМП [1], что приводит к появлению фрагментов, каждый из которых имеет свой спектр биологических свойств, включая антибактериальную, противоопухолевую и другие виды активности. Подобное протеолитическое расщепление пептидов описано и для бактенецинов овцы [2]. Предполагается, что фрагментация зрелых АМП имеет биологический смысл, и именно эти фрагменты могут играть ключевую роль в осуществлении множественных защитных реакций [1, 2].

Из известных к настоящему времени АМП кателицидины животных отряда парнокопытных привлекают особое внимание благодаря высокой антимикробной активности и сочетанию свойств, делающих эти пептиды перспективными для практического применения. В число пептидов, полученных из лейкоцитов парнокопытных, входят такие АМП, как протегрины, PR-39 свиньи [3, 4]; бактенецины, ВМАР-27, -28, додекапептид, индолицидин быка [5–8]; SМАР-29 овцы [9] и др. Некоторые из этих пептидов стали объектами детальных исследований, направленных на разработку лекарственных препаратов. Интересно, что в нейтрофилах ряда парнокопытных, в том числе коз, отсутствуют АМП семейства дефенсинов [10], что свидетельствует о важной роли кателицидинов в защите этих животных от инфекций. Таким образом, изучение АМП нейтрофилов парнокопытных актуально как для возможного обнаружения новых биологически активных молекул, которые могут служить прототипами лекарственных средств, так и для развития фундаментальных представлений о роли кателицидинов в иммунитете. Целью представленной работы стал поиск и характеристика новых АМП лейкоцитов домашней козы *Capra hircus*. Ранее из лейкоцитов козы нами уже были получены два пептида – бактенецины ChVac5 и ChVac3.4 [11, 12]. В данной работе изучены и другие АМП.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реагенты

Использовали хлорид натрия (S9625), трис-(гидроксиметил)аминометан (Т1503), агаро-

зу (Type I, low ЕЕО, А6013), трифторуксусную (302031) и гептафтормасляную (52411) кислоты, о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (N1127), МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид; М5655), бромистый цетилтриметиламмоний (Н6269) фирмы Sigma, США; нитроцефин (484400) фирмы Calbiochem, США; уксусную кислоту, хлористый аммоний, ацетат натрия фирмы «Вектон», Россия; эмбриональную телячью сыворотку (1.1.8.3.), питательные среды RPMI-1640 (1.3.4) и DMEM (1.3.5.1.) фирмы «Биолот», Россия для культивирования клеток; питательную среду Сабуро (бульон) сухой ЗАО НИФЦ, Россия; питательный бульон Мюллера–Хинтона (М391) фирмы HiMedia, Индия. В качестве пептидов сравнения использовали химически синтезированные пептиды – протегрин 1, любезно предоставленный Р. Лерером (Калифорнийский университет г. Лос-Анджелеса, США) и бактенецины ChVac5, ChVac5 20-43 и ChVac3.4, любезно предоставленные Н.И. Колодкиным («Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА).

### Выделение и очистка антимикробных пептидов из лейкоцитов домашней козы

Лейкоцитарную массу, обогащенную нейтрофилами, получали из крови взрослых здоровых коз (*C. hircus*). Гемолиз эритроцитов осуществляли раствором хлористого аммония. Из 1 л цельной крови получали 2.5 г лейкоцитарной массы (на сырой вес). Использовали два варианта экстракции белков. В первом случае клетки разрушали гомогенизацией в 10% растворе уксусной кислоты, гомогенат суспендировали на магнитной мешалке при 4°C в течение 18–24 ч, затем центрифугировали при 15000 g в течение 1 ч. Супернатант высушивали, перерастворяли в 0.1 М трис-НСl-буфере рН 7.5 и инкубировали при 37°C в течение 4 ч для расщепления предшественников кателицидинов. Во втором случае для экстракции использовали 0.3% раствор бромистого цетилтриметиламмония в 0.02 М натрий-ацетатном буфере рН 4.5. При использовании данного метода экстракции создавались условия для осуществления ферментативных реакций уже в ходе процесса экстракции. Полученный после экстракции материал подвергали ультрафильтрации через мембрану УМ-10 (НОММ 10 кДа) фирмы Amicon (США) для отделения низкомолекулярной белковой фракции, далее концентрировали и обессоливали при ультрафильтрации через мембрану УМ-1 (НОММ 1 кДа). Материал, содержащий кислоторастворимые полипептиды с молекулярной массой менее 10–15000 Да, наносили на электрофоретическую колонку для разделения с помощью препаративного электрофореза (ЭФ) в 12.5% полиакриламидном геле в кислой буферной

системе в присутствии мочевины [13] в аппарате фирмы Bio-Rad (США) при непрерывной элюции белков из геля. Фракции, в которых была выявлена антимикробная активность, отбирали и разделяли содержащиеся в них пептиды с помощью нескольких последовательных циклов обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на установке Gold System фирмы Beckman (США) с использованием колонок Vydac C-18 (4.6 × 250 мм; диаметр частиц сорбента 5 мкм). Чистоту полученных после ОФ ВЭЖХ фракций оценивали с помощью аналитического ЭФ [14], масс-спектрометрии, а также аналитической ОФ ВЭЖХ. Концентрацию белка в очищенных препаратах определяли по методу Брэдфорд, а также по методу Вольфа [15]. Концентрацию растворов химически синтезированных пептидов рассчитывали по сухому весу порошка пептида.

#### Оценка антимикробной активности пептидов

Для характеристики антимикробной активности мини-бактенецинов использовали два метода – метод радиальной диффузии в агарозном геле и метод серийных разведений в жидкой питательной среде. Штаммы микроорганизмов любезно предоставлены Р. Лерером (Калифорнийский университет г. Лос-Анджелеса, США), А. Тосси (университет г. Триеста, Италия), Е.И. Ермоленко («ИЭМ»); сотрудниками Военно-медицинской академии; Г.Е. Афиногеновым (РНИИТО им. Вредена Минздрава России). Использован клинический изолят *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивый к азтреонаму, цефтазидиму, цефотаксиму, клинический изолят *Klebsiella* spp., устойчивый к тетрациклину (оба штамма получены из мочи больного циститом), клинический изолят *Acinetobacter baumannii*, устойчивый к меропенему (из инфицированной раны); клинический изолят *Staphylococcus intermedius* (из инфицированной раны, полученной после укуса собакой), устойчивый к ципрофлоксациму, цефуроксиму, клиндамицину, эритромицину, рифампицину, гентамицину, бензпенициллину, оксациллину; клинический изолят дрожжеподобного грибка *Candida parapsilosis*, устойчивый к амфотерицину и клотримазолу (соскоб с ногтевой пластины).

#### Метод радиальной диффузии в агарозных гелях.

Применяли методику, предложенную Лерером и др. [16] и подробно описанную [12]. Для количественной оценки антибиотического действия АМП измеряли диаметр зоны ингибирования роста микробов вокруг лунок в агарозном геле, в которые были внесены пептиды. За 1 условную единицу принимали размер 0.1 мм. Из измеренного значения вычитали 20 единиц,

соответствующих диаметру лунки. Минимальную ингибирующую рост микробов концентрацию (МИК) АМП определяли, строя графики зависимости антимикробной активности пептидов от их концентрации в программе Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., США) и рассчитывая значение для точки пересечения графика линейной регрессии с осью абсцисс (концентрация пептидов в мкМ), которое и принимали за МИК. В каждом опыте использовали по две параллельных пробы. Опыты повторяли 3 раза, рассчитывали среднее значение МИК ± среднее квадратичное отклонение.

#### Метод серийных разведений препаратов в жидкой питательной среде.

Использовали стандартную методику, применяемую в микробиологии для тестирования антибиотиков, но с небольшими модификациями, разработанными с учетом специфики АМП [17] согласно [12]. За МИК принимали наименьшую концентрацию пептида, при которой полностью ингибировался видимый рост микроорганизмов в лунках 96-луночных планшетов. В каждом опыте использовали по три параллельных пробы. Результаты представлены как медианы, полученные по трем–пяти независимым экспериментам.

#### Оценка влияния пептидов на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* ML35p для хромогенных маркеров

Действие пептидов на барьерную функцию мембран грамотрицательной бактерии изучали с использованием метода [18] в модификации [19]. Штамм *E. coli* ML35p характеризуется отсутствием пермеазы лактозы, конститутивным синтезом β-галактозидазы в цитоплазме, а также содержит β-лактамазу в периплазматическом пространстве. О состоянии наружной и цитоплазматической мембран клеток *E. coli* ML35p судили по их проницаемости для хромогенных маркеров – нитроцефина и о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида (ONPG), субстратов β-лактамазы и β-галактозидазы соответственно. Пробы вносили в лунки 96-луночного планшета согласно [12] и измеряли оптическую плотность (OD) раствора, обусловленную появлением продукта гидролиза нитроцефина или ONPG при λ = 486 и 420 нм соответственно с помощью спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США) при 37°C и периодическом встряхивании планшетов в течение 2 ч. Данные обрабатывали в программе Sigma Plot 11.

#### Оценка липополисахаридсвязывающей активности пептидов

Липополисахаридсвязывающую (липополисахарид-нейтрализующую) активность пептидов изучали

с помощью количественного хромогенного Лимулюс-теста (Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate; Lonza Walkersville, США). При проведении экспериментов и обработке результатов использовали подходы, описанные Zhao и соавт. [20]. Приготавливали серийные двукратные разведения пептидов в воде с 0.01% уксусной кислоты и инкубировали АМП с липополисахаридом (ЛПС) *E. coli* O111:B4 в конечной концентрации 0.5 Ед/мл в течение 30 мин при 37°C в планшетах Costar 3596 (Corning, США). Проводили количественное определение свободного ЛПС в соответствии с рекомендациями производителя набора. Планшет помещали в термостатируемую камеру спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США), инкубировали при 37°C, измеряя *OD* раствора при 405 нм; вычисляли разницу величин *OD* в начале инкубации и через 10 мин –  $\Delta OD_{405}$ .

Долю связанного ЛПС (%) определяли по формуле:

$$\% \text{ связанного ЛПС} = \frac{\alpha(\text{ЛПС без пептида}) - \alpha(\text{ЛПС с пептидом})}{\alpha(\text{ЛПС без пептида})},$$

где  $\alpha = \Delta OD_{405}$  (пептид (или вода) с ЛПС) –  $\Delta OD_{405}$  (пептид (или вода) без ЛПС). Строили кривые зависимости доли связанного ЛПС от концентрации АМП в инкубационной среде (программа Sigma Plot 11, Systat Software Inc., США) и определяли ЭК<sub>50</sub> (эффективная концентрация 50% или концентрация пептидов, при которой 50% ЛПС находится в связанном состоянии).

#### Анализ гемолитической активности пептидов

Эритроциты получали из крови здоровых доноров по стандартной методике. Из осадка эритроцитов (считали, что осадок содержит 100% суспензию клеток) получали 2.8% суспензию эритроцитов в забуференном физиологическом растворе (ЗФР). В анализируемые пробы вносили 27 мкл суспензии эритроцитов и 3 мкл исследуемого пептида (в разных концентрациях) в ЗФР или 3 мкл ЗФР (контроль). Пробы (по три повторности) инкубировали при 37°C в течение 30 мин, добавляли по 75 мкл охлажденного ЗФР и центрифугировали при 5000 *g* в течение 4 мин. Оптическую плотность супернатантов измеряли при  $\lambda = 540$  нм.

#### Оценка влияния пептидов на жизнеспособность культивируемых клеток

Жизнеспособность культивируемых клеток человека после их 20-часовой инкубации с пептидами оценивали с помощью стандартного МТТ-теста [21] согласно [12]. Культивирование клеток, выделение нейтрофилов и мононуклеарных клеток периферической

крови здоровых доноров проводили по стандартным методикам.

#### Масс-спектрометрия

Молекулярные массы выделенных пептидов определяли на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Reflect III (Bruker, Германия), оснащенном УФ-лазером с длиной волны 336 нм. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Sigma, Германия) в 20% ацетонитриле, 0.1% ТФУ в концентрации 10 мг/мл. Указаны средние молекулярные массы.

#### Определение аминокислотной последовательности

Аминокислотную последовательность определяли, используя систему для секвенирования белков Procise cLC 491 (Applied Biosystems, США). Фенилтиогидантоиновые производные аминокислотных остатков идентифицировали на анализаторе 120A PTH (Applied Biosystems, США).

#### Синтез мини-бактенецинов

Mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-ChVac7.5N $\beta$  синтезировали с помощью твердофазного синтеза и Fmoc/tBu-стратегии на пептидном синтезаторе Syro2000 (MultiSynTech GmbH, Германия) [22]. После завершения синтеза пептиды снимали смесью 5% воды, 4% м-крезола, 5% тиоанизола и 2% этандитиола в ТФУ при комнатной температуре в течение 4 ч и осаждали охлажденным диэтиловым эфиром. Синтезированные пептиды очищали с использованием ВЭЖХ Äkta (Amersham Bioscience GmbH, Германия) на колонке Jupiter C18 (20 мм × 250 мм, Phenomenex Inc., США) в линейном градиенте ацетонитрила с 0.1% ТФУ. Молекулярные массы пептидов подтверждали с помощью MALDI-TOF-MS, чистоту – ОФ ВЭЖХ.

#### Статистическая обработка результатов

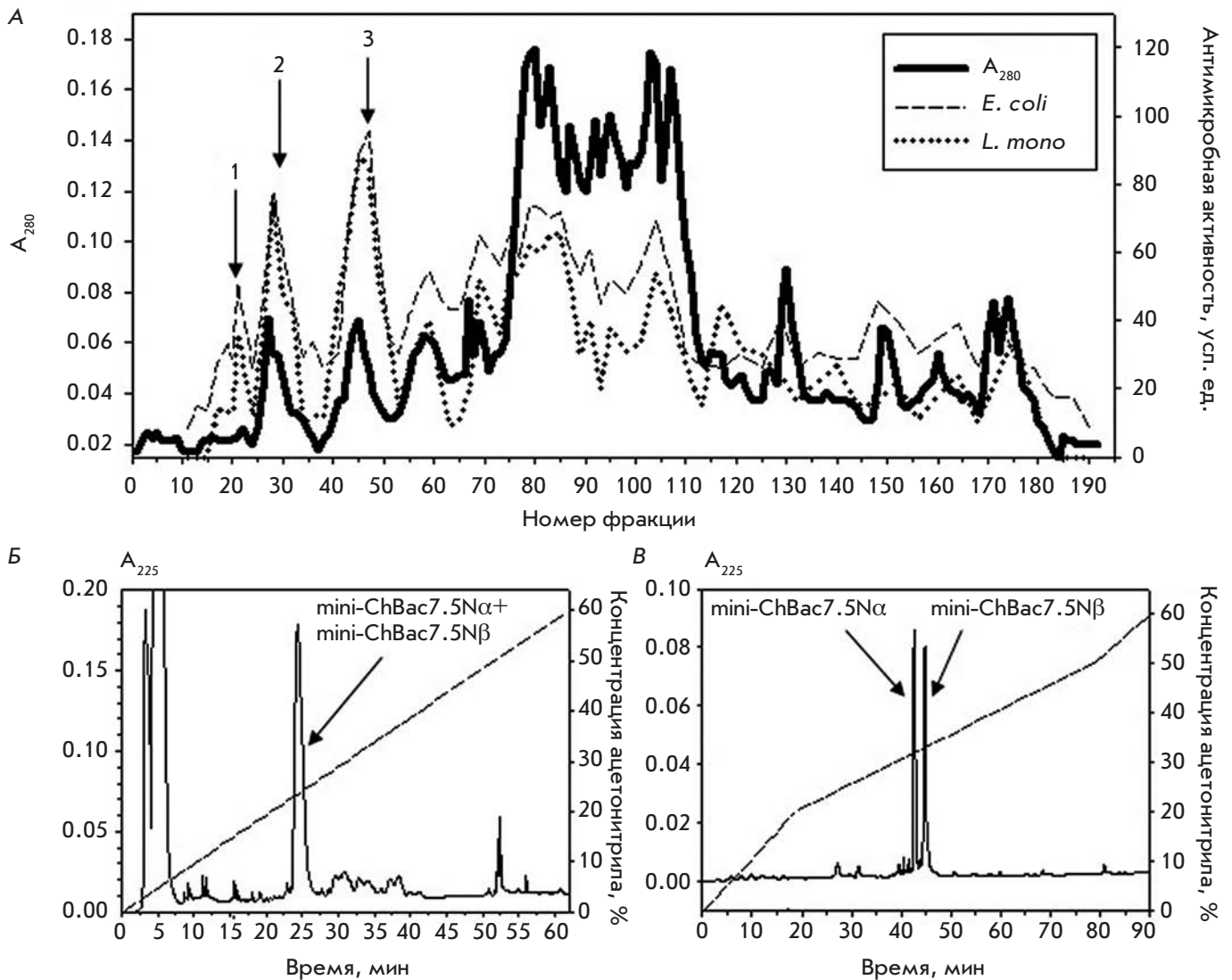
Статистическую значимость различий между опытными и контрольными группами при определении цитотоксической активности АМП для клеток человека оценивали с применением *t*-критерия Стьюдента ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$  в программе Prism 5 (GraphPad Software Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Выделение и очистка новых антимикробных пептидов из лейкоцитов козы

При выделении пептидов обеспечивали условия, при которых возможен процессинг предшественников кателицидинов с высвобождением зрелых АМП. Для разделения катионных пептидов, полученных





**Рис. 1.** Выделение и очистка мини-бактенецинов из экстракта лейкоцитов домашней козы. А – профиль элюции белков с электрофоретической колонки при проведении препаративного электрофореза (ПЭФ) белков из экстракта лейкоцитов козы после ультрафильтрации материала через мембрану УМ-10. Пик 1 – пептиды с молекулярными массами 2.8–6 кДа, в состав которых входили мини-бактенецины; пик 2 – ChBac3.4; пик 3 – ChBac5. Антимикробная активность белков во фракциях против *E. coli* ML35p и *Listeria monocytogenes* EGD (ось ординат – справа). Б, В – профиль элюции пептидов с колонки Yudas C-18 при проведении ОФ ВЭЖХ с использованием градиента концентраций ацетонитрила от 0 до 60% за 60 мин (с 0.1% трифторуксусной кислоты) для разделения объединенных фракций 19–24 после ПЭФ (Б) или 0–20% за 20 мин, 20–50% за 60 мин, 50–60% за 10 мин (с 0.13% гептафтормасляной кислоты) для разделения мини-бактенецинов (В). Стрелками отмечены пики, в которых выходили пептиды со средними молекулярными массами 2895.5 и 2739.3 Да – мини-бактенецины mini-ChBac7.5Nα и -β

после ультрафильтрации экстрактов лейкоцитов козы через мембрану УМ-10, использовали препаративный электрофорез. Фракции анализировали, измеряя оптическую плотность растворов при длине волны 280 нм, а также оценивая антимикробную активность методом радиальной диффузии (рис. 1А). Фракции 17–24 содержали компоненты с наиболь-

шей электрофоретической подвижностью по направлению к катоду – пептиды с молекулярными массами от 2.8 до 6 кДа, обладающие антимикробной активностью (пик 1), в пиках 2 и 3 – бактенецины ChBac3.4 и ChBac5 (рис. 1А).

Для получения индивидуальных пептидов, выходящих во фракциях, соответствующих пику 1, при-



Антимикробная активность мини-бактенецинов козы: минимальные ингибирующие концентрации пептидов (мкМ), установленные методом радиальной диффузии в агарозном геле (РД) и методом серийных разведений в жидкой питательной среде (СР)

Микроорганизм	mini-ChBac7.5N $\alpha$			mini-ChBac7.5N $\beta$		
	Метод РД*		Метод СР**	Метод РД*		Метод СР**
	без NaCl	100 мМ NaCl	питательный бульон***	без NaCl	100 мМ NaCl	питательный бульон***
<i>E. coli</i> ML35p	0.3 ± 0,1	1.5 ± 0.2	1	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.2	2
<i>E. coli</i> M17	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1.1 ± 0.4	3.7 ± 1.2	2	1.0 ± 0.3	3.2 ± 0.8	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> клинический изолят	-	-	2	-	-	2
<i>Klebsiella</i> spp. клинический изолят	-	-	4	-	-	4
<i>Acinetobacter baumannii</i> клинический изолят	-	-	2	-	-	4
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2	2	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2
<i>Micrococcus luteus</i> CIP A270	-	-	1	-	-	1
<i>Staphylococcus aureus</i> 710A	0.7 ± 0.2	>50	> 64	0.6 ± 0.1	>50	> 64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	> 64	-	-	> 64
MRSA ATCC 33591	0.7 ± 0.2	>50	> 64	0.5 ± 0.1	>50	> 64
<i>Staphylococcus intermedius</i> клин. изолят	-	-	> 64	-	-	> 64
<i>Candida albicans</i> 820	0.3 ± 0.1	>50	64	0.3 ± 0.1	>50	> 64
<i>Candida parapsilosis</i> клинический изолят	-	-	> 64	-	-	> 64

\*Данные представлены как среднее ± среднеквадратичное отклонение ( $n = 6$ ); пептиды инкубировали с микроорганизмами – в одном случае в 10 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.4, в другом случае в 10 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 100 мМ NaCl.

\*\*Данные представлены как медианы, полученные в результате трех–пяти серий экспериментов (каждый выполняли в трех повторах).

\*\*\*Бульон Мюллера–Хинтона для бактерий, среда Сабуро для грибов.

«-» – Тест не проводили.

при повышении ионной силы среды активность АМП снижается в отношении как стафилококков, так и *S. albicans*. В случае грамотрицательных бактерий зависимость активности мини-бактенецинов от ионной силы среды менее выражена.

При изучении антимикробной активности пептидов методом серийных разведений в жидкой питательной среде (таблица) показана высокая антимикробная активность мини-бактенецинов против грамотрицательных бактерий, включая штаммы, устойчивые к ряду применяемых в клинике антибиотиков: *P. aeruginosa* (устойчивость к азтреонаму, цефтазидиму, цефотаксиму), *Klebsiella* spp. (устойчивость к тетрациклину), *A. baumannii* (устойчивость к меропенему) – МИК 2–4 мкМ. Пептиды проявляют выраженную активность в отношении грамположительных бактерий *Listeria monocytogenes* и *Micrococcus luteus*, однако их антибактериальное действие в отношении стафилококков, а также представителей рода *Candida* практически не выявляется в диапазоне концентраций от 1 до 64 мкМ.

### Влияние АМП на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* ML35p для хромогенных маркеров

Одна из важнейших задач изучения функциональных свойств АМП – обнаружение основной мишени их антимикробного действия. У большинства АМП это бактериальные мембраны – пептиды вызывают их быструю и необратимую дезинтеграцию. Однако некоторые АМП, в том числе ПБ-АМП, преимущественно нарушают внутриклеточные процессы в бактериальных клетках и повреждают их мембраны лишь в концентрациях, значительно превышающих МИК [25]. Нами изучено влияние мини-бактенецинов на проницаемость наружной и цитоплазматической мембраны *E. coli* ML35p. На рис. 3 представлена кинетика действия mini-ChBac7.5N $\alpha$  в концентрации 0.6–20 мкМ на мембраны *E. coli* ML35p. В качестве пептида сравнения использовали бактенецин козы ChBac3.4 (5 мкМ, что в 2 раза выше МИК), а положительным контролем служил мембраноактивный пептид протегрин 1 (PG-1) свиньи. Проницаемость наружной мембраны бактерии для хромогенного

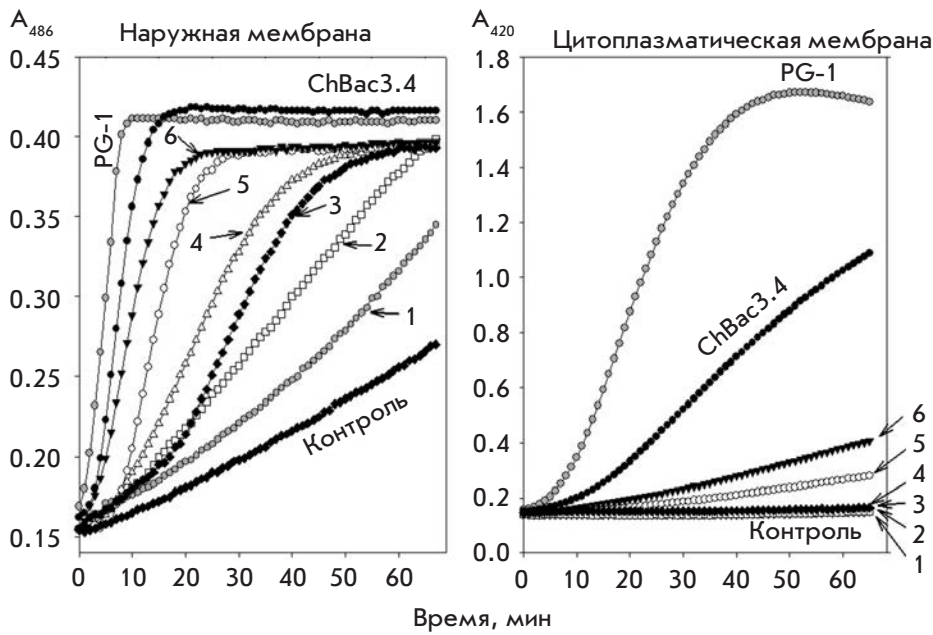


Рис. 3. Кинетика изменения проницаемости наружной (левая панель) и цитоплазматической (правая панель) мембран *E. coli* ML35r для хромогенных маркеров при действии мини-бактенецина mini-ChBac7.5N $\alpha$  в различных концентрациях (мкМ): 1 – 0.6; 2 – 1.2; 3 – 2.5; 4 – 5; 5 – 10; 6 – 20. По оси ординат – время инкубации пептидов с бактерией; по оси абсцисс – оптическая плотность раствора, содержащего продукты гидролиза хромогенных субстратов. В качестве пептида сравнения использовали бактенецин козы ChBac3.4 (5 мкМ), а положительного контроля – протегрин 1 (PG-1 – 2.5 мкМ)

маркера повышается при действии мини-бактенецина практически во всем исследуемом диапазоне концентраций, хотя в случае PG-1 (2.5 мкМ, что в 2 раза выше МИК) эффект более выражен. Однако пептид лейкоцитов козы не оказывает существенного воздействия на проницаемость цитоплазматической мембраны *E. coli* для маркерной молекулы. Лишь при высоких концентрациях пептида (10 и 20 мкМ), значительно превышающих МИК (1–2 мкМ), данные несколько отличаются от значений в контроле, где отсутствовали АМП. Эффект ChBac3.4, в отличие от мини-бактенецина, проявляется уже в концентрации, в 2 раза превышающей МИК. Для второго мини-бактенецина и mini-ChBac7.5N $\alpha$  результаты практически не отличались (данные не приведены). Полученные данные позволяют заключить, что бактериальные мембраны не являются основной мишенью изучаемых нами мини-бактенецинов, как и других известных ПБ-АМП. Вероятно, подобно фрагментам Bac7 быка и OaBac7.5 овцы они могут связываться с шапероном DnaK и модулировать его АТР-азную активность, нарушая процесс белкового фолдинга в клетке [25, 26], или взаимодействовать с 70S рибосомами, нарушая процесс трансляции, как показано для апидецинов, онкоцинов, фрагмента 1–35 Bac7 быка [27, 28]. Как и фрагменты 1–35 Bac7 быка, которые воздействовали на цитоплазматическую мембрану *E. coli* ML35r в концентрациях, в несколько раз превышающих МИК [24], мини-бактенецины влияют на проницаемость внутренней мембраны этой бактерии лишь в концентрациях, в 10–20 раз превышающих МИК.

#### Липополисахаридсвязывающая активность мини-бактенецинов козы

Связывание с липополисахаридом (ЛПС) – компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий – одно из важных свойств АМП, так как от характера этого связывания во многом зависит и последующая эффективность антимикробного действия пептидов. При разработке лекарственных препаратов на основе АМП большое внимание наряду с антимикробными свойствами уделяют и ЛПС-связывающей (нейтрализующей) активности, учитывая важность получения соединения, которое может способствовать не только инактивации патогенных микроорганизмов, но и предотвращать или устранять последствия септического шока, вызываемого грамотрицательными бактериями, – серьезного осложнения инфекционных заболеваний, часто приводящего к смертельному исходу. В последнее время опубликовано большое количество работ, в которых комплексно анализируется зависимость особенностей структуры пептидов – прототипов лекарственных средств от их антимикробного действия, селективности по отношению к прокариотическим клеткам и ЛПС-нейтрализующим свойствам. Показано, что ЛПС-нейтрализующая активность пептида зависит от соотношения гидрофобности/величины суммарного положительного заряда его молекулы [29]. Путем определения эффективной концентрации, при которой 50% ЛПС (ЛПС *E. coli* O111:B4) находится в связанном с пептидом состоянии [20], нами оценена ЛПС-связывающая активность мини-бактенецинов. Для сравнения приведены



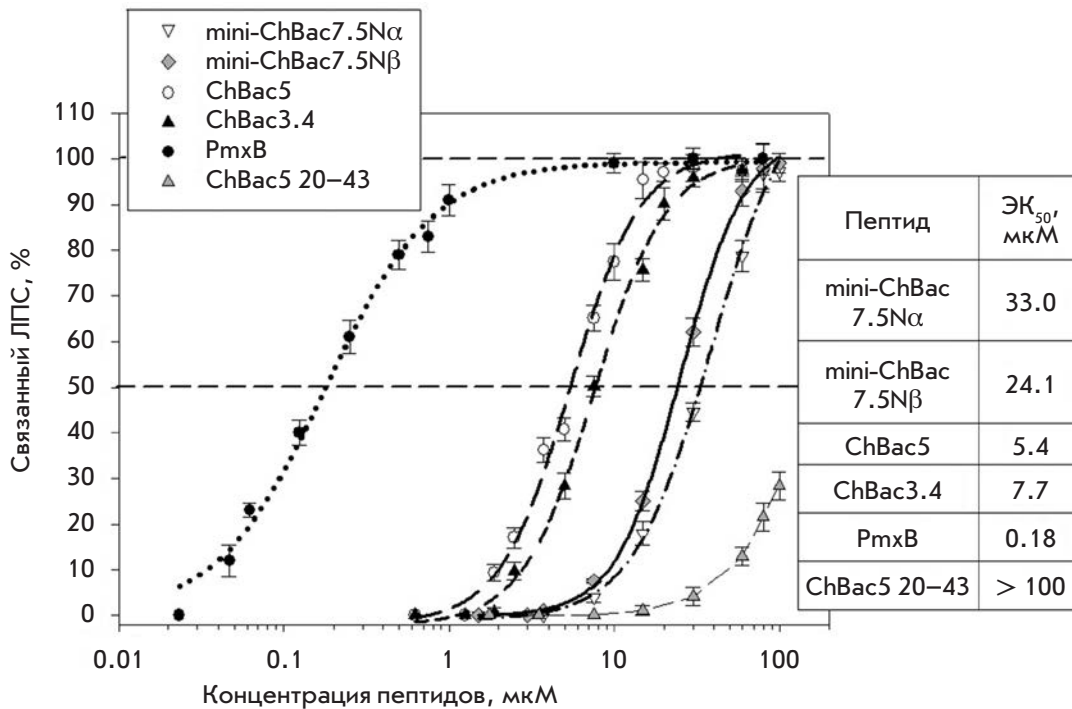


Рис. 4. Связывание липополисахарида мини-бактенецинами в сравнении с бактенецинами козы ChBac3.4 и ChBac5 и фрагментом ChBac5 20–43, обладающим низкой антимикробной активностью. Положительный контроль – полимиксин В (PmxB). Приведены средние значения ± среднеквадратичное отклонение,  $n = 6$ . В таблице указаны ЭК<sub>50</sub> пептидов

данные, полученные для других АМП лейкоцитов козы – бактенецинов ChBac3.4, ChBac5 и пептида с низкой антимикробной активностью – химически синтезированного С-концевого участка (аминокислотные остатки 20–43) бактенецина ChBac5 (ChBac5 20–43). Положительным контролем служил полимиксин В, известный как соединение, обладающее высокой аффинностью к ЛПС (рис. 4). Мини-бактенецины характеризуются значительно более высокими показателями рассматриваемого вида активности по сравнению с ChBac5 20–43, хотя и несколько уступают бактенецинам ChBac3.4 и ChBac5, что может объясняться большим суммарным положительным зарядом молекул мини-бактенецинов и меньшей их гидрофобностью по сравнению с ChBac3.4 и ChBac5 (рис. 4). Mini-ChBac7.5Nα содержит 12 остатков аргинина и лишь два остатка лейцина (mini-ChBac7.5Nβ – 11 остатков аргинина и два лейцина). Кроме того, мини-бактенецины не содержат остатков ароматических аминокислот, присутствие которых (в особенности остатка триптофана), как полагают, обуславливает повышенную ЛПС-нейтрализующую активность [30]. ChBac3.4 и ChBac5, напротив, содержат относительно большое количество остатков ароматических аминокислот, главным образом, фенилаланина. Полученные данные предоставляют информацию для анализа закономерностей проявления различных видов биологической активности АМП, а также указывают на возможность разработки антибиотических препаратов на основе мини-бактенецинов путем

создания их аналогов, содержащих большее количество остатков гидрофобных аминокислот, в частности триптофана.

#### Действие мини-бактенецинов на клетки млекопитающих

Как известно, большинство ПБ-АМП не обладает выраженной токсичностью для клеток млекопитающих [25]. Оценка гемолитической активности мини-бактенецинов в отношении эритроцитов человека показала, что в концентрации 1–100 мкМ оба пептида не оказывают выраженного действия на эритроциты. Показатели проб, содержащих пептиды в этих концентрациях, не отличались статистически значимо от показателей в контрольных пробах, не содержащих АМП ( $p > 0.05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента,  $n = 9$ ).

С применением МТТ-теста определено действие мини-бактенецинов в концентрации 1–30 мкМ на клетки человека. Установлено, что пептиды обладают низкой цитотоксической активностью в отношении различных типов культивируемых клеток человека, а именно, клеток эритромиелоидного лейкоза К-562, гистиоцитарной лимфомы U-937, промиелоцитарного лейкоза HL-60, эпителиоидной карциномы легкого А-549, эпидермоидной карциномы А-431, остеосаркомы человека MG-63, а также нормальных фибробластов кожи человека, фибробластов легкого эмбриона человека MRC-5, нейтрофилов и мононуклеарных клеток периферической крови человека. Показатели цитотоксичности, полученные после

24 ч инкубации с пептидами, не отличались значимо от величин, рассчитанных для контрольных проб, не содержащих пептиды, во всем диапазоне концентраций – 1–30 мкМ ( $p > 0.05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента,  $n = 9$ ). Эти данные свидетельствуют об избирательности действия мини-бактенецинов козы в отношении микробных клеток, что согласуется с наблюдениями, в которых установлена низкая токсичность N-концевых фрагментов 1–16, 1–23, 1–35 Vac7 быка для клеток млекопитающих [24].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из лейкоцитов домашней козы *C. hircus* нами выделены два антимикробных пептида, названных мини-бактенецинами mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-ChVac7.5N $\beta$ , которые являются N-концевыми фрагментами пептида ChVac7.5, впервые полученными из клеток крови. Из лейкоцитов овцы ранее были выделены несколько фрагментов бактенецинов – OaVac11, OaVac5, OaVac7.5 [2]. С-Концевой фрагмент (32–60), выделенный Андерсон и соавт. [2] и названный OaVac7.5mini, имел относительно низкую антимикробную активность [31] по сравнению с активностью N-концевых фрагментов бактенецина 7.5 козы. Мини-бактенецины козы имеют структурное сходство и с N-концевой частью Vac7 быка [5] (рис. 2). Для проявления антимикробной активности Vac7 быка необходим именно N-концевой участок молекулы (не менее 16 аминокислотных остатков) [24], по длине примерно соответствующий выделенным нами пептидам. С-Концевые фрагменты Vac7 быка имели низкую антимикробную активность [24]. В молекулах бактенецинов 7.5 козы и овцы, а также бактенецина 7 быка N-концевые участки имеют высокое структурное сходство, в то время как С-концевые области значительно различаются. Обнаружение фрагментов бактенецинов 7.5 овцы [2] и мини-бактенецинов козы позволяет предположить, что именно после фрагментации образовавшиеся пептиды и выполняют основные защитные функции: N-концевые производные – антимикробную, а С-концевые, возможно, играют другую роль, которая еще до конца не выяснена.

Предположение о важности фрагментации зрелых форм АМП, в том числе и для регуляции их биологических эффектов в ходе развития инфекционного процесса, было выдвинуто при изучении протеолитического расщепления кателицидина LL-37 человека. В результате расщепления этого пептида образуются фрагменты, часть из которых обладает более выраженной антимикробной активностью, чем полноразмерный LL-37 [1, 32]. Однако установлено, что при высокой антимикробной активности иммуномодулирующая активность этих пептидов

снижена по сравнению с полноразмерным кателицидином [32]. Характер фрагментации кателицидина зависит от многих факторов, но в наибольшей степени – от активности протеаз, осуществляющих его процессинг, и от активности их ингибиторов [1]. Эти факторы, в свою очередь, зависят от параметров, определяемых микроокружением, которое может изменяться в ходе инфекционного или других патологических процессов. Поэтому фрагментация кателицидина человека может рассматриваться как один из механизмов тонкой и многогранной регуляции функциональной активности АМП. С другой стороны, на основании изучения биологической активности фрагментов этого пептида разрабатываются разнообразные антибактериальные, а также и противоопухолевые пептидные препараты – производные LL-37, которые рассматриваются как перспективные прототипы новых лекарственных средств.

Фрагментации подвергаются и другие антимикробные полипептиды, при расщеплении которых образуются их укороченные варианты с выраженной бактерицидной активностью. Например, при процессинге лактоферрина, компонента специфических гранул нейтрофилов, образуется антимикробный пептид лактоферрицин, который рассматривается как соединение, играющее самостоятельную биологическую роль в осуществлении защитных функций нейтрофилов [33]. Из лейкоцитов и кожных покровов ряда рыб и амфибий получены фрагменты гистонов, обладающие антимикробной активностью и, как предполагается, выполняющие защитные функции [34, 35].

Представляют интерес ферменты, которые могут осуществлять подобный процессинг ПБ-АМП, в частности бактенецина 7.5 козы. Можно предположить, что в этом процессе принимают участие несколько различных протеаз, а расщепление, возможно, включает несколько стадий. В случае mini-ChVac7.5N $\beta$  одним из таких ферментов может быть пролилэндопептидаза (PREP [КФ 3.4.21.26]) или пролилкарбоксипептидаза (PRCP [КФ 3.4.16.2]), расщепляющие пептидную связь между остатками пролина и аргинина (в молекуле ChVac7.5 – между остатками пролина 21 и аргинина 22). Эти протеазы присутствуют в нейтрофильных гранулоцитах и, как показано, играют немаловажную роль в реакциях воспалительного процесса [36]. Дальнейшее исследование с использованием ингибиторов протеаз различного типа позволит пролить свет на этот вопрос.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение из лейкоцитов домашней козы высокоактивных антимикробных пептидов, названных нами мини-бактенецинами mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-

ChVac7.5Nβ и представляющих собой N-концевые фрагменты бактенецина 7.5, свидетельствует в пользу представления о важности фрагментации антимикробных пептидов врожденного иммунитета – одного из факторов, необходимых для реализации и регуляции защитных реакций при развитии инфекционного или воспалительного процессов. Показано, что минибактенецины проявляют высокую антимикробную активность в отношении грамотрицательных бактерий, включая антибиотикоустойчивые штаммы, обладают липополисахаридсвязывающей активностью, не проявляют токсичности по отношению к культивируемым клеткам человека. Все это свидетельствует

о перспективности дальнейшего исследования антимикробной активности этих соединений на большем числе микроорганизмов и изучения возможности разработки на их основе новых антибактериальных терапевтических препаратов. ●

*Работа поддержана грантом ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.604.21.0104). Уникальный идентификатор RFMEFI60414X0104.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamasaki K., Schaubert J., Coda A., Lin H., Dorschner R., Schechter N., Bonnart C., Descargues P., Hovnanian A., Gallo R.L. // *FASEB J.* 2006. V. 20. № 12. P. 2068–2080.
2. Anderson R., Yu P.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 312. P. 1139–1146
3. Kokryakov V.N., Harwig S.S., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I. // *FEBS Lett.* 1993. V. 327. P. 231–236.
4. Agerbert B., Lee J.Y., Bergman T., Carlquist M., Boman H.G., Mutt V., Jörnvald H. // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 202. P. 849–854.
5. Gennaro R., Skerlavaj B., Romeo D. // *Infect. Immun.* 1989. V. 57. P. 3142–3146.
6. Skerlavaj B., Gennaro R., Bagella L., Merluzzi L., Risso A., Zanetti M. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 28375–28381.
7. Romeo D., Skerlavaj B., Bolognesi M., Gennaro R. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 9573–9575.
8. Selsted M., Novotny M., Morris W., Tang Y., Smith W., Cullor J. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 7. P. 4292–4295.
9. Huttner K.M., Lambeth M., Burkin H., Burkin D., Broad T. // *Gene.* 1998. V. 206. P. 85–91.
10. Zhao C., Nguen T., Liu L., Shamova O., Brogden K.A., Lehrer R.I. // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. № 11. P. 6221–6224.
11. Shamova O., Brogden K.A., Zhao C., Nguen T., Turner J., Kokryakov V., Lehrer R.I. // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. № 8. P. 4106–4111.
12. Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden K., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl H.-G., Kokryakov V., Lehrer R.I. // *Int. J. Pept. Res. Therap.* 2009. V. 15. № 1. P. 31–42.
13. Harwig S.S., Chen N.P., Park A.S.K., Lehrer R.I. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 208. P. 382–386.
14. Schagger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–379.
15. Wolf P. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 129. Pt. 1. P. 145–155.
16. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S., Jackson R., Eisenhauer P. // *J. Immunol. Meth.* 1991. V. 137. № 2. P. 167–173.
17. Tossi A., Scocchi M., Zanetti M., Genaro R., Storici P., Romeo D. In *Antibacterial peptide protocols* / Ed. Shafer W. Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 1998. P. 133–151.
18. Lehrer R.I., Barton A., Ganz T. // *J. Immunol. Meth.* 1988. V. 108. P. 153–158.
19. Артамонов А.Ю., Шамова О.В., Кокряков В.Н., Орлов Д.С. // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 3: Биология.* 2008. № 2. С. 139–142.
20. Zhao C., Nguyen T., Boo L., Hong T., Espiritu C., Orlov D., Wang W., Waring A., Lehrer R.I. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. № 10. P. 2695–2702.
21. Mosmann T. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 65. P. 55–63.
22. Singer D., Lehmann J., Hanisch K., Härtig W., Hoffmann R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 346. P. 819–828.
23. Zhao C., Nguyen T., Brogden K., Lehrer R. // *EMBL/GenBank/DDBJ databases.* 1999.
24. Gennaro R., Zanetti M., Benincasa M., Podda E., Miani M. // *Curr. Pharmaceut. Design.* 2002. V. 8. P. 763–778.
25. Scocchi M., Tossi A., Gennaro R. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. V. 68. P. 2317–2330.
26. Zahn M., Kieslich B., Berthold N., Knappe D., Hoffmann R., Sträter N. // *Protein Pept Lett.* 2014. V. 21. № 4. P. 407–412.
27. Krizsan A., Volke D., Weinert S., Sträter N., Knappe D., Hoffmann R. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V. 53. № 45. P. 12236–12239.
28. Mardirossian M., Grzela R., Giglione C., Meinel T., Gennaro R., Mergaert P., Scocchi M. // *Chem. Biol.* 2014. V. 21. № 12. P. 1639–1647.
29. Rosenfeld Y., Lev N., Shai Y. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. P. 853–861.
30. Nan Y., Bang J., Jacob B., Park I., Shin S. // *Peptides.* 2012. V. 35. № 2. P. 239–247.
31. Anderson R.C., Hancock R.E.W., Yu P. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. V. 48. № 2. P. 673–676.
32. Braff M., Hawkins M., Di Nardo A., Lopez-Garcia B., Howell M., Wong C., Lin K., Streib J., Dorschner R., Leung D., et al. // *J. Immunol.* 2005. V. 174. P. 4271–4278.
33. Gifford J., Hunter H., Vogel H. // *Cell Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. № 22. P. 2588–2598.
34. Park I.Y., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. // *FEBS Lett.* 1998. V. 437. P. 258–262.
35. Shamova O.V., Orlov D.S., Balandin S.V., Shramova E.I., Tsvetkova E.V., Panteleev P.V., Leonova Yu.F., Tagaev A.A., Kokryakov V.N., Ovchinnikova T.V. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 4 (23). P. 99–109.
36. Waumans Y., Baerts L., Kehoe K., Lambeir A., De Meester I. // *Front. Immunol.* 2015. V. 7. № 6. 387. doi: 10.3389/fimmu.2015.00387.

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается издательским домом «Парк-медиа» на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редакцией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и сопроводительные документы следует присылать в редакцию в электронном виде:

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru)).

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).

- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком \*.
- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3 – 6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А.А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах:  $T_{\text{пл}}$  – температура плавления,  $T_{\text{ф.п}}$  – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.



- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не  $\mu\text{M}$ ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « $\times$ ». Знак « $\times$ » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « $\cdot$ » обозначаются комплексы соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой ре-

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегией определяется дальнейшая судьба рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

*Для книг:* фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

*Для периодических изданий:* фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

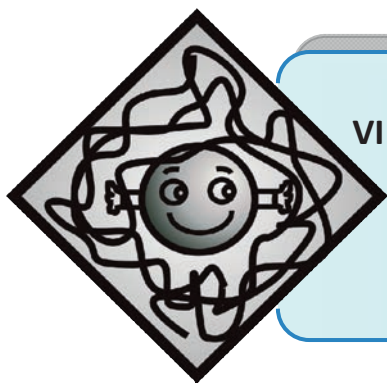
Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

**Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: vera.knorre@gmail.com, actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.**



VI ВСЕРОССИЙСКАЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ  
ШКОЛА – КОНФЕРЕНЦИЯ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
«МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАНООБЪЕКТЫ И  
ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ»

**ИНЭОС**

## *Уважаемые коллеги!*

С 23 по 28 октября 2016 года в Подмоскowie пройдет VI ВСЕРОССИЙСКАЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ «МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАНООБЪЕКТЫ И ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ».

На **школе-конференции** будут представлены современные достижения в области синтеза и модификации полимерных наночастиц, способов получения полимерных нанокомпозигов, исследования их структуры и свойств. Программой предусмотрены пленарные доклады ведущих российских и зарубежных ученых, активно работающих в области химии и физики наноматериалов, полимерного материаловедения, устные сообщения специалистов и аспирангов, стендовые сессии.

Ключевым событием школы-конференции являются тематические **Круглые столы**, на которых возможно более глубокое обсуждение пленарных докладов, достижений, перспектив и проблем представленных научных направлений. Традиционно молодые ученые, аспиранты и студенты имеют возможность принять непосредственное участие в дискуссиях.

В этом году будут проведены **специальная сессия** и тематический Круглый стол, посвященные вопросам организации междисциплинарного сотрудничества между научными организациями и инжиниринговыми центрами, бизнес-структурами по таким направлениям как получение полимерных наноматериалов и композитов с заданными параметрами и свойствами, инновационные технологические приемы их производства, области применения полимерных нанокомпозигов. К участию в сессии приглашены ведущие специалисты научно-исследовательских институтов и научно-производственных объединений («Прометей», ВИАМ, ЦАГИ, ЦНИИСМ), а также представители бизнес-структур.

***Рады приветствовать Вас среди гостей и участников конференции!***

**Организаторы: ИНЭОС РАН, ИСПМ РАН, ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИИ И НАУК О МАТЕРИАЛАХ РАН,  
НАУЧНЫЙ СОВЕТ РАН ПО ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ СОЕДИНЕНИЯМ**

**Дополнительная информация на сайте конференции:** <http://ineos.ac.ru/conferences/nano2016>  
или по e-mail: [nano2016@ineos.ac.ru](mailto:nano2016@ineos.ac.ru)

# ИННОВАЦИОННАЯ РОССИЯ

дискуссионный клуб

Мы формируем диалог между студентами, учеными, преподавателями, бизнесменами, менеджерами, инноваторами, инвесторами, дизайнерами, искусствоведами, архитекторами, фотографами – всеми социально-активными людьми.

Узнай больше  
на [WWW.STRF.RU](http://WWW.STRF.RU)

Мы приглашаем на наши мероприятия  
всех, кому есть что сказать, кто хочет  
поделиться своими идеями



Тел.: +7 (495) 930-87-07, 930 8850  
E-mail: [seminar@strf.ru](mailto:seminar@strf.ru)



# Научный журнал выходит 6 раз в год

Доступно для загрузки  
из App Store



# Теперь на iPad

Наше приложение доступно в «Киоске» AppleStore в разделе «Наука».

