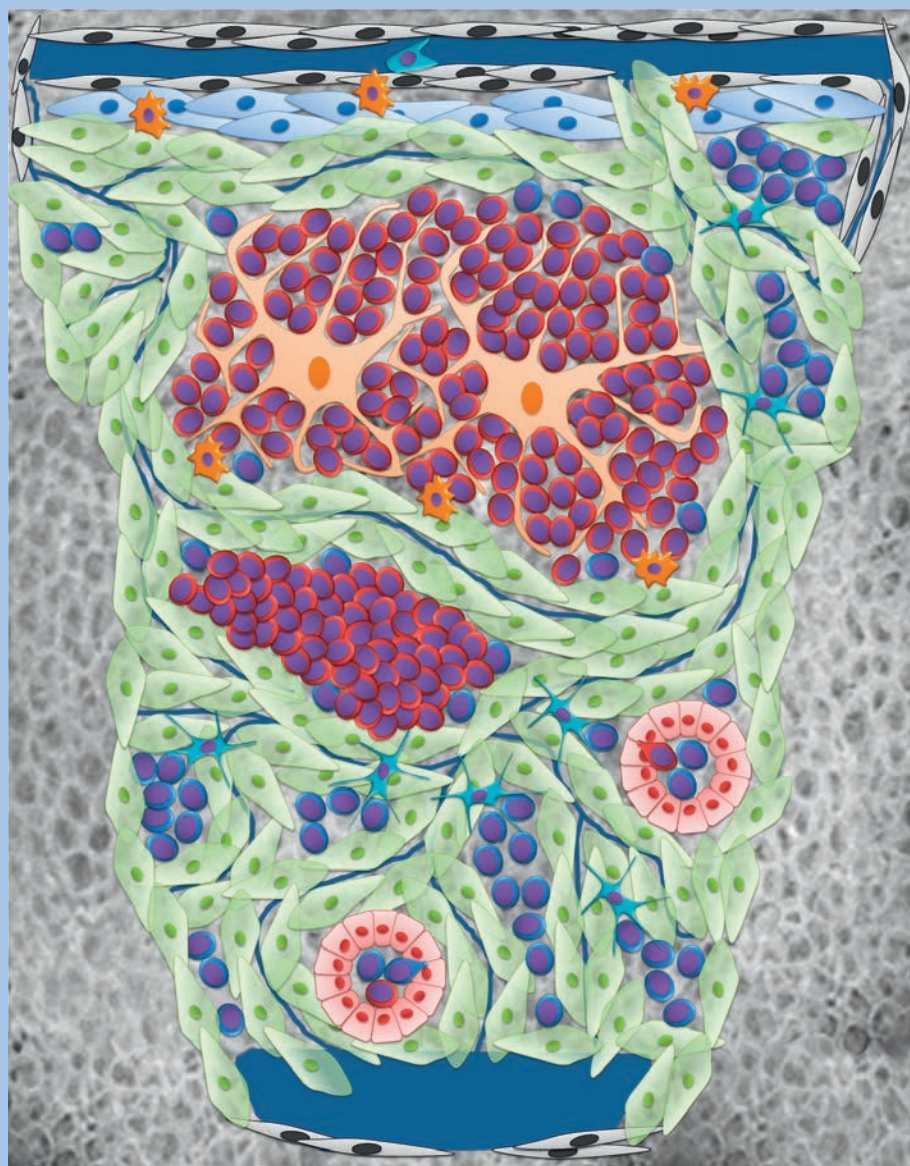


Acta Naturae

Биоинженерия искусственных лимфоидных органов



**МОНОГЕННЫЕ
АРИТМИЧЕСКИЕ
СИНДРОМЫ:
ОТ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИХ
АСПЕКТОВ К ПОСТЕЛИ
БОЛЬНОГО
СТР. 70**

**ПОВРЕЖДЕНИЯ
ДНК ПРИ ТЕПЛОМ
СТРЕССЕ
СТР. 84**

**ЦИТОМЕГАЛОВИРУС
В ПЛАЗМЕ БОЛЬНЫХ
ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ
СИНДРОМОМ
СТР. 114**

ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛ

Acta Naturae

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
Web site: www.actanaturae.ru

ПОДПИСКА ПО КАТАЛОГАМ НА ПОЧТЕ И ЧЕРЕЗ ИНТЕРНЕТ:

РОСПЕЧАТЬ

Индексы: 37283, 59881
www.pressa.rosf.ru

ИНФОРМНАУКА

Индекс: 59881
www.informnauka.com

ИНТЕР-ПОЧТА

Индекс: 17510
www.interpochta.ru

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

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



Письмо редакторов

Дорогие читатели *ActaNaturae*! Вашему вниманию предлагаются обзоры и экспериментальные статьи, сфокусированные на самых актуальных, по нашему мнению, направлениях «наук о жизни». В этом номере представлен крайне интересный обзор в области реконструктивной медицины. Это работа Носенко и соавт., в которой рассмотрены современные исследования в области биоинженерии лимфоидных органов. Большинство работ этого выпуска в той или иной степени связаны с биомедициной – от моделирования *in silico* структуры комплексов потенциал-зависимых калиевых каналов с пептидными блокаторами (обзор Новоселецкого и соавт.) до клинических и молекулярно-генетических аспектов моногенных аритмических синдромов (обзор Голуховой и соавт.). С этими обзорами перекликается исследование Никитской и соавт., изучавших влияние цитомегаловирусной инфекции на развитие острого коронарного синдрома. Проблемы развития сердечно-сосудистой недостаточности рассмотрены и в работе Тапилиной и соавт., посвященной функционированию системы мускариновых рецепторов. Иммунологическую тематику этого выпуска продолжает экспериментальная работа Степановой и соавт., разрабатывающих новые рекомбинантные вакцины, в частности против вируса гриппа А, на основе фрагментов субъединицы гемагглютинина.

Мы не оставляем без внимания и проблемы врожденного иммунитета. В обзоре Финкиной и соавт. анализируется функционирование одного из главных игро-

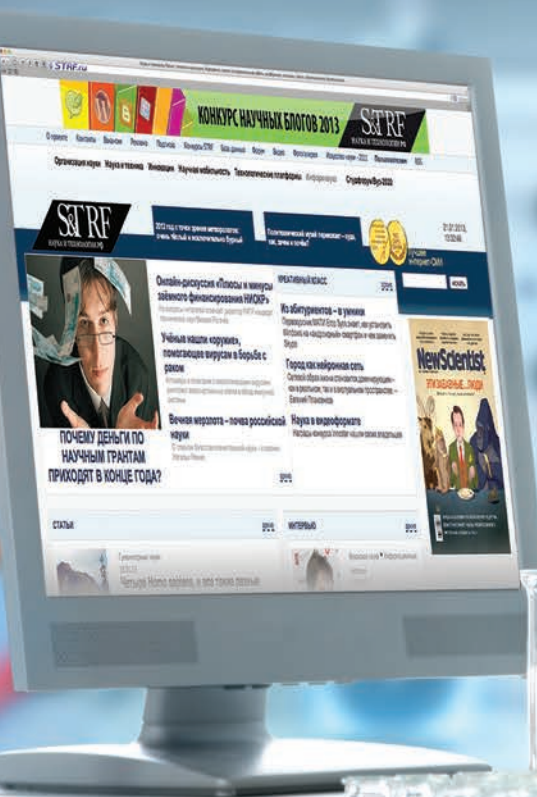
ков в системе врожденного иммунитета растений – липид-переносящих белков. Растительная тематика нашла отражение в экспериментальной статье Лебедева и соавт., создающих ген-модифицированные породы лесных деревьев, устойчивых к гербицидам. Тему конструирования *in silico* ингибиторов критических для жизнедеятельности организма ферментативных путей продолжает работа Нилова и соавт., которые показали, что метаболит нуклеиновых кислот 7-метилгуанин может ингибировать поли(ADP-рибозо)полимеразу, вмешиваясь таким образом в систему репарации ДНК. Авторы говорят о перспективах применения обнаруженной активности в сочетанной химиотерапии онкологических больных. Вопросы целостности ДНК при тепловом стрессе рассмотрены в мини-обзоре Кантидзе и соавт. Эта проблема также крайне важна для биомедицинских перспектив изучения системы теплового шока. Экспериментальная работа Елизарьева и соавт., посвященная регуляции активности генов на модели *Drosophila melanogaster*, несмотря на свой «классический молекулярно-биологический» подход, также имеет определенные перспективы для современной медицинской биотехнологии.

В заключение хочется еще раз обратиться к нашим читателям и потенциальным авторам журнала с пожеланием сотрудничать с нами по широкому спектру увлекательных направлений современной биомедицины. ●

Редколлегия

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

Работает при финансовой
поддержке Министерства
образования и науки РФ



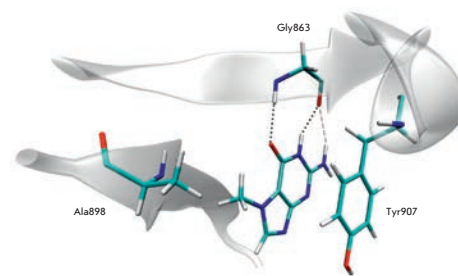
Лучшее российское интернет-СМИ
о науке, образовании, инновациях

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

Ингибирование поли(ADP-рибозо)полимеразы метаболитом нуклеиновых кислот 7-метилгуанином

Д. К. Нилов, В. И. Тараров, А. В. Куликов, А. Л. Захаренко,
И. В. Гущина, С. Н. Михайлов, О. И. Лаврик, В. К. Швядас

Способность метаболита нуклеиновых кислот 7-метилгуанина ингибировать поли(ADP-рибозо)полимеразу 1 (ПАРП-1) и поли(ADP-рибозо)полимеразу 2 (ПАРП-2) выявлена *in silico* и изучена экспериментально. Показано, что для эффективного связывания пуриновых производных с ПАРП важна аминогруппа в положении 2 и метильная группа в положении 7. В ПАРП-ингибирующей концентрации 7-метилгуанин не токсичен, но способен усиливать апоптотическую гибель BRCA1-дефицитных клеток рака молочной железы под воздействием цисплатина и доксорубицина – широко используемых ДНК-повреждающих химиотерапевтических препаратов.



Позиция молекулы 7-метилгуанина в активном центре ПАРП-1 и характерные взаимодействия, выявленные с помощью молекулярного моделирования



Однолетние растения осины генотипа Pt через 7 дней после обработки гербицидом Basta: слева – нетрансгенный контроль, справа – линия PtX1Bar14a

Испытания трансгенных растений осины с геном *bar* на устойчивость к гербицидам в полунатуральных условиях

В. Г. Лебедев, В. Н. Фасхиев, Н. П. Коваленко, К. А. Шестибратов,
А. И. Мирошников

Получен ряд трансгенных линий осины с геном *bar*, придающим устойчивость к гербицидам, содержащим фосфинотрицин. Испытания в полунатуральных условиях показали устойчивость полученных линий к 2-кратной полевой дозе гербицида Basta. Отобраны четыре линии, обладающие не только высокой устойчивостью к гербицидам, но и к экстремально низким температурам. Эти растения перспективны для проведения дальнейших исследований, в частности полевых испытаний.

Подход к диагностике точечных мутаций в нативной ДНК с применением оксида графена

А. А. Кузнецов, Н. Р. Максимова, В. С. Каймонов,
Г. Н. Александров, С. А. Смагулова

С целью диагностики точечных мутаций в нативной ДНК разработан новый подход к созданию тест-систем с применением оксида графена. Принцип нового подхода заключается в использовании оксида графена для сорбции и тушения флуоресцентно меченных праймеров в постаmplификационной ПЦР-смеси с последующей регистрацией флуоресцентно меченного продукта ПЦР.

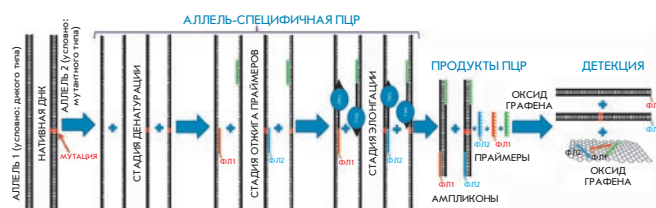


Схема диагностики точечных мутаций в нативной ДНК с использованием разработанного подхода

Acta Naturae

ТОМ 8, № 2 (29), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 2016

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. Исагулянец (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. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: С.Б. Невская
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин
Корректура: 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 19 мая 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

Публикация в журнале бесплатная
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.000

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов..... 1

ФОРУМ

П. А. Каменский, А. Э. Сазонов, А. А. Федянин,
В. А. Садовничий

Биологические коллекции: стремление к идеалу 6

ОБЗОРЫ

М. А. Носенко, М. С. Друцкая, М. М. Мойсенович,
С. А. Недоспасов

Биоинженерия искусственных лимфоидных
органов..... 11

О. А. Чернова, Е. С. Медведева, А. А. Музыкантов,
Н. Б. Баранова, В. М. Чернов

Микоплазмы и их устойчивость к антибиотикам:
проблемы и перспективы контроля
микоплазменных инфекций и контаминаций
клеточных культур..... 27

В. Н. Новоселецкий, А. Д. Волынцева, К. В. Шайтан,
М. П. Кирпичников, А. В. Феофанов

Моделирование структуры комплексов потенци-
ал-управляемых калиевых каналов с пептидными
блокаторами: методы и результаты..... 39

СОДЕРЖАНИЕ

Е. И. Финкина, Д. Н. Мельникова, И. В. Богданов,
Т. В. Овчинникова

Белки системы врожденного иммунитета растений, осуществляющие транспорт липидов: структура, функции и практическое применение 53

Е. З. Голухова, О. И. Громова, Р. А. Шомахов,
Н. И. Булаева, Л. А. Бокерия

Моногенные аритмические синдромы: от молекулярно-генетических аспектов к постели больного 70

О. Л. Кантидзе, А. К. Величко, А. В. Лужин, С. В. Разин

Повреждения ДНК при тепловом стрессе 84

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

П. В. Елизарьев, Д. В. Ломаев, Д. А. Четверина,
П. Г. Георгиев, М. М. Ерохин

Роль проходящей транскрипции в активности PRE у *Drosophila melanogaster* 89

А. А. Кузнецов, Н. Р. Максимова, В. С. Каймонов,
Г. Н. Александров, С. А. Смагулова

Подход к диагностике точечных мутаций в нативной ДНК с применением оксида графена 97

В. Г. Лебедев, В. Н. Фасхиев, Н. П. Коваленко,
К. А. Шестибратов, А. И. Мирошников

Испытания трансгенных растений осины с геном *bar* на устойчивость к гербицидам в полунатуральных условиях 103

Е. А. Никитская, Ж.-Ш. Гривель, Е. В. Марюхнич,
А. М. Лебедева, О. И. Иванова, П. П. Саввинова,
А. В. Шпектор, Л. Б. Марголис, Е. Ю. Васильева

Цитомегаловирус в плазме больных острым коронарным синдромом 114

Д. К. Нилов, В. И. Тараров, А. В. Куликов,
А. Л. Захаренко, И. В. Гущина, С. Н. Михайлов,
О. И. Лаврик, В. К. Швядас

Ингибирование поли(ADP-рибозо)полимеразы метаболитом нуклеиновых кислот 7-метилгуанином 120

Л. А. Степанова, М. В. Сергеева, М. А. Шуклина,
А. А. Шалджян, М. В. Потапчук, А. В. Коротков,
Л. М. Цыбалова

Гибридный белок на основе второй субъединицы гемагглютинаина вирусов гриппа А/H2N2 формирует перекрестный иммунитет 129

С. В. Тапилина, Д. В. Абрамочкин

Снижение чувствительности миокарда к стимуляции мускариновых рецепторов третьего типа в постнатальном онтогенезе ... 141

Правила для авторов 147

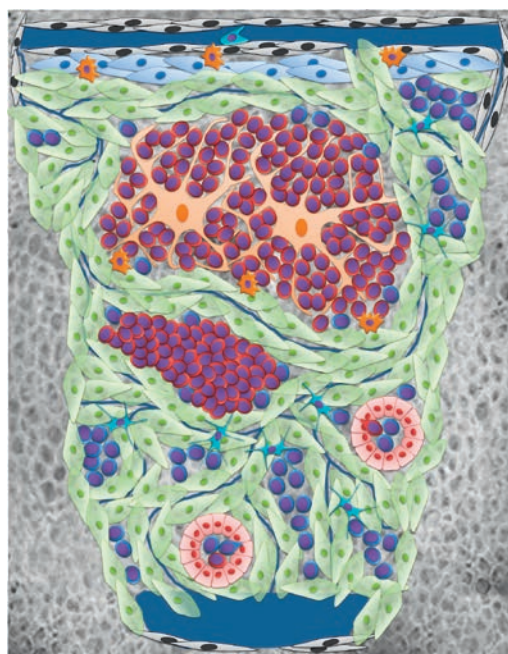


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(См. статью Носенко и др.)

УДК 573.7

Биологические коллекции: стремление к идеалу

П. А. Каменский*, А. Э. Сазонов, А. А. Федянин, В. А. Садовничий

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

*E-mail: kamenski_pa@mail.bio.msu.ru

Данный материал подготовлен по результатам анализа деятельности биологических коллекций в России и в мире, проведенного в рамках проекта «Научные основы создания Национального банка-депозитария живых систем», выполняемого в МГУ имени М.В. Ломоносова [1].

Что такое «биологическая коллекция»? В настоящее время под терминами «биологическая коллекция» и «биобанк» понимают разные вещи. Биологическая коллекция – это систематизированное хранилище совокупности образцов биологического материала любого типа. К понятию же «биобанк» обычно относят только коллекции биологического материала человека [2]. Таким образом, термин «биологическая коллекция» шире, чем термин «биобанк», и в данной работе мы будем использовать именно его.

Руководствуясь приведенным выше определением, можно выделить несколько видов биологических коллекций в зависимости от типов хранимого в них биологического материала и способов хранения.

Говоря о биологических коллекциях, чаще всего подразумевают **криоколлекции**, в которых материал хранится в замороженном виде. Такие коллекции организуются для долговременного хранения биологических образцов и всегда должны обеспечивать их жизнеспособность и нормальное функционирование после размораживания. Обычно в криоколлекциях хранят именно клетки, но не целые организмы (исключе-

ние составляют, конечно же, одноклеточные организмы). Такой способ хранения пригоден для клеток организмов всех царств живого на Земле. Протоколы криохранения наименее отработаны для клеток высших растений, которые в силу своих цитологических особенностей относительно слабо сохраняют жизнеспособность в процессе замораживания/размораживания [3]. Тем не менее и такие клетки успешно хранятся в криоколлекциях. Отметим также, что в замороженном виде хранятся и выделенные из живых организмов нуклеиновые кислоты, поэтому соответствующие коллекции также должны относиться к криоколлекциям.

Еще один тип биологических коллекций – это «**классические**» **коллекции**. В первую очередь, к таким коллекциям относятся собрания зоологических музеев и гербариев. Именно классические коллекции были первыми коллекциями биологического материала на Земле; история некоторых из них насчитывает более двух веков. В последнее время становится очевидным, что такие собрания биологического материала, помимо использования для изучения биоразнообразия, являются ценнейшим источником ДНК, которую вполне возможно выделить из храни-

мых образцов и проанализировать молекулярно-генетическими методами [4]. В результате становится реальным проведение масштабных молекулярно-филогенетических исследований на очень больших выборках, что, конечно же, приводит к получению более значимых результатов.

Говоря о биологических коллекциях, часто забывают отнести к ним **коллекции биологической информации**, обладающие огромной важностью для развития науки и технологии. К данной категории, в основном, относятся компьютерные базы данных, содержащие информацию о первичной, вторичной и третичной структуре биологических молекул. Для примера можно упомянуть такие базы данных, как GenBank (нуклеотидные последовательности геномов различных организмов, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и Protein Data Bank (третичные структуры белков, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Основная отличительная черта коллекций биологической информации – их «глобальность», которая обеспечивается за счет свободного доступа к ним из любой точки мира по сети Интернет.

Зачем нужны биологические коллекции? Помимо типа храни-

мых образцов, в качестве критерия классификации биоколлекций может рассматриваться их функциональное назначение.

Большинство коллекций, существующих в мире на сегодняшний день, – это **исследовательские коллекции**. Под этим термином понимают наборы биологических образцов, хранящиеся в исследовательских лабораториях и необходимые для их повседневной деятельности. Типы образцов в таких коллекциях могут быть самыми разными – от отдельных биологических молекул до целых организмов. Исследовательские коллекции обычно бывают небольшими, но именно они сегодня вносят самый весомый вклад в развитие фундаментальных наук о жизни, позволяя ученым проводить сравнительные исследования. Нужно отметить, что подобные коллекции могут быть и очень объемными. К примеру, собрания музеев естественной истории и гербариев зачастую насчитывают по несколько миллионов образцов и активно используются в научной работе. Упомянувшиеся ранее глобальные коллекции биологической информации в первую очередь также являются исследовательскими.

В последнее время массовое распространение получили **коммерческие коллекции**, т.е. коллекции биологического материала, фонды которых предназначены для продажи. На самом деле подобные коллекции начали появляться еще несколько десятилетий назад, но тогда хранившиеся в них образцы предназначались исключительно для исследовательских целей. В качестве примера можно привести несколько коллекций штаммов пекарских дрожжей [5]. В более поздних коммерческих коллекциях чаще всего хранится донорский биологический материал человека (половые клетки, клетки крови

и др.), а принадлежат такие коллекции частным учреждениям. Потребителями образцов из коммерческих коллекций являются как частные лица (например, при экстракорпоральном оплодотворении), так и фармацевтические компании, использующие клеточный материал человека для предварительных клинических испытаний лекарственных средств.

Наконец, обязательно нужно упомянуть о **«государственных» коллекциях**, т.е. о таких коллекциях, которые собираются и поддерживаются в интересах государства. В первую очередь, к данной категории относятся коллекции, основное предназначение которых – сохранение биологического разнообразия. В качестве примеров таких коллекций можно привести зоопарки и ботанические сады (хотя, безусловно, они используются и в исследовательских, и в общекультурных целях), а также природные заповедники и заказники. Коллекции для сохранения биоразнообразия не обязательно должны поддерживаться государством, они могут быть результатом инициативы профессионального сообщества, как, например, международный консорциум Frozen Ark («Замороженный ковчег»), организованный на базе нескольких десятков исследовательских лабораторий, в которых хранится замороженный клеточный материал редких и вымирающих видов [6]. Помимо сохранения биоразнообразия, государственные коллекции могут организовываться для оптимизации полезного использования биологических ресурсов. Например, в коллекции Natural Product Repository («Хранилище естественных продуктов») при Национальном институте здоровья США [7] хранятся более 100000 экстрактов различных животных и растений, используемых для поиска новых биологически активных

веществ. В России примером такой коллекции может служить Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов – единственная на сегодняшний день организация, которой государством присвоен статус национального биоресурсного центра [8]. В этой коллекции собраны микроорганизмы, имеющие большое значение для биотехнологии. Также стоит упомянуть о таких коллекциях общероссийского значения, как Всероссийская коллекция микроорганизмов и Российская коллекция клеточных культур.

Не стоит забывать, что сохранение биоразнообразия – это, в том числе, и вопрос национальной безопасности. Прежде всего, это относится к сохранению клеток-продуцентов для промышленной и медицинской биотехнологии, биообъектов для животноводства и растениеводства. В кризисной ситуации при отсутствии собственных коллекционных фондов российская промышленность и сельское хозяйство могут быть отброшены на десятилетия назад.

Российские и зарубежные биоколлекции. Сведения о крупнейших российских коллекциях биологического материала представлены в *таблице*.

Как уже отмечалось, главные цели биоколлекционной деятельности – сохранение биоразнообразия, его исследование и полезное использование. В случае российских биологических коллекций лучше всего дело обстоит с их исследовательской функцией. Как видно из *таблицы*, подавляющее большинство крупных российских коллекций осуществляют научную деятельность, ежегодно публикуя сотни работ, посвященных всестороннему исследованию хранившихся в них образцов.

Что касается сохранения биологического разнообразия, здесь ситуация уже несколько сложнее.

Крупнейшие российские биологические коллекции в порядке убывания коллекционных фондов

Коллекция	Организация	Хранимые образцы			Источник информации
		Тип	Количество	Назначение	
Коллекция ЗИН	Зоологический институт РАН	Биоматериал животных (в неживом виде)	60 000 000	Научные исследования, музейная деятельность	https://www.zin.ru/Collections/
Зоологический музей МГУ	МГУ им. М.В. Ломоносова	То же	10 000 000	То же	http://zmmu.msu.ru/
Ботаническая коллекция БИН	Ботанический институт РАН	Засушенные растения (небольшое количество живых клеточных культур)	7 000 000	Научные исследования	http://www.binran.ru/collections/
Гербарий МГУ	МГУ им. М.В. Ломоносова	Засушенные растения	1 000 000	То же	http://herba.msu.ru/russian/departments/herbarium/General_Information/Collection/
Вавиловская коллекция семян культурных растений	Всероссийский институт растениеводства РАН	Семена культурных растений	300 000	Сохранение полезного биоразнообразия, сельское хозяйство	http://vir.nw.ru/otd_r.htm#dept
Всероссийская коллекция микроорганизмов	Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН	Замороженные микроорганизмы	20 000	Выдача образцов внешним потребителям, научные исследования	http://ibpm.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=249:vkm&catid=4&Itemid=15
Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (Национальный биоресурсный центр)	ФГУП ГосНиигенетика	То же	20 000	Биотехнологическая промышленность, научные исследования	http://vkpm.org/obioresursnom-tsentre/
Российская коллекция клеточных культур	Расположена в 9 разных организациях (головная – Институт цитологии РАН)	Замороженные клетки человека, животных и растений	3 000	Выдача образцов внешним потребителям, научные исследования	http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk_ru.htm

В современных технологических условиях решать проблему сохранения биоразнообразия требуется на двух уровнях – организменном и клеточном. На первом уровне работы проводятся в зоопарках, ботанических садах, природных заповедниках, и здесь позиции России в мире довольно сильны. По состоянию на 2014 год на территории нашей страны насчитывалось 104 заповедника [9], что значительно больше, чем в каком-либо другом государстве. С другой стороны, нельзя не признать, что в современных реалиях традиционные меры по охране редких и исчезающих видов жи-

вых существ обязательно должны дополняться высокотехнологическими мерами, а именно, хранением клеточного материала таких существ в криоколлекциях. И в этом аспекте биокolleкционной деятельности отставание России от других развитых стран, пожалуй, максимально. Если за рубежом уже достаточно долгое время функционируют международные консорциумы, сохраняющие клеточный материал редких видов (например, уже упоминавшийся выше Frozen Ark и др.), то в России аналогичные работы находятся на самых ранних этапах выполнения.

Не лучшим образом обстоит в нашей стране дело и с полезным использованием биологических ресурсов. Применение живых систем на практике, в основном, осуществляется в биотехнологии и в медицине. Говоря о биотехнологии, нужно отметить, что в этой области работа российских биокolleкций довольно активна. Это касается преимущественно коллекций микроорганизмов (ВКПМ, ВКМ, несколько малых коллекций микроводорослей), которые вот уже много лет успешно внедряют в практику результаты своей деятельности, создавая и оптимизируя штаммы – проду-

центры различных веществ. С другой стороны, участие российских биобанков в медицинской деятельности в настоящее время минимально. В Европе и США еще 5 лет назад насчитывалось несколько десятков как глобальных, так и специализированных крупных коллекций клеточного материала человека [10], и с тех пор их число только выросло. Образцы из таких коллекций активно используются в биомедицинских исследованиях и разработках, и сегодня, когда развитие клеточных медицинских технологий происходит взрывообразно, такие коллекции приобретают особую важность. Наконец, нельзя не отметить, что в нашей стране отсутствуют крупные коллекции, связанные с сельскохозяйственным животноводством. Это, конечно же, в значительной степени тормозит развитие сельского хозяйства как одной из ключевых отраслей российской экономики.

Проанализировав текущую деятельность биологических коллекций, мы с полной уверенностью утверждаем, что такие коллекции обладают огромным научно-технологическим потенциалом, который в настоящее время реализуется не полностью в силу нескольких причин. Итак, **каковы современные вызовы, стоящие перед российскими специалистами, организующими и поддерживающими биологические коллекции?** В первую очередь еще раз отметим слабое развитие криобанков государственного значения, направленных на сохранение и полезное использование биологического разнообразия нашей страны (см. выше).

Серьезнейшей проблемой современных биобанков (не только в России, но и во всем мире) является их разрозненность. Это в наибольшей степени относится к небольшим исследовательским коллекциям, которые,

как говорилось выше, имеются в подавляющем большинстве научных лабораторий. Чаще всего ученые, поддерживающие свои локальные коллекции и работающие с ними, никак не оповещают научную общественность о том, какие именно образцы в них хранятся, часто не имея ресурсов для этого, а иногда попросту не задумываясь о том, что их материал может быть крайне полезен их коллегам из других организаций. Между тем, виртуальное объединение исследовательских (и не только) коллекций в единой информационной системе стало бы крайне эффективным именно в настоящее время, когда все большую важность приобретают широкомасштабные исследования на большом количестве разных биологических объектов. Понимание этой проблемы существует и на государственном уровне. Так, Министерством образования и науки Российской Федерации в 2014 году была сформирована рабочая группа по разработке подходов к созданию национальных биологических ресурсных центров на основе действующих биологических коллекций. Одна из основных задач рабочей группы – проведение глобальной ревизии действующих биологических коллекций России, создание общей базы данных по этим коллекциям, разработка механизма их реорганизации в национальные биоресурсные центры. Схожую инициативу в 2015 году проявили Российская академия наук и Федеральное агентство научных организаций, создавшие рабочую группу по поддержке и развитию биоресурсных коллекций. В ее задачи также входят, помимо прочего, проведение ревизии исследовательских коллекций и выработка рекомендаций по их централизации, стандартизации и доступности. Вне всякого сомнения, деятельность этих рабочих

групп должна повысить эффективность работы российских ученых.

Необходимо отметить, что коллекциям биологических образцов практически невозможно найти финансирование для работ, связанных с непосредственным поддержанием коллекций. Научные фонды, научные программы министерств чаще всего не рассматривают заявки на данную тему, поскольку не относят их к научным исследованиям. Государственные задания для вузов и НИИ чаще всего также не предполагают подобной деятельности. В итоге биобанки финансируются по «остаточному принципу» либо поддерживаются «на голом энтузиазме» (это два наиболее часто используемых термина для формулировки ситуации с поддержанием биобанков).

Наконец, в качестве важнейшей проблемы, связанной с российскими биологическими коллекциями, нельзя не упомянуть о практически полном отсутствии нормативной базы в данной области. Между тем, формирование нормативно-правового поля для работы с биобанками абсолютно необходимо в первую очередь по причине тесной связи биологических коллекций с понятием «национальные биологические ресурсы». Это понятие аналогично понятию «биологическое разнообразие», но шире его, так как включает в себя и генетические ресурсы населения страны, и биотехнологические ресурсы, и природные богатства. Биоресурсы являются объектом строгого законодательного регулирования по всему миру, однако в России такое регулирование на сегодняшний день слабее, чем в других развитых странах. Так, не регламентирован ввоз и вывоз из страны биологического материала в научных целях. Отсутствие четких процедур приводит к тому,

что обмен биоматериалом – один из наиболее важных аспектов международного научного сотрудничества – либо не осуществляется, что исключает возможность для России участвовать во многих важных и престижных международных научных консорциумах, либо ставит ученых в положение «контрабандистов», что категорически недопустимо.

Кроме того, отсутствуют законы, определяющие работу с биоматериалом человека (закон «О биомедицинских клеточных технологиях» в 2015 году был принят Госдумой России только в первом чтении); не до конца ясна ситуация с регулированием генетической модификации живых организмов (соответствующий законопроект также с 2015 года находится на рассмотрении в Госдуме). С другой стороны, у российских органов власти сегодня имеется понимание важности разработки соответствующей документации, и работа в данном

направлении ведется, в том числе с привлечением представителей научного сообщества. Однако для того, чтобы преодолеть существующие административные барьеры, требуется консолидация всего государственного аппарата, всей исполнительной и законодательной власти.

На основании всего изложенного можно сформулировать меры, которые необходимо принять для максимально эффективного использования биологических коллекций в Российской Федерации:

1. Проведение ревизии имеющихся коллекций.
2. Обмен лучшими практиками в области биокolleкций, разработка единых протоколов для работы с однотипными биообразцами.
3. Создание единой базы данных, содержащей информацию о максимально возможном количестве коллекций, в перспективе – формирование национальной

информационно-аналитической системы.

4. Создание исследовательских центров на базе больших коллекций в рамках государственного задания, формирование вокруг них национальной сети биокolleкций.

5. Взаимодействие представителей научного сообщества, работающего с биокolleкциями, с органами государственной власти для разработки адекватных мер регулирования биокolleкционной деятельности и связанных с ней областей науки и технологии.

6. Создание глобального «биокolleкционного» информационного пространства. ●

*Авторы выражают благодарность сотрудникам Министерства образования и науки России И.В. Казееву и О.А. Егоровой за помощь в работе над статьей.
Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-50-00029.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Садовничий В.А. // Наука и жизнь. 2015. № 12. С. 2–13.
2. De Souza Y.G., Greenspan J.S. // AIDS. 2013. V. 27. № 3. P. 303–312.
3. Volkova L.A., Urmantseva V.V., Popova E.V., Nosov A.M. // Cryo Lett. 2015. V. 36. № 4. P. 252–263.
4. Krinitsina A.A., Sizova T.V., Zaika M.A., Speranskaya A.S., Sukhorukov A.P. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. № 11. P. 1478–1484.
5. Scherens B., Goffeau A. // Genome Biol. 2004. V. 5. № 7. P. 229.
6. MacKenzie-Dodds J., Clarke A., Lermen D., Rey I., Astrin J.J., Seberg O., Oste C.C. // Biopreserv Biobank. 2013. V. 11. № 3. P. 182–188.
7. Brown E.C., Newman D.J. // J. Environ. Monit. 2006. V. 8. № 8. P. 800–805.
8. Приказ Минобрнауки России от 11 августа 2014 г. № 982.
9. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2014 году». – Министерство природных ресурсов и экологии Российской Федерации, 2015.
10. Vaught J., Kelly A., Hewitt R. // Biopreserv Biobank. 2009. V. 7. № 3. P. 143–150.

УДК 571.27

Биоинженерия искусственных лимфоидных органов

М. А. Носенко^{1,2,3*}, М. С. Друцкая¹, М. М. Мойсенович², С. А. Недоспасов^{1,2,3}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

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

³Немецкий научно-исследовательский центр ревматологии, 10117, Берлин, Шаритеплатц, 1, Германия

*E-mail: maxim-nosenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.09.2015

РЕФЕРАТ Обзор посвящен проблеме конструирования искусственных лимфоидных органов. Успех в этой области позволит не только лучше понять механизмы функционирования нормальных органов иммунной системы, но и разработать новые подходы к терапии иммунодефицитов, аутоиммунных состояний и, возможно, других заболеваний. На примере лимфатического узла мыши рассмотрено строение и развитие нормальных лимфоидных органов. Особое внимание уделено роли межклеточных взаимодействий и цитокиновых сигналов в механизмах формирования и функционирования лимфоидных органов. Описаны биоматериалы, на основе которых возможно создание искусственных органов, в том числе органов иммунной системы. Критически рассмотрены достижения последних лет в области биоинженерии искусственных лимфоидных органов и предполагаемые направления исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоинженерия, искусственный лимфоидный орган, полимерный матрикс, стромальные клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АГ – антиген; ДК – дендритные клетки; КВЭВ – клетки высокого эндотелия венул; КЭК – кровеносные эндотелиальные клетки; ЛЭК – лимфатические эндотелиальные клетки; МФ – макрофаг; МЭФ – мышечные эмбриональные фибробласты; РК – ретиноевая кислота; РКМЗ – ретикулярные клетки маргинальной зоны; СКК – стволовые кроветворные клетки; СФ – сфингозин-1-фосфат; T_{ФХ} – T-фолликулярные хелперы; ТЭК – тимусные эпителиальные клетки; ФДК – фолликулярные дендритные клетки; ФРК – фибробластные ретикулярные клетки; iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; LTiC (lymphoid tissue inducer cells) – клетки-индукторы лимфоидной ткани; LToC (lymphoid tissue organizer cells) – клетки-организаторы лимфоидной ткани.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы большой интерес вызывают биоинженерные технологии, позволяющие по-новому подойти к решению современных научных и прикладных задач биологии и медицины. Создание искусственных биосовместимых материалов открывает широкие перспективы для регенеративной медицины, трансплантологии, лечения инфекционных и онкологических заболеваний, а также для фундаментальных исследований ряда важных аспектов тканевой организации живых организмов, когда необходимо сохранить пространственную структуру изучаемого объекта. Разработан достаточно широкий спектр биотехнологических материалов, которые биосовместимы, нетоксичны и позволяют поддерживать функции различных клеток в трехмерном пространстве. Кроме того, возможна «функционализация» этих

биоматериалов, в частности, каркасов или матриксов, о которых речь пойдет далее, в зависимости от конкретной задачи. Это послужило заделом для создания искусственных органов и тканей на основе полимерных каркасов, в том числе искусственных костей [1–4], кожи [5, 6], сердечной ткани [7], а также других тканей и органов. Особое внимание привлекает перспектива получения функциональных искусственных лимфоидных органов, главным образом вторичных или третичных, таких, как лимфоузлы и лимфоидные фолликулы [8–10]. Этот интерес обусловлен возможностью применения подобных структур для коррекции иммунодефицитных состояний и терапии аутоиммунных, инфекционных заболеваний и злокачественных новообразований. Предполагается, что биоинженерные иммунные органы будут частично или полностью выполнять защитные функции

в организме человека при патологических состояниях [10]. Функциональные искусственные вторичные лимфоидные органы (например, искусственные лимфоузлы) позволяют изучать и моделировать не до конца понятые стороны иммунного ответа, а в будущем найти применение при иммунотерапии целого ряда заболеваний. Важным отличием новых способов иммуномодуляции от распространенных сейчас системных подходов (например, системной цитокиновой или антицитокиновой терапии, деплеции популяций лимфоцитов и т.д.) является воздействие на уровне распознавания иммунной системой специфических антигенов, что позволит минимизировать негативные последствия системной иммунотерапии и максимально сконцентрировать действие на причине заболевания. При этом преимущество по сравнению с классической вакцинацией заключается в создании и длительном поддержании наиболее благоприятного микроокружения, обеспечивающего все ключевые клеточные взаимодействия, вовлеченные в иммунный ответ. Во многих случаях это обстоятельство является решающим фактором успешной терапии [11, 12].

СТРУКТУРА ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ И ИХ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Лимфоидные органы – неотъемлемая структурная часть иммунной системы, нарушения в работе которой могут приводить к иммунодефицитам у человека и животных [13, 14]. Выделяют три группы таких органов: первичные, вторичные и третичные. Первичные и вторичные лимфоидные органы в нормальном взрослом организме присутствуют постоянно, тогда как третичные образуются локально в месте возникновения сильной и длительной иммунной реакции, например в области раковой опухоли или хронического воспаления [15]. Первичные лимфоидные органы, тимус и костный мозг, выполняют функцию генерации клеток иммунной системы, а также формирования репертуара рецепторов Т- и В-лимфоцитов, тогда как вторичные и третичные обеспечивают их выживание, взаимодействие с другими клетками, связь врожденного и адаптивного звеньев иммунного ответа, а также активацию и поддержание иммунного ответа. Соответственно моделирование различных лимфоидных органов позволит решить разнообразные проблемы как фундаментальной науки, так и медицины.

Функциональность иммунных органов обеспечивается их уникальной микроархитектурой, разнообразием типов вовлеченных клеток и факторов, воспроизведение которых в модельных системах и представляет основную задачу биоинженерии, так как без правильной организации всех компонентов невозможна их функциональная активность.

Понимание механизмов организации клеток в естественных органах необходимо для построения их искусственных аналогов.

Для всех иммунных органов характерно наличие стромы, часто состоящей из нескольких типов клеток, эндотелиального, мезенхимального, а в некоторых случаях эпидермального происхождения [16, 17]. К основным функциям стромы относятся привлечение и пространственная организация в органе иммунных клеток, поддержание их жизнеспособности, пролиферации, создание условий для эффективного взаимодействия с антигенами и другими клетками. Каждый орган имеет определенный тип стромы, необходимый для функционирования данного органа. В костном мозге взрослого организма из стволовых кроветворных клеток (СКК) и кроветворных клеток-предшественников образуются все гемопоэтические клетки, в том числе лейкоциты всех типов. Для поддержания СКК в костном мозге существуют специальные ниши, обеспечивающие длительную репопуляцию СКК, их дифференцировку в кроветворные клетки-предшественники и генерацию всех необходимых ростков дифференцировки [18, 19]. Помимо этого, костный мозг выполняет важную роль в дифференцировке и реализации функции В-лимфоцитов, клеток памяти, плазматических и других иммунных клеток, что обеспечивается определенными стромальными клетками костного мозга [20].

Многие типы гемопоэтических клеток полностью или практически полностью созревают в костном мозге. Однако предшественники Т-лимфоцитов должны дополнительно пройти несколько этапов созревания в тимусе. Строма тимуса – тимусные эпителиальные клетки (ТЭК) – обеспечивает выживание и селекцию тимоцитов, при этом разные субпопуляции ТЭК помогают осуществить положительную или отрицательную селекцию [21]. При отрицательной селекции большую роль играют ассоциированные со стромой дендритные клетки, активно представляющие аутоантигены [22]. Также в тимусе важен мезенхимальный компартмент, роль которого заключается в поддержании функционирования как эпителиальных, так и гемопоэтических клеток. Во всех этих процессах важная роль отводится многочисленным взаимодействиям между гемопоэтическими, мезенхимальными и эпителиальными клетками [23]. Строма способствует выходу из тимуса «обученных» зрелых Т-лимфоцитов, способных к распознаванию широчайшего репертуара чужеродных антигенов в контексте молекул МНС и при этом наименее агрессивных к собственным антигенам организма [16, 24].

В лимфоузлах, белой пульпе селезенки и других вторичных и третичных лимфоидных органах

стромальные клетки привлекают зрелые иммунные клетки и обеспечивают презентацию антигенов и активацию Т- и В-лимфоцитов, приводящую к их дальнейшей дифференцировке, пролиферации и выполнению эффекторных функций, а также к формированию клеток памяти [25–27]. Особую роль играют лимфоидные органы, ассоциированные с кишечником – брыжеечные лимфоузлы, Пейеровы бляшки, изолированные лимфоидные фолликулы и криптотатчи [28]. Они участвуют в регуляции взаимоотношений организма с симбиотической микрофлорой, формировании толерантности к непатогенным бактериям и пищевым антигенам и ответа против патогенных микроорганизмов [29–31].

Особое значение для биоинженерии искусственных лимфоидных органов имеют вторичные и третичные иммунные органы, так как они являются центральным звеном в запуске адаптивного иммунного ответа [26], а потому происходящие в них процессы представляют большой интерес как для изучения, так и для возможного клинического вмешательства при различных патологических состояниях. В связи с этим структура и развитие этих органов будут рассмотрены более подробно на примере лимфатических узлов. На *рис. 1* приведена схема строения типичного лимфатического узла, и показаны основные этапы формирования в нем адаптивного иммунного ответа.

Анатомически лимфоузлы представляют собой капсулированные органы бобовидной формы, соединенные сосудами с кровеносной и лимфатической системами. По расположению в организме выделяют две основные группы лимфоузлов: брыжеечные, участвующие в формировании иммунного ответа и толерантности к антигенам в кишечнике, и периферические, собирающие лимфу от различных отделов тела, преимущественно из барьерных тканей. Такое разделение объясняется не только анатомическим расположением, но и функциональными различиями, так как эти две группы органов имеют разное происхождение и функции [32–35]. Среди периферических лимфоузлов отдельно выделяют также шейные из-за особенностей их образования в эмбриогенезе и участия в иммунитете слизистых [36, 37]. Несмотря на различия в происхождении и функциях, анатомическая структура всех лимфоузлов довольно сходна и представлена двумя основными отделами: кортексом, образующим основную паренхиму органа, и медуллой, которая сообщается с эфферентными лимфатическими сосудами, несущими лимфу из органа [38]. Область кортекса, граничащая с медуллой, называется паракортексом. Снаружи лимфатический узел покрыт капсулой, через которую орган сообщается с афферентными лимфатическими сосудами. От капсулы внутрь органа отходят соеди-

нительнотканые перегородки (трабекулы), идущие вплоть до медуллярного синуса, образующего ворота лимфоузла [39]. Область между капсулой и кортексом называется субкапсулярным пространством.

Кровеносные сосуды соединены с органом через ворота, далее они идут в паракортекс, называемый также Т-зоной, где формируется сеть капилляров. В кортексе лимфоузла располагаются лимфоидные фолликулы, которые также называются В-зонами [38]. Название зон связано с расположением и функцией этих двух основных групп лимфоцитов в лимфоузле, хотя и не отражает многих нюансов клеточных перемещений и взаимодействий, установленных только в последние годы (благодаря развитию технологий, позволяющих проводить прижизненную визуализацию отдельных клеток в органах и тканях [40]). В-лимфоциты преимущественно находятся и функционируют в В-зонах, тогда как Т-клетки в основном располагаются в паракортексе за исключением фолликулярных хелперных лимфоцитов, играющих важную роль в работе В-лимфоцитов [41]. Наличие отдельных В- и Т-зон лимфатических узлов возможно благодаря формированию в них специального микроокружения, продуцирующего как факторы выживания лимфоцитов, так и «гомеостатические» хемокины (так, для В-зон основными факторами являются цитокины BAFF, CXCL13, для Т-зон – IL-7, CCL21, CCL19) [25, 42–44]. Эти молекулы синтезируются, в основном, стромальными клетками лимфоузлов, а также другими типами клеток, в том числе эндотелиальными и дендритными [42]. В В-зонах присутствуют фолликулярные дендритные клетки, участвующие в созревании В-лимфоцитов и имеющие мезенхимальное происхождение [45], а в Т-зонах – дендритные клетки гемопоэтического происхождения, участвующие в презентации антигенов Т-лимфоцитам [46]. Дендритные клетки гемопоэтического происхождения в основном приходят с афферентной лимфой из различных участков тела, главным образом, из барьерных тканей, где они встретили антиген, активировались и начали экспрессировать хемокиновый рецептор CCR7, ответственный за их перемещение в Т-зоны лимфоузлов. Существуют также резидентные дендритные клетки лимфоузлов, постоянно находящиеся в органе [47]. Их роль заключается в поглощении и презентации антигенов непосредственно из лимфатической жидкости, поступающей в лимфоузел по системе специальных каналов – кондуитов. Эти каналы образованы разветвленной сетью полимеров, включая коллаген I, II, IV, ламинин, фибронектин, ER-TR7 и др. [48].

Лимфоциты постоянно рециркулируют в организме, периодически нанося визиты в различные лимфоузлы под воздействием привлекающих их хемокинов.

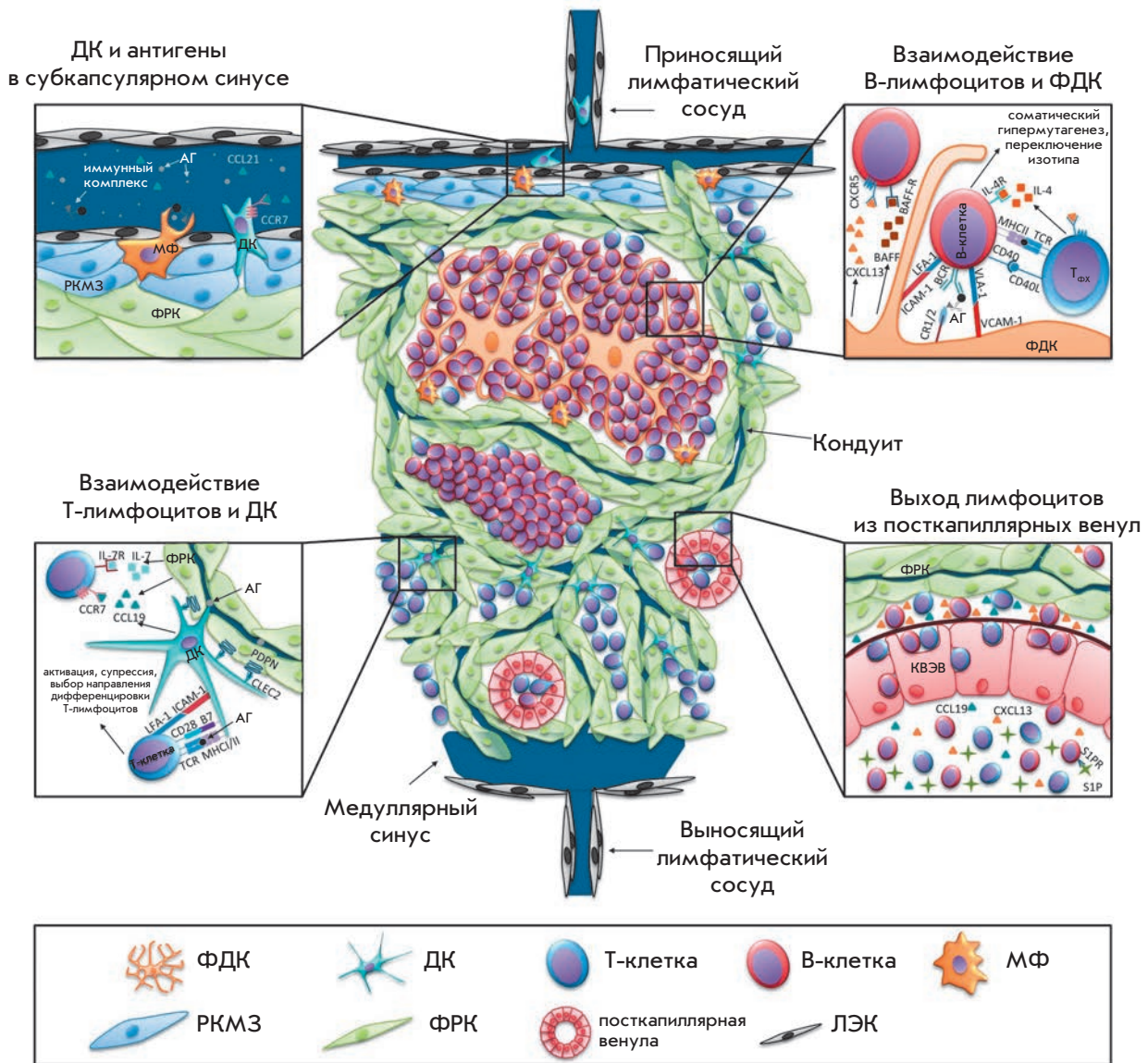


Рис. 1. Схема строения зрелого лимфатического узла. Наиболее важные события, происходящие в лимфоузле, проиллюстрированы с большей детализацией. Лимфа через приносящий лимфатический сосуд поступает в лимфоузел по системе кондуитов, затем собирается в медуллярном синусе и покидает орган через выносящий лимфатический сосуд. С лимфой в лимфоидный орган проникают антигены (свободные или в составе иммунных комплексов) и антигенпрезентирующие дендритные клетки. Другие типы гемопоэтических клеток проникают в орган через посткапиллярные венулы с высоким эндотелием. В дальнейшем клетки под воздействием цитокинов и хемокинов распределяются по Т- и В-зонам лимфатических узлов, где происходят основные события формирования иммунного ответа. Лимфоциты покидают орган через посткапиллярные венулы под влиянием градиента концентрации сфингозин-1-фосфата (СФ). Строма органа играет ключевую роль в формировании необходимых функциональных ниш, продукции цитокинов и хемокинов и, таким образом, способствует развитию иммунного ответа

Попадание этих клеток в лимфоузел очень важно для гомеостаза иммунной системы, так как для зрелых лимфоцитов стромальные клетки лимфоузлов служат основным источником факторов выживания [42]. Время, которое лимфоцит проводит в лимфоид-

ном органе, определяется балансом хемотактических сигналов. Так, после проникновения в паракортекс лимфоузла под действием градиента концентрации «гомеостатических» хемокинов через специальные венулы с высоким эндотелием в лимфоцитах посте-

пенно усиливается экспрессия рецептора сфингозин-1-фосфата (СФ). Концентрация этого фактора очень высока в крови и лимфе, но он практически не продуцируется в лимфоузлах [49]. Под действием градиента концентрации СФ лимфоциты перемещаются в медуллу органа, а затем выходят через эфферентные лимфатические сосуды в лимфоток. При этом взаимодействие рецептора со своим лигандом СФ приводит к интернализации комплекса и прерыванию хемотактического сигнала, в результате чего клетки вновь приобретают возможность проникать в лимфоузлы под действием градиента концентраций хемокинов в крови [50]. Эта система обеспечивает эффективную рециркуляцию лимфоцитов в организме, что необходимо для отбора лимфоцитов с оптимальной специфичностью Т- и В-клеточных рецепторов (TCR и BCR) к появившимся в данный момент антигенам [51].

Помимо привлечения и поддержания гомеостаза иммунных клеток, лимфатические узлы обеспечивают формирование всех необходимых взаимодействий для эффективного иммунного ответа, который обусловлен не только свойствами презентующих и эффекторных клеток, но и особой архитектурой лимфоузла [26]. Так, кортекс органа пронизан системой кондуитов, по которым перемещаются лимфоциты и на которых оптимально расположены антигенпрезентирующие клетки. Такая пространственная организация обеспечивает наибольшую вероятность встречи клеток этих двух типов, что облегчает поиск рецепторов, специфичных к конкретному антигену, представленному на дендритных или других антигенпрезентирующих клетках, среди огромного репертуара Т-клеточных рецепторов [8, 48, 51].

СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

Вклад отдельных типов стромальных клеток в поддержание и функционирование лимфоузла, их взаимодействие и происхождение пока недостаточно понятны. На сегодняшний день самыми изученными мезенхимальными стромальными клетками вторичных лимфоидных органов являются фибробластные ретикулярные клетки (ФРК) и фолликулярные дендритные клетки (ФДК) [33, 40, 43, 50, *рис. 1*]. Первые играют важную роль преимущественно в работе Т-лимфоцитов, тогда как ФДК необходимы для полноценной функции В-зон [25, 42]. ФРК образуют и поддерживают систему кондуитов, необходимую для миграции и взаимодействия иммуноцитов и доставки антигенов из лимфы [48, 52]. Для функционирования лимфоузла важны три основных типа эндотелиальных клеток: лимфатические эндотелиальные клетки (ЛЭК), кровеносные эндотелиальные клетки (КЭК) и их разновидность

– клетки высокого эндотелия венул (КВЭВ) [33, 42]. Роль этих клеток заключается в поддержании постоянного контакта органа с лимфатической и кровеносной системами, точнее, обеспечении обмена иммунными клетками и антигенами. ЛЭК обеспечивают привлечение и проникновение в лимфоузел мигрирующих дендритных клеток, а также перенос антигенов из лимфы в систему кондуитов лимфоузла [53, 54]. Обычные КЭК выстилают кровеносные сосуды, проходящие в органе, тогда как КВЭВ обеспечивают миграцию лимфоцитов из кровотока в паракортекс лимфоузла, откуда те распределяются по соответствующим зонам в органе [42]. Недавно был открыт еще один тип стромальных клеток, располагающихся в субкапсулярной зоне лимфоузлов, а также обнаруживаемых в других вторичных лимфоидных органах, но отсутствующих в третичных – ретикулярные клетки маргинальной зоны (РКМЗ) [55, 56]. Показано, что РКМЗ являются непосредственными предшественниками ФДК, в том числе при формировании зародышевых центров в фолликулах [57]. Также постулируется их роль в поддержании пула ФРК, но это утверждение требует строгого доказательства.

Основная проблема в этой области исследований состоит в том, что, несмотря на достаточно полное описание функций стромальных клеток, их точный фенотип все еще остается предметом дискуссий, и разные авторы придерживаются разных точек зрения [33, 42, 45, 58]. Отчасти это связано с тем, что универсальные поверхностные маркеры обнаружены далеко не на всех стромальных клетках. Многие из изучаемых поверхностных молекул относятся к неизбирательным маркерам многих клеточных популяций. Так, основными маркерами большинства зрелых стромальных клеток лимфоузлов и их предшественников считаются молекулы адгезии ICAM-1 и VCAM-1, которые обеспечивают как межклеточные контакты в строме, так и взаимодействие с проходящими иммунными клетками, экспрессирующими на своей поверхности соответствующие интегрины [32, 59]. Важным маркером некоторых типов стромальных клеток лимфоузлов, главным образом ЛЭК и ФРК, является гликопротеин подопланин (gp38). Эта молекула играет важную роль в поддержании нормального состояния эндотелиальных клеток сосудов и капсулы в лимфоузле, регулирует снабжение органа кровью и лимфой, миграцию дендритных клеток и адаптивную реакцию ФРК при сильном воспалении [54, 60]. Для всех эндотелиальных клеток характерна экспрессия CD31 как основного маркера эндотелия. Специфические поверхностные маркеры большей части стромальных клеток лимфоузлов не известны, их характе-

ризируют либо по совокупности ряда «пан-маркеров», либо по экспрессии специфических генов и продукции соответствующих факторов, однако это еще не устоявшаяся классификация. Так, еще недавно экспрессия хемокина CXCL13 в зрелом лимфоузле приписывалась исключительно ФДК, предполагаемым основным участникам В-клеточного ответа. На сегодняшний день существуют данные о том, что ретикулярные клетки маргинальных зон (РКМЗ) и даже ФРК также способны синтезировать CXCL13, а нарушение его продукции этими клетками оказывает существенное влияние на функцию В-лимфоцитов и иммунный ответ [42, 44]. Тем не менее часть стромальных клеток можно выделить по совокупности экспрессии нескольких поверхностных маркеров. Так, ФДК экспрессируют CD35, CD21 (рецепторы комплемента), FcγRIIB, улавливающие иммунные комплексы для последующей презентации В-лимфоцитам в герминативных центрах, и не несут при этом на поверхности типичных маркеров гемопоэтического ряда (например, CD45) [45]. РКМЗ и, возможно, ФДК экспрессируют молекулы адгезии MAdCAM-1 [55]. ФРК часто выделяют по признаку продукции компонентов межклеточного матрикса, необходимых для сборки кондуитов, например, ERT7 [58], однако такие маркеры можно использовать только при иммуногистохимическом окрашивании срезов лимфоузлов, но не при цитометрии, когда клетки не связаны с компонентами матрикса. Для ЛЭК характерна экспрессия маркера Luve-1, а КВЭВ в зрелом лимфоузле, в отличие от КЭК, специфически экспрессируют адрессин PNA_d и молекулы адгезии MAdCAM-1 [42].

Таким образом, стромальный компартмент лимфатических узлов и других вторичных лимфоидных органов находится в стадии активного изучения, и остается много вопросов, которые требуется прояснить для полноценного понимания функций всех клеток-участников. Такое понимание важно для биоинженерии искусственных лимфоидных органов, целью которой является создание функционального органа из минимального числа хорошо охарактеризованных компонентов. На основе данных о функционировании лимфоидных органов можно предположить, что для эффективного выполнения своей функции искусственный лимфоузел должен иметь соответствующую инфраструктуру, представленную, в первую очередь, правильно организованным стромальным компартментом. Внесение всех нужных компонентов стромы будет определять эффективность той или иной иммунной реакции, происходящей в данной системе, а также позволит отслеживать стадию развития искусственного органа на основании анализа состава стромальных клеток.

ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

Для успешной биоинженерии искусственных лимфоузлов важно понимать процессы, определяющие развитие лимфоидных органов в эмбриогенезе. Такое знание может позволить дифференцировать все необходимые типы клеток из клеток-предшественников, выделенных из эмбриональной ткани, либо получать из клеток-предшественников цельный орган. Краткая схема развития лимфоидного органа на примере лимфоузла представлена на *рис. 2*. Установлено, что в процессе эмбриогенеза зачаток лимфоузла (анлаген) закладывается в определенных местах в результате дифференцировки эндотелия венул в лимфатический эндотелий [61] и формирования эндотелиального кармана, который в дальнейшем участвует в образовании капсулы и сети кондуитов в лимфоузле, а также связывает орган с лимфатической и кровеносной системами [32]. Дальнейшие события затрагивают малодифференцированные мезенхимальные клетки вокруг сосудов (перичиты), являющиеся предшественниками ФДК и, по-видимому, всех других стромальных клеток, кроме эндотелиальных [45]. Недавно это было показано для развития селезенки, где из клеток-предшественников, экспрессирующих важные для эмбриогенеза селезенки и поджелудочной железы транскрипционные факторы Nkx2-5 и Islet-1, образуются ФДК, ФРК и другие стромальные клетки [62], хотя происхождение всех типов стромальных клеток из одной популяции клеток-предшественников в случае лимфоузлов еще требует строгого доказательства. Эндотелиальные карманы дают начало лимфатической системе организма, а также лимфоузлам. Выбор местоположения лимфатического узла определяется локальной секрецией ретиноевой кислоты (РК) окончаниями нервных волокон [63]. Под воздействием РК мезенхимальные предшественники начинают секретировать хемокин CXCL13, привлекающий клетки-индукторы лимфоидной ткани (lymphoid tissue inducer cells – LTiC), на поверхности которых появляются молекулы адгезии ICAM-1 и VCAM-1. С этого момента мезенхимальные предшественники называют клетками-организаторами лимфоидной ткани (lymphoid tissue organizer cells – LToC). LTiC мигрируют к анлагену лимфоузла, главным образом, под действием градиента концентрации хемокина CXCL13 и взаимодействуют с LToC [63]. Установлено, что на этом этапе крайне важна передача сигнала через LTβR, который находится на поверхности LToC [64]. Основным лигандом LTβR, участвующим в эмбриогенезе лимфоузлов, – гетеротример LTα₁β₂, который появляется на поверхности LTiC после их взаимодействия с рас-

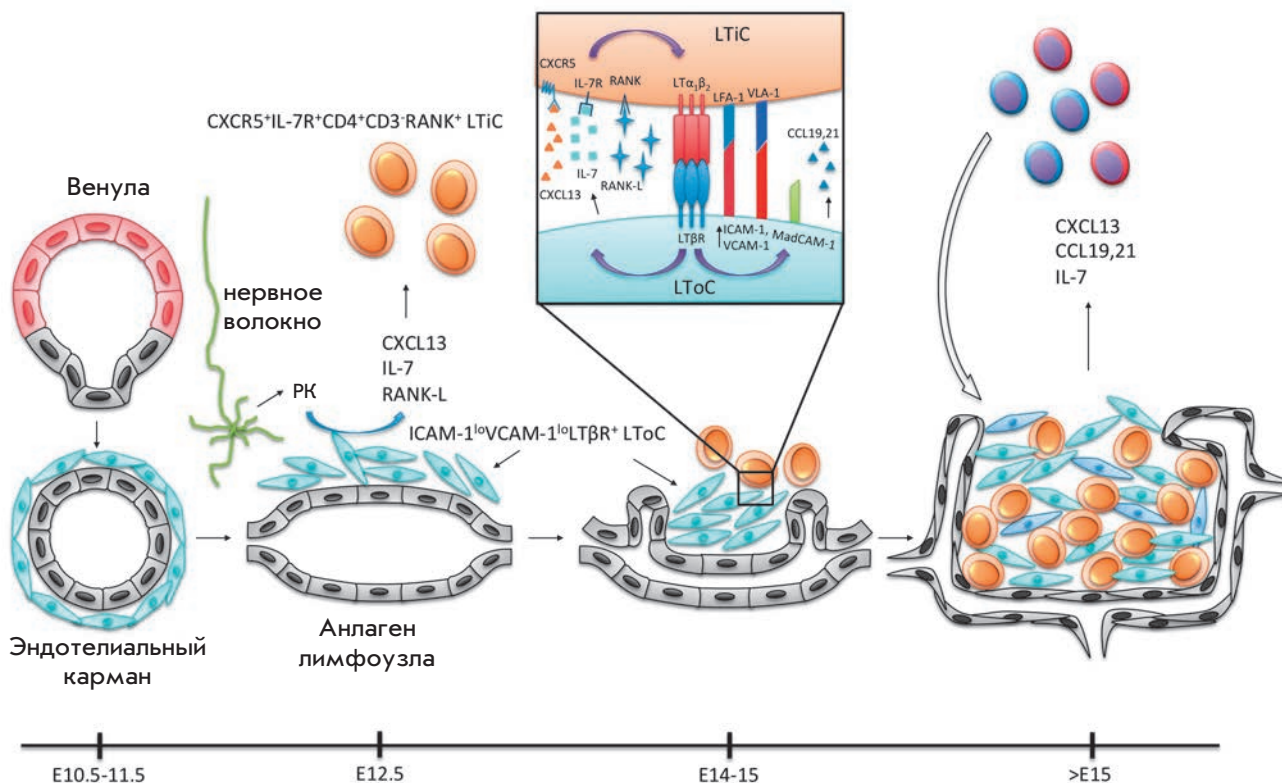


Рис. 2. Схема начальных этапов развития лимфатических узлов. Сроки этапов указаны для организма мыши (варьируются для различных лимфатических узлов). Первоначально происходит закладка лимфатических эндотелиальных карманов, возникающих из эндотелия венул. Эти карманы дают начало лимфатической системе организма, в том числе периферическим лимфатическим узлам. Место закладки лимфоузлов определяется экспрессией нервными окончаниями ретиноевой кислоты (РК). Под влиянием РК происходит активация экспрессии хемокина CXCL13 и других цитокинов мезенхимальными предшественниками вокруг эндотелиального кармана. Под воздействием градиента концентрации хемокина в очаг образования лимфоузла мигрируют LTiC. Важнейший этап формирования органа – взаимодействие LTiC со стромальными предшественниками, которые теперь называются LToc, через взаимодействие LTαβ на поверхности LTiC и LTβR на поверхности LToc. Этот сигнальный путь является ключевым для развития большинства вторичных лимфоидных органов, включая лимфоузлы. Он приводит к дальнейшей дифференцировке LToc, которые, предположительно, дают начало всем мезенхимальным стромальным клеткам лимфоузлов. Под воздействием большого количества хемокинов и цитокинов, а также благодаря экспрессии молекул адгезии MAdCAM-1 и PNA_d происходит миграция лимфоцитов в зачаток лимфоузла. Лимфоциты способствуют дальнейшей дифференцировке стромальных клеток и формированию архитектуры органа посредством членов суперсемейства TNF, таких, как сам TNF, LT, LIGHT и др.

творимым фактором TRANCE (RANK-L), точный источник которого пока не известен, но предполагается, что им могут быть сами LTiC [59, 65, 66]. У мышей с дефицитом LTβR или LTα полностью отсутствуют вторичные лимфоидные органы (кроме лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой носовой полости [67]), а у мышей с генетической инактивацией LTβ развиваются только шейные и брыжеечные лимфоузлы, что указывает на исключительную важность этого сигнального пути в эмбриональном развитии [34, 59]. Этот сигнальный путь запускает дальнейшую дифференцировку LToc, что приво-

дит к усилению экспрессии молекул адгезии, появлению на поверхности клеток MAdCAM-1 и PNA_d, а также к увеличению экспрессии хемокинов, привлекающих все новые гемопоэтические клетки в очаг формирования будущего лимфоузла [32, 59, 64]. Еще один важный для развития лимфоидных органов молекулярный каскад – передача сигнала через рецептор TNFR1. Показано, что генетическая инактивация как TNF, так и TNFR1 приводит к нарушению развития ФДК у мышей и, как следствие, к отсутствию зародышевых центров в лимфоидных органах [68]. Стоит отметить, что члены суперсемейства TNF

играют важную роль в образовании и поддержании не только лимфоузлов, но и всех других лимфоидных органов [34, 59, 65, 68–71]. Таким образом, наблюдается синергия различных сигнальных путей, приводящая в итоге к полноценному формированию и функционированию иммунной системы.

На следующем этапе развития органа, по-видимому, происходит накопление гемопоэтических клеток в формирующемся лимфоузле, что приводит к его разрастанию, дальнейшей дифференцировке стромальных клеток, образованию венул с высоким эндотелием, зачаточных фолликулов и других компартментов, характерных для лимфоузлов [32, 59, 72]. На начальных этапах формирование структурных отделов лимфоузлов происходит независимо от Т- и В-лимфоцитов, тогда как на поздних стадиях они активно проникают в органы и участвуют в окончательном созревании лимфоидных фолликулов и дальнейшем поддержании инфраструктуры стромы за счет передачи сигнала через $LT\beta R$ и $TNFR$ [26, 36]. В данном случае важную роль играет не только $LT\alpha_1\beta_2$, но и еще один лиганд для $LT\beta R$ – LIGHT [65]. Таким образом, формирование и функционирование полноценного лимфоузла (как и других вторичных лимфоидных органов) сильно зависит от взаимодействия мезенхимальных и гемопоэтических клеток, что необходимо учитывать при биоинженерии этих органов. Оба клеточных компонента (в виде зрелых клеток или, возможно, клеток-предшественников) должны быть правильно организованы в зоне закладки и формирования лимфоузла для его эффективного развития и дальнейшего функционирования.

БИОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ

Помимо минимального набора типов клеток, необходимых для функционирования искусственного лимфоузла, важно также сформировать некий каркас, который будет служить структурной основой для правильного расположения клеток в пространстве, что требуется для их эффективного взаимодействия. В ходе онтогенеза стромальные клетки сами выстраивают необходимую структуру, состоящую из полимерных, преимущественно коллагеновых, волокон [58, 59]. В случае биоинженерии искусственного лимфоузла необходимо изначально иметь трехмерный остов, на основе которого клетки будут формировать трехмерную клеточную культуру, а затем и полноценный орган. Это крайне важно на начальных этапах, когда клетки еще не создали свой собственный полимерный каркас, необходимый для их дальнейшей дифференцировки и обеспечения их выживания и функциональности.

Наиболее перспективными для биоинженерии лимфоидных органов представляются искусственные каркасы на основе биоматериалов. Такие материалы состоят в основном из модифицированных полимеров природного происхождения как полисахаридного, так и белкового: фиброина (основного компонента шелка кокона тутового шелкопряда *Bombyx mori*) (рис. 3) [35, 36], спидроина (основного компонента паутины) [73–75], альгината (смесь полисахаридов клеточной стенки водорослей) [76], коллагена [77] и др. Используют также синтетические полимеры, например, PLG (полилактат-ко-гликолат), PLA (полилактат), PGA (полигликолат) и др. [78]. Для улучшения таких свойств полимеров, как упругость, иммуногенность, адгезивность, устойчивость к внешним воздействиям, применяют различные модификации субстрата, например гидроксиапатитом или коллагеном (желатином) [79].

Обязательное требование к биоинженерным материалам – отсутствие антигенных, канцерогенных, токсических и других свойств, ограничивающих их применение в медицине. Подобные эффекты, как правило, связаны с присутствием в полимерном субстрате активных групп, образованных мономером.

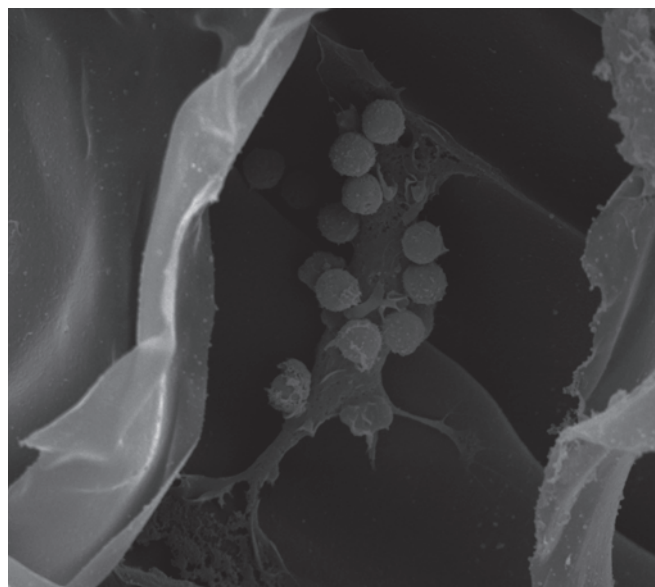


Рис. 3. Пример использования фиброиновых полимерных матриц для биоинженерии искусственных лимфоидных органов. Представлена электронная микрофотография совместной культуры дендритных клеток костномозгового происхождения и спленоцитов в матриксе. В середине находится дендритная клетка, взаимодействующая с группой лимфоцитов. По краям видны структуры фиброинового матрикса

рами или инициаторами реакции полимеризации. Поэтому необходимо тщательно контролировать состав материала, его очистку и модификации для последующего применения [80]. Нежелательные эффекты *in vivo* являются основной причиной того, что многие созданные биоматериалы пока не нашли широкого клинического применения. В связи с этим проводится работа по улучшению свойств биоинженерных материалов, и уже отобраны несколько видов структур, биосовместимых в экспериментах на животных [11, 75]. Впрочем, полностью избежать иммунной реакции организма не удастся, так как почти всегда используются чужеродные материалы. Главная цель при разработке этих материалов состояла в том, чтобы избежать системного ответа и сильного воспаления.

Все обсуждаемые биоматериалы, как правило, представляют собой трехмерный каркас с сетчатой структурой, максимально приближенной к структуре волокон внеклеточного матрикса в животных тканях. По аналогии с ними такие биоинженерные структуры тоже называют матриксами, подчеркивая тем самым их применение в качестве каркаса – трехмерного остова для роста заселенных в них клеточных популяций. Этот подход нашел применение, в первую очередь, в получении 3D клеточных культур, так как известно, что многие особенности взаимодействия клеток в функционирующем органе нельзя воспроизвести в неестественной для клеток среде на поверхности культурального пластика [81]. Матрикс может представлять собой гелеподобную сеть полимеров, например, коллагеновый матрикс, а может иметь более твердую оформленную структуру, которая сохраняет свою форму при проведении механических манипуляций, например при имплантации в организм животного. Последнее обстоятельство наиболее важно для возможного применения материала в медицине, изучения поведения клеток непосредственно в живых объектах, а также в биоинженерии искусственных органов. Для формирования соответствующей формы и текстуры матрикса используется множество подходов [78]. Необходимо, чтобы при полимеризации того или иного мономера, из которого будет сформирован матрикс, образовалась соответствующая трехмерная пористая структура, в противном случае объем каркаса не будет доступным для заселения клетками или насыщения каким-либо веществом.

В некоторых работах для улучшения биосовместимости каркасов используют подход с применением естественного внеклеточного матрикса из организма животных, предварительно освобожденного от населяющих его клеток [82]. Полученные таким образом материалы не вызывают иммунного ответа при их

имплантации, так как не являются чужеродными для организма, однако, как правило, они более подвержены деградации ферментами, что может быть как достоинством, так и недостатком, в зависимости от поставленной задачи.

Однако каркас для искусственного органа – не единственное применение подобных систем. Все больший интерес вызывает использование матриксов для связывания различного рода растворимых биологических факторов с их последующей постепенной диффузией из толщи матрикса, что сможет обеспечить постепенный и протяженный во времени выход биологически активных веществ. В контексте биоинженерии искусственных лимфоузлов эта область интересна тем, что позволяет создать искусственный градиент хемокинов и ростовых факторов, что может быть необходимым для начального запуска программы по поддержанию развития органа. Как уже обсуждалось, в эмбриогенезе привлечение клеток к месту закладки лимфоузла и последующая их дифференцировка достигаются за счет экспрессии предшественниками стромальных клеток, главным образом, хемокина – CXCL13. В случае конструирования искусственного органа источником этого хемокина могли бы стать специальные полимерные частицы, разработкой которых сейчас занимается несколько групп ученых. Так, сообщается [83] о создании альгинатных микросфер, которые можно насытить каким-либо хемокином с его последующим постепенным высвобождением в среду. Такие микросферы имеют размер 5–20 мкм, что позволяет проводить с ними различные манипуляции, например, использовать как источник веществ, привлекающих клетки при моделировании органов и тканей *in vitro*. Другой подход к созданию материалов, обеспечивающих контролируемый выход факторов, обусловлен использованием биоразлагаемых полимеров, ковалентно сшитых с каким-либо активным веществом. При действии ферментов или спонтанном гидролизе будут постепенно высвобождаться и связанные с матриксом факторы, с последующим выполнением своей биологической функции [84].

ДОСТИЖЕНИЯ В БИОИНЖЕНЕРИИ ИСКУССТВЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ

Как мы уже отмечали, задача биоинженерии искусственных органов важна, в первую очередь, из-за своего возможного клинического применения. Крайне заманчивой представляется возможность использования таких органов для репрограммирования иммунного ответа при целом ряде заболеваний. При этом для каждой конкретной задачи итоговая система может иметь не все характеристики нормальных органов, а только те, которые необходимы

для выполнения данной функции. Если искусственные лимфатические узлы смогут обеспечить привлечение, выживание, взаимодействие, активацию и функцию иммунных клеток, то это позволит направлять формирование иммунного ответа в определенном, наиболее эффективном направлении. Искусственные лимфоузлы можно заселять *in vitro* активированными и насыщенными определенными антигенами ДК. После имплантации полученных систем дендритные клетки будут эффективно взаимодействовать с приходящими лимфоцитами, направляя их дифференцировку и функциональную активность. Преимущество таких систем перед вакцинацией антигеном или введением в организм суспензии активированных ДК состоит в том, что они будут представлять подавляющее большинство антигенпрезентирующих клеток в искусственном лимфоузле, а значит, с высокой вероятностью каждый пришедший лимфоцит, специфический к данному антигену, будет подвержен влиянию определенных цитокинов и костимуляторных молекул на поверхности ДК. Предполагается, что имплантация таких систем непосредственно в очаг опухолевого роста или аутоиммунной реакции позволит репрограммировать специфические лимфоциты и оказывать терапевтическое воздействие. Хотя до реализации этой идеи требуется пройти длительный путь создания полноценного функционального искусственного лимфоузла, уже возможно создание редуцированных систем, которые также могут иметь определенное клиническое значение. Основные опубликованные достижения в этой области суммированы в *таблице*.

Так, показана возможность применения матрикса для вакцинации против меланомы у мышей [11, 85]. С этой целью PLG-матрикс насытили гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ), синтетическим олигонуклеотидом, содержащим метилированный CpG, а также частично лизированными клетками меланомы, терапевтическое действие против которой изучали. Предварительно установили, что ГМ-КСФ необходим для привлечения и активации дендритных клеток мыши. CpG добавляли для стимуляции дифференцировки ДК в направлении, приводящем к активации Т-хелперов первого типа, что считается наиболее адекватным ответом на опухоль [86]. Показано, что имплантация таких «структурных вакцин» в виде трехмерного матрикса приводит к рекрутированию кожных ДК мыши, их активации и последующей миграции в дренирующий лимфатический узел. Там они участвуют в созревании специфических Т-хелперов первого типа, что, в конечном итоге, приводит к усилению противоопухолевого ответа у мышей, который проявляется снижением смерт-

ности в модели перевиваемой опухоли. В этой работе матрикс, насыщенный факторами дифференцировки, привлечения дендритных клеток и опухолевыми антигенами, частично выполнял функции третичного лимфоидного органа. Это – простейшая модель, в которой, тем не менее, наблюдали функциональную связь имплантированной структуры с лимфатической системой мыши, что приводило к специфическому направленному иммунному ответу. Показано, что опухоли отторгались в результате индукции сильного цитотоксического ответа лимфоцитов CD8⁺. Важно, что эта схема терапии уже адаптирована для человека и в настоящее время находится на первой стадии клинических испытаний (<https://clinicaltrials.gov/show/NCT01753089>).

В другой модели, более близкой к настоящему иммунному органу [10], пытались создать прототип человеческого лимфатического узла *in vitro*. С этой целью разработали биореактор, имитирующий положение органа относительно сосудистой системы организма. Он содержал в себе первую ячейку, в которой находился матрикс с дендритными клетками, соответствующий лимфатическому узлу, и вторую ячейку, в которую помещали суспензионные лимфоциты как модель кровотока. Ячейки сообщались между собой через пористую мембрану, что обеспечивало свободную циркуляцию как растворимых факторов, так и клеток. Показано, что такая система, при условии регулярной смены среды, достаточно стабильна и может существовать на протяжении минимум 2 недель с сохранением активности клеток. Через 2 недели культивирования оказалось, что, помимо дендритных клеток, в матриксе присутствуют популяции Т- и В-лимфоцитов, пришедших из смежной ячейки биореактора. Лимфоциты, как и дендритные клетки, формировали внутри матрикса кластеры, что могло свидетельствовать об их возможной функциональной активности. Эту модель представляют в качестве возможной тест-системы для изучения действия некоторых лекарственных средств, а также клеточных взаимодействий *in vitro*. Эта модель достаточно хорошо отображает часть происходящих в лимфоузле процессов, а именно, миграцию лимфоцитов и их взаимодействие с дендритными клетками.

Однако, несмотря на успехи, достигнутые в биоинженерии редуцированных моделей лимфоузлов, стало ясно, что полноценный орган не может существовать и функционировать без специальной образующей его стромы. Это привело к активному изучению как биологии стромальных клеток, так и к попыткам использования их для моделирования лимфоидной ткани. Эти два направления были объединены в одной работе [87]. Известно, что при достаточно сильном локальном воспалении увеличи-

ваются размеры и клеточность дренирующих лимфоузлов. Эта адаптивная реакция обеспечивается увеличением скорости деления ФРК проксимального к очагу воспаления лимфоузла, а также увеличением уровня экспрессии хемокинов CCL21 и CCL19, что приводит к привлечению к этому лимфоузлу большего количества лимфоцитов и дендритных клеток. Так как одним из первых изменений при локальном воспалении является значительное увеличение скорости тока лимфы в дренирующий лимфоузел [88], была выдвинута гипотеза, согласно которой ФРК могут реагировать на скорость движения лимфы по системе кондуитов, что приводит к ряду функциональных изменений, например, усилению экспрессии этими клетками хемокинов. Для проверки этой гипотезы авторы сконструировали *in vitro* модель лимфоузла, состоящую из матрикса, заселенного стабильной линией фибробластных ретикулярных клеток, через который проходил регулируемый поток лимфатической жидкости. Показано, что в условиях потока жидкости секреция CCL21 и CCL19 клетками больше, чем в статичной системе. Более того, ток лимфы влиял не только на экспрессию хе-

мокинов, но и на скорость деления клеток, а также на их пространственную организацию в матриксе.

Интересно, что в случае тока жидкости часть клеток формировала специфические каналоподобные структуры, ориентированные по направлению тока. Подобная организация не наблюдалась в статичных условиях. Также под влиянием потока лимфы клетки реорганизовывали матрикс, в котором находились, создавая в нем пространственно-ориентированные структуры. Предполагается, что, помимо участия в реакции лимфоузла на воспаление, ток лимфы может играть роль и при организации структуры органа, регулируя положение и функцию стромальных клеток.

Это очень интересное наблюдение, сделанное на простом прототипе лимфоузла, состоящем из всего одного типа стромальных клеток, наглядно показывало сложную системную взаимосвязь всех компонентов, которую можно изучить исключительно на модели искусственного лимфоидного органа.

Наибольшего успеха в биоинженерии искусственного лимфоузла добились японские ученые, разработавшие систему на основе коллагеново-

Опубликованные модели искусственных лимфоидных органов

Тип объекта	Полимерный каркас	Клеточный состав	Функциональная активность	Ссылка
Биоинженерная вакцина против меланомы	PLG-матрикс, насыщенный ГМ-КСФ, CpG и лизатом опухолевых клеток	Миелоидные дендритные клетки	Привлечение дендритных клеток, в результате чего происходило их созревание, дальнейшая миграция в дренирующий лимфатический узел и активация противоопухолевого иммунного ответа	[11, 49, 51]
<i>In vitro</i> модель человеческого лимфатического узла – био-реактор	Полисульфониевый биореактор с полипропиленовыми волокнами в качестве сосудов и агарозными матриксами, на которых росли клетки	Миелоидные дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты	После запуска системы происходила секреция цитокинов, специфических антител и формирование иммунной памяти в ответ на антигенный стимул	[10, 52]
ФРК-компаратмент лимфатического узла мыши	Полиуретановый матрикс, модифицированный коллагеном	Фибробластные ретикулярные клетки (ФРК)	В ответ на изменения скорости тока жидкости через матрикс происходила адаптивная реакция ФРК, выраженная в повышенной экспрессии хемокинов CCL21 и CCL19 и повышенной скорости деления этих клеток	[50]
Искусственный лимфатический узел мыши	Коллагеновый матрикс	Линия тимусных эпителиальных клеток, продуцирующих LT α , и миелоидные дендритные клетки	После имплантации матриксов с клетками под капсулу почки происходила миграция в него лимфоцитов, формирование Т- и В-зон, продукция антиген-специфических антител. После переноса искусственных лимфоузлов у мышей с иммунодефицитом восстанавливалась продукция антител	[53, 54]
Искусственный тимус мыши	Полимерный каркас не использовали	Агрегат эмбриональных тимоцитов, мезенхимальных клеток и Foxp1 ⁺ фибробластов	При имплантации в бестимусных мышей агрегаты полностью обеспечивали функцию тимуса, генерировали наивные Т-лимфоциты всех основных субтипов	[55]

го матрикса [89, 90]. Они заселяли такие матриксы эпителиальными клетками тимуса линии TET-2 [91], предварительно трансфицированными вектором, содержащим ген лимфотоксина α (LT α), а также ДК, полученными из культуры костного мозга. Такие структуры подсаживали под капсулу почки мышам и наблюдали миграцию в матрикс лимфоцитов реципиента, пространственную кластерную организацию Т- и В-клеток в матриксе, похожую на организацию в лимфатическом узле. При этом показали, что предварительное заселение матрикса дендритными клетками необходимо для эффективной миграции в него клеток реципиента. Кроме того, в матриксе обнаружены клетки, экспрессирующие маркеры эндотелия, что свидетельствовало о росте сосудов. Матрикс, который в течение некоторого времени находился в организме мыши, извлекали и переносили в мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). После трансплантации у мышей с иммунодефицитом наблюдали миграцию клеток из матрикса в селезенку и секрецию антител класса IgG. Показано, что если матриксы с клетками сначала имплантировать мышам, предварительно иммунизированным белковым антигеном (использовали модифицированный овальбумин NP-OVA), а уже затем мышам с иммунодефицитом, то антитела, обнаруживаемые у мышей с иммунодефицитом после трансплантации такого матрикса, имели специфичность к этому антигену. Совокупность полученных данных дала основание назвать полученную систему искусственным лимфатическим узлом. Следует отметить, что в этой работе использовали коллагеновые матриксы, хотя они достаточно быстро деградировали и уменьшались в размерах, что могло сказаться на их эффективности в длительных экспериментах. Для обеспечения длительного нахождения и функционирования искусственного лимфоидного органа в организме реципиента желателно использовать в качестве биоинженерного каркаса более инертные материалы.

Не менее важной задачей является создание искусственного тимуса, что может иметь большое значение для медицины, поскольку с возрастом происходит инволюция тимуса и, как следствие, снижение количества новых Т-лимфоцитов в организме человека, что способствует снижению иммунного ответа на новые инфекции. Создание искусственного тимуса могло бы помочь решить эту проблему. Недавно была опубликована многообещающая работа [92], в которой разработана система получения тимусных эпителиальных клеток (ТЭК), необходимых для функционирования тимуса, с помощью *in vitro* репрограммирования эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) под действием важного для ТЭК транс-

крипционного фактора Foxn1. Показано, что в ходе дифференцировки трансформированные клетки приобретают фенотип нормальных ТЭК: экспрессируют поверхностные маркеры (EpcAM) и гены факторов, важных для их функциональной активности (Dll4, CCL25, Kitl и др.). При этом, несмотря на участие фактора Foxn1 в развитии эпителиальных клеток кожи, в трансформированных МЭФ не обнаружено экспрессии специфических для них генов, что свидетельствует об их ориентации в направлении эпителия тимуса, а не кожи. Далее полученные клетки были охарактеризованы по способности обеспечивать созревание предшественников Т-лимфоцитов *in vitro*, подобно тому, как это происходит в нормальном тимусе. Показано, что сокультивирование трансформированных МЭФ и предшественников Т-лимфоцитов приводит к образованию транзитных популяций тимоцитов (CD4⁺CD8⁺), а также терминально дифференцированных CD4⁺ и CD8⁺ наивных Т-клеток в количествах, сопоставимых с получаемыми при использовании в качестве стромы ТЭК, выделенных из эмбрионального тимуса мыши. При этом нетрансформированные МЭФ не обеспечивали созревания тимоцитов. Немаловажно, что полученные клетки экспрессировали молекулы МНС класса II на уровне, сравнимом с нормальными ТЭК. При этом молекулы МНС класса II экспрессировались только после добавления предшественников Т-лимфоцитов в культуру, что еще раз подчеркивает важность взаимосвязи стромальных и гемопоэтических клеток в функционировании лимфоидных тканей. Известно, что молекулы МНС класса II на поверхности ТЭК важны для селекции тимоцитов в тимусе по способности распознавать молекулы главного комплекса гистосовместимости и при этом незначительно связывать аутоантигены, чтобы на выходе получить функциональные ауто-толерантные клетки. Примечательно, что для последней функции важен ген *AIRE* ТЭК, который экспрессируется, как показано, и в трансформированных *Foxn1* фибробластах. Наконец, полученные клетки использовали в качестве основы модели искусственного тимуса. С этой целью получили тканевые агрегаты, состоящие из трех типов клеток: предшественников Т-лимфоцитов, мезенхимальной стромы эмбрионального тимуса в качестве источника факторов выживания и трансформированных МЭФ. После получения такие агрегаты имплантировали мышам под капсулу почки и через 3–4 недели наблюдали формирование тимусной ткани. Изучение состава этой ткани показало, что агрегаты, полученные с использованием трансформированных фибробластов, после имплантации структурно и функционально воспроизводили ткань нормального тимуса.

Эти органоиды были сопоставимы с искусственной тканью, полученной при имплантации агрегатов с эмбриональными ТЭК, тогда как клеточные агрегаты с добавлением нетрансформированных МЭФ оказались неспособными к формированию тимусной ткани. Полученную систему с уверенностью можно назвать прототипом искусственного тимуса. В нем обнаружено формирование двух подтипов ТЭК, необходимых для полноценной селекции тимоцитов, и их пространственное разделение на зоны, подобно нормальному тимусу. Профили экспрессии генов и поверхностных маркеров, характерных для ТЭК, были сопоставимыми с профилями в нормальном эмбриональном тимусе. Искусственный тимус оказался способным поддерживать дифференцировку Т-лимфоцитов в направлении как $TCR\alpha\beta CD4^+/CD8^+$, так и $TCR\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Наконец, при имплантации полученных систем бестимусным (Nude) мышам в их периферической крови и селезенке формировались зрелые наивные Т-лимфоциты, что доказывало полноценную функциональность органа. Эта работа является важным этапом на пути к биоинженерии искусственного тимуса, в том числе с целью клинического применения [92]. Открытым остается вопрос получения мезенхимального компартмента, так как в указанной работе он был образован эмбриональной тимусной тканью, что невозможно в случае создания искусственного органа для взрослого организма. Решение этой проблемы позволит создать полностью биоинженерный функционально активный орган, который может помочь лучше понять природу происходящих в тимусе процессов селекции тимоцитов и стать важным инструментом при лечении иммунодефицитов человека.

Следует подчеркнуть, что подходы, использующие трансформированные линии клеток, удобны для экспериментальной науки, однако не имеют потенциального клинического применения. Более того, даже в лабораторных исследованиях такие модели будут ограничены одной линией животных, из которых получена культура. Рассматриваются два возможных подхода к решению этой проблемы: использование бесклеточных систем или первичных культур клеток. Первая идея подразумевает внесение в матрикс, служащий основой формирующегося искусственного органа, определенной смеси факторов, которые привлекают и обеспечивают выживание и дифференцировку лимфоидных и стромальных клеток-предшественников как в случае развития нормального лимфоузла. Для создания градиента этих факторов можно использовать дополнительные биоматериалы, обеспечивающие постепенное высвобождение веществ, например альгинатные микросферы. В качестве кандидатных факторов можно применять

хемокины CCL19, CXCL13, цитокины BAFF, IL-7, VEGF, PDGF и др. Задавая индивидуальную динамику высвобождения каждого фактора, можно добиться привлечения и дифференцировки клеток-предшественников из кровотока, не заселяя предварительно матрикс какими-либо клетками. Недавно опубликовали модельную работу, в которой в матрикс заключали два цитокина – VEGF и PDGF [93]. Показано, что определенным образом подобранная динамика высвобождения каждого фактора позволяет эффективно стимулировать ангиогенез в месте имплантации матрикса, что необходимо для миграции в него клеток и питательных веществ. Для создания искусственных органов с использованием этого подхода, разумеется, потребуется комбинация большего числа факторов.

Если бесклеточной системы будет недостаточно для биоинженерии клинически полноценных искусственных лимфоидных органов, то потребуется разработать протокол с использованием клеток. В этом случае наиболее перспективным представляется подход с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (iPSC), на которые возлагаются большие надежды в области персонализированной медицины [94]. На сегодняшний день опубликовано несколько работ, в которых iPSC успешно применили для создания моделей человеческих органов, например тонкого кишечника [95, 96]. В контексте искусственных лимфоидных органов iPSC могут служить источником стромального компартмента, обеспечивающего функциональную активность органа. Эту возможность недавно рассмотрели в обзоре, посвященном биоинженерии искусственного тимуса [97]. В дальнейшем этот перспективный подход смогут использовать и для других лимфоидных органов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя на сегодняшний день уже разработано несколько моделей искусственных лимфоидных органов, критический анализ выявил несколько проблем, которые еще ждут своего решения. Использование трансформированных клеток имеет очевидные ограничения для клинического применения. Биоинженерия органов с использованием первичных культур клеток пока также имеет ограниченное применение. Это связано с тем, что для многих типов клеток, особенно стромальных, в должной мере не разработаны экспериментальные протоколы выделения, культивирования и поддержания в дифференцированном состоянии. Основной интерес для клинического применения представляет возможность получения всех или большинства клеточных типов либо из предшественников, либо путем

трансдифференцировки зрелых клеток, например, через этап получения iPSC. Некоторые типы клеток легко получить в первичной культуре, в том числе и клеток человека, что уже является основой некоторых видов терапии, например адоптивный перенос дендритных клеток или лимфоцитов. Возникает естественная идея объединить два подхода, поместив в каркас искусственного лимфоузла часть клеток в виде первичных культур, а недостаток других заменить добавлением факторов, ожидая, что подобной комбинации будет достаточно для запуска процесса формирования органа, тогда как все необходимые клетки появятся там уже позднее из привлеченных предшественников. Во всех этих направлениях сейчас ведутся активные работы.

Подводя итог, можно сказать, что создание искусственных лимфоидных органов является важной задачей современной иммунологии и биомедицины как с теоретической, так и с практической точек зрения. Успех в этой области обеспечен не только достижениями биоинженерии, но связан и с недавним прогрессом в понимании процессов формирования лимфоидных органов и их функционирования. Безусловно, эта тематика находится на стыке не-

скольких наук: биоинженерии, иммунологии, системной биологии и регенеративной медицины, а потому требует комплексного подхода к изучению, объединения различных подходов, чтобы учесть все или большинство факторов, ответственных за работу таких сложных систем, как лимфоидные органы. ●

Авторы благодарят А.А. Круглова за ценные обсуждения и полезные комментарии.

Электронно-микроскопические изображения матриц получены А.Ю. Архиповой при поддержке ЦКП Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Работа по изучению взаимодействий клеток иммунной системы и цитокинов как регуляторов этого процесса осуществлена при поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», работа по созданию и изучению многокомпонентных трехмерных клеточных систем осуществлена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-01799).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hussain A., Takahashi K., Sonobe J., Tabata Y., Bessho K. // J. Maxillofac. Oral Surg. 2014. V. 13. № 1. P. 29–35.
- Rose F.R.A.J., Oreffo R.O.C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 292. № 1. P. 1–7.
- Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. // Biomaterials. 2006. V. 27. № 18. P. 3413–3431.
- Lutolf M.P., Hubbell J.A. // Nat. Biotechnol. 2005. V. 23. № 1. P. 47–55.
- Nayak S., Dey S., Kundu S.C. // PLoS One. 2013. V. 8. № 9. P. 1–17.
- Sun B.K., Siprashvili Z., Khavari P.A. // Science. 2014. V. 346. № 6212. P. 941–945.
- Scarrit M.E., Pashos N.C., Bunnell B.A. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2015. V. 3. P. 43.
- Tan J.K.H., Watanabe T. // Adv. Immunol. 2010. V. 105. P. 131–157.
- Cupedo T., Stroock A.D., Coles M.C. // Front. Immunol. 2012. V. 3. P. 1–6.
- Giese C., Demmler C.D., Ammer R., Hartmann S., Lubitz A., Miller L., Müller R., Marx U. // Artif. Organs. 2006. V. 30. № 10. P. 803–808.
- Ali O.A., Huebsch N., Cao L., Dranoff G., Mooney D.J. // Nat. Mater. 2009. V. 8. № 2. P. 151–158.
- Martino M.M., Brkic S., Bovo E., Burger M., Schaefer D.J., Wolff T., Gürke L., Briquez P.S., Larsson H.M., Gianni-Barrera R., et al. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2015. V. 3. P. 45.
- Facchetti F., Blanzuoli L., Ungari M., Alebardi O., Vermi W. // Springer Semin. Immunopathol. 1998. V. 19. № 4. P. 459–478.
- Owen J.J., Jordan R.K., Raff M.C. // Eur. J. Immunol. 1975. V. 5. № 9. P. 653–655.
- Dieu-Nosjean M.-C., Goc J., Giraldo N.A., Sautès-Fridman C., Fridman W.H. // Trends Immunol. 2014. V. 35. № 11. P. 571–580.
- Rodewald H.-R. // Annu. Rev. Immunol. 2008. V. 26. P. 355–388.
- van de Pavert S.A., Mebius R.E. // Nat. Rev. Immunol. 2010. V. 10. № 9. P. 664–674.
- Clark B.R., Keating A. B. Annals of the New York Academy of Sciences. // 1995. V. 700. P. 70–78.
- Anthony B.A., Link D.C. // Trends Immunol. 2014. V. 35. № 1. P. 32–37.
- Tokoyoda K., Zehentmeier S., Chang H.D., Radbruch A. // Eur. J. Immunol. 2009. V. 39. № 8. P. 2095–2099.
- Klein L., Kyewski B., Allen P.M., Hogquist K.A. // Nat. Rev. Immunol. 2014. V. 14. № 6. P. 377–391.
- Koble C., Kyewski B. // J. Exp. Med. 2009. V. 206. № 7. P. 1505–1513.
- Anderson G., Jenkinson E.J. // Nat. Rev. Immunol. 2001. V. 1. № 1. P. 31–40.
- Manley N.R., Richie E.R., Blackburn C.C., Condie B.G., Sage J. // Front. Biosci. 2011. V. 17. P. 2461–2477.
- Bajénoff M., Egen J.G., Koo L.Y., Laugier J.P., Brau F., Glaichenhaus N., Germain R.N. // Immunity. 2006. V. 25. № 6. P. 989–1001.
- Malhotra D., Fletcher A.L., Turley S.J. // Immunol. Rev. 2013. V. 251. № 1. P. 160–176.
- Junt T., Scandella E., Ludewig B. // Nat. Rev. Immunol. 2008. V. 8. № 10. P. 764–775.
- Eberl G., Lochner M. // Mucosal Immunol. 2009. V. 2. № 6. P. 478–485.
- Newberry R.D. // Curr. Opin. Gastroenterol. 2008. V. 24. № 2. P. 121–128.
- Forchielli M.L., Walker A.W. // Br. J. Nutr. 2005. V. 93. Suppl 1. P. S41–S48.
- Mowat A.M. // Nat. Rev. Immunol. 2003. V. 3. № 4. P. 331–341.
- Randall T.D., Carragher D.M., Rangel-Moreno J. // Annu. Rev. Immunol. 2008. V. 26. P. 627–650.

33. Buettner M., Pabst R., Bode U. // *Trends Immunol.* 2010. V. 31. № 2. P. 80–86.
34. Alimzhanov M.B., Kuprash D.V., Kosco-Vilbois M.H., Luz A., Turetskaya R.L., Tarakhovsky A., Rajewsky K., Nedospasov S.A., Pfeffer K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 17. P. 9302–9307.
35. Cupedo T., Vondenhoff M.F.R., Heeregrave E.J., De Weerd A.E., Jansen W., Jackson D.G., Kraal G., Mebius R.E. // *J. Immunol.* 2004. V. 173. № 5. P. 2968–2975.
36. Rennert P.D., Browning J.L., Hochman P.S. // *Int. Immunol.* 1997. V. 9. № 11. P. 1627–1639.
37. Luther S.A., Ansel M.K., Cyster J.G. // *J. Exp. Med.* 2003. V. 197. № 9. P. 1191–1198.
38. Crivellato E., Vacca A., Ribatti D. // *Trends Immunol.* 2004. V. 25. № 4. P. 210–217.
39. Willard-Mack C.L. // *Toxicol. Pathol.* 2006. V. 34. № 5. P. 409–424.
40. von Adrian U.H., Mempel T.R. // *Nat. Rev. Immunol.* 2003. V. 3. № 11. P. 867–878.
41. Crotty S. // *Immunity.* 2014. V. 41. № 4. P. 529–542.
42. Chang J.E., Turley S.J. // *Trends Immunol.* 2014. V. 36. № 1. P. 30–39.
43. Allen C.D.C., Cyster J.G. // *Semin. Immunol.* 2008. V. 20. № 1. P. 14–25.
44. Cremasco V., Woodruff M.C., Onder L., Cupovic J., Nieves-Bonilla J.M., Schildberg F.A., Chang J.E., Cremasco F., Harvey C.J., Wucherpfennig K.W., et al. // *Nat. Immunol.* 2014. P. 1–11.
45. Aguzzi A., Kranich J., Krautler N.J. // *Trends Immunol.* 2014. V. 35. № 3. P. 105–113.
46. Banchereau J., Briere F., Christophe C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.-J., Pulendran B., Palucka K. // *Annu. Rev. Immunol.* 2000. № 18. P. 767–811.
47. Steinman R.M. // *Annu. Rev. Immunol.* 1991. V. 9. P. 271–296.
48. Sixt M., Kanazawa N., Selg M., Samson T., Roos G., Reinhardt D.P., Pabst R., Lutz M.B., Sorokin L. // *Immunity.* 2005. V. 22. № 1. P. 19–29.
49. Pappu R., Schwab S.R., Cornelissen I., Pereira J.P., Regard J.B., Xu Y., Camerer E., Zheng Y.-W., Huang Y., Cyster J.G., et al. // *Science.* 2007. V. 316. № 5822. P. 295–298.
50. Matloubian M., Lo C.G., Cinamon G., Lesneski M.J., Xu Y., Brinkmann V., Allende M.L., Proia R.L., Cyster J.G. // *Nature.* 2004. V. 427. № 6972. P. 355–360.
51. Bajénoff M., Egen J.G., Qi H., Huang A.Y.C., Castellino F., Germain R.N. // *Trends Immunol.* 2007. V. 28. № 8. P. 346–352.
52. Link A., Vogt T.K., Favre S., Britschgi M.R., Acha-Orbea H., Hinz B., Cyster J.G., Luther S.A. // *Nat. Immunol.* 2007. V. 8. № 11. P. 1255–1265.
53. Randolph G.J., Angeli V., Swartz M.A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. V. 5. № 8. P. 617–628.
54. Acton S.E., Astarita J.L., Malhotra D., Lukacs-Kornek V., Franz B., Hess P.R., Jakus Z., Kuligowski M., Fletcher A.L., Elpek K.G., et al. // *Immunity.* 2012. V. 37. № 2. P. 276–289.
55. Katakai T. // *Front. Immunol.* 2012. V. 3. P. 200–205.
56. Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., Shimizu A. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 9. P. 6189–6200.
57. Jarjour M., Jorquera A., Mondor I., Wienert S., Narang P., Coles M.C., Klauschen F., Bajénoff M. // *J. Exp. Med.* 2014. V. 211. № 6. P. 1109–1122.
58. Fletcher A.L., Acton S.E., Knoblich K. // *Nat. Rev. Immunol.* 2015. P. 1–12.
59. Mebius R.E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2003. V. 3. № 4. P. 292–303.
60. Astarita J.L., Acton S.E., Turley S.J. // *Front. Immunol.* 2012. V. 3. P. 1–11.
61. Nicenboim J., Malkinson G., Lupo T., Asaf L., Sela Y., Maysel O., Gibbs-Bar L., Senderovich N., Hashimshony T., Shin M., et al. // *Nature.* 2015. V. 522. P. 56–61.
62. Castagnaro L., Lenti E., Maruzzelli S., Spinardi L., Migliori E., Farinello D., Sitia G., Harrelson Z., Evans S.M., Guidotti L.G., et al. // *Immunity.* 2013. V. 38. № 4. P. 782–791.
63. van de Pavert S.A., Olivier B.J., Goverse G., Vondenhoff M.F.R., Greuter M., Beke P., Kusser K., Höpken U.E., Lipp M., Niederreither K., et al. // *Nat. Immunol.* 2009. V. 10. № 11. P. 1193–1099.
64. Bénézech C., White A., Mader E., Serre K., Parnell S., Pfeffer K., Ware C.F., Anderson G., Caamaño J.H. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. № 8. P. 4521–4530.
65. Lu T.T., Browning J.L. // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. P. 47.
66. Yoshida H., Naito A., Inoue J.-I., Satoh M., Santee-Cooper S.M., Ware C.F., Togawa A., Nishikawa S., Nishikawa S.-I. // *Immunity.* 2002. V. 17. № 6. P. 823–833.
67. Bienstock J., McDermott M.R. // *Immunol. Rev.* 2005. V. 206. P. 22–31.
68. Ware C.F. // *Annu. Rev. Immunol.* 2005. V. 23. P. 787–819.
69. Fütterer A., Mink K., Luz A., Kosco-Vilbois M.H., Pfeffer K. // *Immunity.* 1998. V. 9. № 1. P. 59–70.
70. Kuprash D. V., Alimzhanov M.B., Tumanov A. V., Anderson A.O., Pfeffer K., Nedospasov S.A. // *J. Immunol.* 1999. V. 163. № 12. P. 6575–6580.
71. Kuprash D. V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Shakhov A.N., Southon E., Murphy W.J., Tessarollo L., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. № 5. P. 1592–1600.
72. Blum K.S., Pabst R. // *J. Anat.* 2006. V. 209. № 5. P. 585–595.
73. Altman G.H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R.L., Chen J., Lu H., Richmond J., Kaplan D.L. // *Biomaterials.* 2003. V. 24. № 3. P. 401–416.
74. Agapov I.I., Moisenovich M.M., Vasiljeva T. V., Pustovalova O.L., Kon'kov A.S., Arkhipova A.Y., Sokolova O.S., Bogush V.G., Sevastianov V.I., Debabov V.G., et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2010. V. 433. № 5. P. 201–204.
75. Moisenovich M.M., Pustovalova O.L., 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.
76. Shapiro L., Cohen S. // *Biomaterials.* 1997. V. 18. № 8. P. 583–590.
77. Perez R.A., Kim M., Kim T.-H., Kim J.-H., Lee J.H., Park J.-H., Knowles J.C., Kim H.-W. // *Tissue Eng.* 2013. V. 20. P. 103–114.
78. Lu T., Li Y., Chen T. // *Int. J. Nanomedicine.* 2013. V. 8. P. 337–350.
79. Мойсенович М.М., Архипова А.Ю., Орлова А.А., Друцкая М.С., Волкова С.В., Захаров С.Е., Агапов И.И., Кирпичников М.П. // *Acta Naturae.* 2014. V. 1. № 20. P. 20–26.
80. Gombotz W.R., Pettit D.K. // *Bioconjug. Chem.* 1995. V. 6. № 4. P. 332–351.
81. Li Z., Cui Z. // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 32. № 2. P. 243–254.
82. Uriel S., Labay E., Francis-Sedlak M., Moya M.L., Weichselbaum R.R., Ervin N., Cankova Z., Brey E.M. // *Tissue Eng.* 2009. V. 15. № 3. P. 309–321.
83. Wang Y., Irvine D.J. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 21. P. 4903–4913.
84. Tessmar J.K., Göpferich A.M. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007. V. 59. P. 274–291.
85. Ali O.A., Emerich D., Dranoff G., Mooney D.J. // *Sci. Transl. Med.* 2009. V. 1. № 8. P. 1–22.
86. Zavala V.A., Kalergis A.M. // *Immunology.* 2015. V. 145. P. 182–201.
87. Tomei A.A., Siegert S., Britschgi M.R., Luther S.A., Swartz

- M.A. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. № 7. P. 4273–4283.
88. He C., Young A.J., West C.A., Su M., Konerding M.A., Mentzer S.J. // *J. Appl. Physiol.* 2002. V. 93. № 3. P. 966–973.
89. Okamoto N., Chihara R., Shimizu C., Nishimoto S., Watanabe T. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. № 4. P. 997–1007.
90. Suematsu S., Watanabe T. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 12. P. 1539–1545.
91. Nakashima M., Mori K., Maeda K., Kishi H., Hirata K., Kawabuchi M., Watanabe T. // *Eur. J. Immunol.* 1990. V. 20. № 1. P. 47–53.
92. Bredenkamp N., Ulyanchenko S., O’Neill K.E., Manley N.R., Vaidya H.J., Blackburn C.C. // *Nat. Cell Biol.* 2014. V. 16. № 9. P. 902–908.
93. Richardson T.P., Peters M.C., Ennett A.B., Mooney D.J. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 11. P. 1029–1034.
94. Sasai Y. // *Stem Cell.* 2013. V. 12. № 5. P. 520–530.
95. Forster R., Chiba K., Schaeffer L., Regalado S.G., Lai C.S., Gao Q., Kiani S., Farin H.F., Clevers H., Cost G.J., et al. // *Stem Cell Reports.* 2014. V. 2. № 6. P. 838–852.
96. Watson C.L., Mahe M.M., Múnera J., Howell J.C., Sundaram N., Poling H.M., Schweitzer J.I., Vallance J.E., Mayhew C.N., Sun Y., et al. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 11. P. 1310–1314.
97. Bredenkamp N., Jin X., Liu D., O’Neill K.E., Manley N.R., Blackburn C.C. // *Regen. Med.* 2015. V. 10. № 3. P. 317–329.

УДК 579.8.05

Микоплазмы и их устойчивость к антибиотикам: проблемы и перспективы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур

О. А. Чернова^{1,2*}, Е. С. Медведева^{1,2}, А. А. Музыкантов^{1,2}, Н. Б. Баранова^{1,2}, В. М. Чернов^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

*E-mail: chernov@mail.knc.ru

Поступила в редакцию 25.08.2015

Принята к печати 27.11.2015

РЕФЕРАТ Обзор посвящен проблеме контроля микоплазм (класс Mollicutes) – мельчайших из способных к самостоятельной репликации прокариот, паразитов высших организмов, основных контаминантов клеточных культур и вакцинных препаратов. Обсуждаются возможные механизмы быстрого развития устойчивости микоплазм к антимикробным препаратам. Появление омиксных технологий определило новые подходы к изучению молекулярно-генетических основ адаптации бактерий к стрессовым условиям и выявлению резистомов – совокупности всех генов и их продуктов, которые принимают участие в формировании резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам. С применением постгеномных методов получены данные, указывающие на то, что устойчивость бактерий к антимикробным препаратам может определяться более сложными процессами, чем предполагалось. Развитие резистентности микоплазм к антибактериальным препаратам ассоциировано с существенными изменениями секреции, а также геномного и протеомного профилей, которые затрагивают многие гены и белки, участвующие в различных клеточных процессах и бактериальной патогенности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериальный резистом, микоплазмы, механизмы резистентности к антибиотикам, омиксные технологии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МИК – минимальная ингибирующая концентрация; МЛСК – антибиотики групп макролидов, линкозамидов, стрептограмина и кетолидов; АВС – АТФ-связывающая кассета; СОГ – кластеры ортологичных групп белков; МАТЕ – семейство белков выведения антибиотиков и токсинов; MDR – множественная лекарственная устойчивость; MFS – протонзависимые множественные экспортеры семейства MFS; SMR – семейство низкомолекулярных белков, определяющих устойчивость к лекарствам; QRDR – регион, определяющий резистентность к хинолонам; RND – протонзависимые множественные экспортеры семейства RND; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

Большой интерес к микоплазмам (класс Mollicutes) обусловлен не только уникальностью организации этих мельчайших бактерий, лишенных клеточной стенки, но и практической необходимостью. Микоплазмы – паразиты высших эукариот, являются возбудителями социально значимых инфекций, основными контаминантами клеточных культур и вакцинных препаратов. Контроль микоплазменных инфекций представляет серьезную проблему [1–3].

На протяжении нескольких десятилетий разрабатывали различные методы подавления микоплазм, но эффективные средства пока не найдены [4, 5]. Основной способ подавления микоплазменных инфекций и контаминаций основан на использовании антибактериальных препаратов [2–4]. Существенную проблему представляет быстрое развитие устойчивости микоплазм к антимикробным препаратам, механизмы которого не вполне ясны. Предполагается, что решить проблему контроля микоплазменных

инфекций и контаминаций можно будет, изучив молекулярно-генетические механизмы адаптации микоплазм к стрессовым условиям, определяющие выживание бактерий в различных условиях [1–5]. Очевидно, что проведение таких исследований предполагает использование комплексного подхода с привлечением как классических методов, так и современных способов анализа биологического материала.

В нашем обзоре обобщены и проанализированы данные о механизмах, определяющих устойчивость микоплазм к антимикробным препаратам. Представления об этих механизмах в значительной мере сложились в период, предшествовавший пост-геномной эпохе. Между тем, успешная реализация геномных проектов и возникновение омиксных технологий привели к разработке новых подходов к изучению молекулярно-генетических основ адаптации бактерий к стрессовым условиям и выявлению резистомов – совокупности всех генов и их продуктов, принимающих участие в формировании устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам [6–13]. В результате использования комплексного подхода получены данные, указывающие на то, что устойчивость бактерий к антимикробным препаратам может обеспечиваться более сложными процессами, чем это предполагалось ранее.

Поскольку у представителей класса Mollicutes отсутствует клеточная стенка, основные классы антимикробных препаратов, такие, как бета-лактамы, гликопептиды и фосфомицин, на них не влияют. Присущие микоплазмам биологические особенности определяют также неэффективность ряда других веществ (сульфонамидов, триметоприма, рифампина, полимиксинов, налидиксовой кислоты, линезолида и некоторых других). Среди препаратов, проявляющих активность в отношении микоплазм, наиболее эффективны тетрациклины, фторхинолоны и макролиды. Именно они широко используются для подавления микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур [4]. Правда, в последнее время появились сообщения о новом классе бактериостатиков – ингибиторов деформилаз, активных в отношении урогенитальных микоплазмозов [5]. Однако для оценки перспективности этих антибиотиков потребуются длительные клинические испытания в разных регионах мира.

Применение антимикробных пептидов (мелиттина, выделенного из яда пчелы, глобомицина, грамицидина С, сурфактина и валиномицина, продуцируемого бактериями, аламетицина, обнаруженного у грибов, цекропинов А и Р1, а также магаинина 2, полученного из тканей животных) для подавления микоплазм [14–20] пока не получило широкого распространения. Оказалось, что микоплазмы успешно

развивают устойчивость и к этим препаратам [19, 21]. Поскольку данные о механизмах резистентности микоплазм к антимикробным пептидам пока отсутствуют, изучение адаптации представителей класса Mollicutes к антибактериальным препаратам сосредоточено главным образом на процессах формирования устойчивости к тетрациклинам, фторхинолонам и макролидам.

Представления о механизмах возникновения устойчивости микроорганизмов к препаратам этих групп основаны в значительной мере на результатах исследования классических бактерий. Отчасти это связано с особенностями биологии Mollicutes, определяющими сложность их выделения в искусственных средах и проведение клонального анализа аксеничных культур. Данные же биоинформационного анализа [22–24] не всегда согласуются с экспериментальными результатами. Так, согласно анализу *in silico* пяти эффлюксных систем, вносящих существенный вклад в адаптацию классических бактерий к антибиотикам – MATE (Multidrug and toxic compound extrusion family), MFS (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance family), RND (resistance-nodulation-cell division superfamily) и ABC (ATP-binding cassette superfamily) [25, 26], в геномах ряда Mollicutes присутствуют гены MATE, MFS и ABC. Однако экспериментально подтвердить вклад эффлюкса в устойчивость микоплазм к антимикробным препаратам смогли пока только в отношении систем ABC-транспортеров [24, 27, 28].

Так или иначе, способы развития устойчивости к тетрациклинам, фторхинолонам и макролидам, обнаруженные у классических бактерий, в значительной мере характерны и для Mollicutes. Однако у разных видов микоплазм формирование резистентности к антибактериальным препаратам имеет свои особенности, и даже при совпадении механизмов уровень чувствительности штаммов к препарату может существенно различаться (табл. 1). При этом механизмы, определяющие резистентность к антибактериальным препаратам, у некоторых видов микоплазм установить не удастся [5]. Это может указывать на существование у Mollicutes еще неописанных путей развития устойчивости и/или более сложных, чем считалось, механизмов адаптации микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Антибиотики тетрациклиновой группы наиболее широко используются для подавления микоплазменных инфекций урогенитального и респираторного трактов у взрослых [30, 31]. Вместе с тем, они часто применяются и при микоплазменных инфекциях у сельскохозяйственных животных [5]. Бактериостатическая активность тетрациклинов основана на способности этих антибиотиков обратимо

Таблица 1. Устойчивость к антибиотикам (тетрациклинам, фторхинолонам и макролидам) у микоплазм, ассоциированная с мутациями генов мишеней [по 5]

Микоплазма	Класс антибиотиков	Резистентность		Мутации – позиции	Диапазон МИК у устойчивых изолятов, мкг/мл
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>		
<i>M. pneumoniae</i>	МЛСК ^а	+	+	23S рРНК – 2611, 2058, 2059, 2062 ^б	64 → 256 (эритромицин)
	Тетрациклины	+	-	16S рРНК – 968, 1193 (только <i>in vitro</i>)	2 (тетрациклин)
	Фторхинолоны	+	-	QRDR ^в <i>gyrA</i> – 83 ^г ; <i>gyrB</i> – 426, 447, 466; <i>parC</i> – 78, 80, 84; <i>parE</i> – 439	2–16 (левофлоксацин) 8–128 (ципрофлоксацин)
<i>M. hominis</i>	МЛСК	+	+	23S рРНК – 2610, 2611, 2057, 2059, 2062	16–64 (клиндамицин)
	Тетрациклины	+	+	tet(M)-опосредованная защита рибосом; 16S рРНК – 346, 965, 966, 967, 1054 (только <i>in vitro</i>)	8 → 64 (тетрациклин) 2–8 (тетрациклин)
	Фторхинолоны	+	+	QRDR <i>gyrA</i> – 82, 83, 87, 93; <i>gyrB</i> – 450, 453; <i>parC</i> – 73, 80; <i>parE</i> – 420, 441, 460; Эффлокс препарата (только <i>in vitro</i> увеличивает МИК ципрофлоксацина и норфлоксацина)	2–32 (левофлоксацин) 4–8 (ципрофлоксацин)
<i>M. genitalium</i>	МЛСК	-	+	23S рРНК – 2058, 2059; рибосомный белок L4	16 → 64 (эритромицин)
	Тетрациклины	-	-	гены устойчивости не определены	Н.о. ^е
	Фторхинолоны	-	+	QRDR <i>gyrA</i> – 83, 87, 96; <i>gyrB</i> – 447, 466, <i>parC</i> – 78, 79, 80, 84, 94, 100; <i>parE</i> – 419, 461	Н.о.
<i>Ureaplasma</i> spp.	МЛСК	+	+	Рибосомные белки L4; 23S рРНК – 2056, 2057, 2058. Метилирование рРНК посредством ermB ^а . Эффлокс препарата, опосредованный продуктами <i>msrA</i> , <i>msrB</i> или <i>msrD</i>	64 → 128 (эритромицин)
	Тетрациклины	+	+	tet(M)-опосредованная защита рибосом	2 → 32
	Фторхинолоны	+	+	QRDR <i>gyrA</i> – 83, 95; <i>gyrB</i> – 119; <i>parC</i> – 80, 84, 123, 134; <i>parE</i> – 151, 249, 274	4–32 (левофлоксацин)
<i>M. hyorhinis</i>	МЛСК	+	+	23S рРНК – 2059 (<i>in vivo</i>); 23S рРНК – 2059 (<i>in vitro</i>); 23S рРНК – 2597, 2611; 23S рРНК – 2597, 2611	10–100 (тилозин) 25 → 100 (линкомицин) > 100 (тилозин) 50 (линкомицин) 100 (тилозин) 50 (линкомицин)
	Тетрациклины	-	+	Н.о.	12.5 (хлортетрациклин)
	Фторхинолоны	-	+	Н.о.	1–4 (энрофлоксацин)
<i>M. hyopneumoniae</i>	МЛСК	-	+	23S рРНК – 2058	> 64 (линкомицин)
	Тетрациклины	+	+	Н.о.	12.5 → 100 (хлортетрациклин)
	Фторхинолоны	+	+	QRDR <i>gyrA</i> – 83; <i>parC</i> (<i>in vivo</i>) – 80, 84, 116	0.25 → 1 (энрофлоксацин)
<i>M. bovis</i>	МЛСК	+	+	23S рРНК – 748, 2058 (<i>in vitro</i>); 23S рРНК – 748, 752, 2058, 2059 (<i>in vivo</i>); рибосомные белки L4 и L22	> 1024 (тилозин) > 256 (тилмикозин) 8–1024 (тилозин) 32 → 256 (тилмикозин)
	Тетрациклины	+	+	Н.о.	> 32 (окситетрациклин)
	Фторхинолоны	+	+	QRDR <i>gyrA</i> – 81, 83; <i>parC</i> – 78, 80, 81, 84	2.5–32 (энрофлоксацин)
<i>M. gallisepticum</i>	МЛСК	+	+	23S рРНК – 2058, 2059 (<i>in vivo</i>); 23S рРНК – 2058, 2503 (<i>in vitro</i>)	0.63–5 (тилозин) 1.25 → 10 (тилмикозин) 256–512 (тилмикозин) 256 → 512 (эритромицин)
	Тетрациклины	+	+	Н.о.	5 → 16 (окситетрациклин)
	Фторхинолоны	+	+	QRDR <i>gyrA</i> – 81, 83, 84, 87; <i>gyrB</i> – 426, 464, 465; <i>parC</i> – 64, 80, 81, 84; <i>parE</i> (<i>in vitro</i>) – 420, 463, 467	1–32 (энрофлоксацин) 1–10 (энрофлоксацин)

^аМЛСК: антибиотики групп макролидов, линкозамидов, стрептограмина и кетолидов. ^бСистема нумерации *E. coli* (нуклеотидная последовательность).

^вQRDR: регион, определяющий резистентность к хинолонам.

^гСистема нумерации *E. coli* (аминокислотная последовательность).

^аМакролидные гены *erm* и эффлокса обнаружены только в одной работе [29] и не выявлены в других.

^еН.о. – не определены.

связываться с 30S субъединицей бактериальной рибосомы, препятствовать взаимодействию аминоацил-тРНК с акцепторным участком и предотвращать таким образом синтез белка [32]. Основными механизмами развития резистентности к тетрациклинам у классических бактерий считают активное выведение антибиотика из клетки, продукцию белков, защищающих рибосомы (Tet(M), Tet(O), Tet(S), Tet(W), Tet(32), Tet(36), TetB(P), Otr(A), Tet, Tet(Q) и Tet(T)), подавление проникновения препарата в клетку, модификацию мишеней, а также деградацию антибиотика при помощи ферментов [33, 34]. Интенсивный рост устойчивости бактерий к тетрациклинам связывают с активным обменом генов ключевых факторов, вовлеченных в соответствующие процессы в бактериальных популяциях [35–38]. Основными посредниками горизонтального переноса генетического материала считают плазмиды и мобильные генетические элементы.

Развитие устойчивости к тетрациклинам у микоплазм в ряде случаев связано с приобретением детерминант tet(M), локализованных на транспозоне Tn916 [39]. Транспозон кодирует белок TetM, защищающий рибосомы от действия тетрациклинов. Этот белок гомологичен факторам элонгации eF-Tu, а также eF-G, он может вызывать конформационные изменения в 30S субъединице рибосомы, предотвращающие связывание с ней тетрациклина. Высокий уровень устойчивости к тетрациклину (МИК \geq 8 мкг/мл), ассоциированный с присутствием tet(M)-детерминант, вызывает перекрестную устойчивость микоплазм к другим антибиотикам тетрациклиновой группы [5, 40]. Кроме того, не исключено, что устойчивость микоплазм к этим препаратам может быть связана с мутациями в тетрациклинсвязывающем блоке 16S рРНК [41, 42]. Штаммы микоплазм, проявляющие повышенную устойчивость к тетрациклинам, получены также *in vitro* в результате пошаговой селекции на средах с последовательным повышением концентрации антибиотика [5, 42]. Однако механизмы развития антибиотикоустойчивости в этих случаях определить не удалось.

Макролидные антибиотики широко применяются при микоплазменных инфекциях у детей (главным образом инфекций дыхательных путей, вызванных *Mycoplasma pneumoniae*, и неонатальных инфекций, ассоциированных с *Ureaplasma* spp.), а также для подавления микоплазмозов у животных [5, 43–47]. Эти антибиотики часто применяют, когда нельзя использовать тетрациклины и фторхинолоны.

Антибактериальная активность макролидов основана на способности этих антибиотиков обратимо связываться с 50S субъединицей рибосомы (включая 23S рРНК и некоторые рибосомные белки – L4, L22),

индуцировать отделение пептидил-тРНК от рибосомы и блокировать таким образом синтез пептидной цепи [48]. Известны три способа развития устойчивости классических бактерий к макролидам: модификация мишени (в частности, изменения структуры рибосомной 50S субъединицы), изменение выведения препарата и ферментативная инактивация антибиотика [48, 49].

Развитие устойчивости к макролидам у микоплазм связывают с подавлением проникновения антибиотика в клетку, а также со структурными изменениями 50S субъединицы рибосом [5]. В ряде случаев резистентность к макролидам у микоплазм связана с изменениями в центральной петле домена V в 23S рРНК [5, 50]. При этом мутации в соответствующей зоне гена приводят к повышению устойчивости некоторых видов микоплазм к нескольким антибиотикам этой группы и снижению или потере устойчивости к другим.

Фторхинолоны – самая популярная группа препаратов, используемых для подавления микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур [4, 5, 28]. Это обусловлено тем, что микоплазменные инфекции часто развиваются при иммунодефицитных состояниях и, как правило, являются сочетанными. В таких случаях рекомендуют применять бактерицидные препараты, среди которых широко используется ципрофлоксацин – препарат фторхинолоновой группы [51–53].

Молекулярные механизмы бактерицидного действия фторхинолонов основаны на связывании ДНК-гиразы и/или ДНК-топоизомеразы IV, что приводит к подавлению репликации бактериальной ДНК [49, 54]. Основные механизмы резистентности классических бактерий к фторхинолонам связывают с модификациями мишени в результате мутаций в области QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region) генов-мишеней – *gyrA* (субъединица А ДНК-гиразы), *gyrB* (субъединица В ДНК-гиразы), *parC* (субъединица А топоизомеразы IV), *parE* (субъединица В топоизомеразы IV), а также со снижением накопления препаратов в клетке (в результате активного оттока или подавления проникновения) и приобретением детерминант устойчивости путем горизонтального переноса генов [55].

Развитие устойчивости микоплазм к фторхинолонам обычно ассоциировано с мутациями в области QRDR генов-мишеней (ДНК-гиразы и топоизомеразы IV). В зависимости от антибиотика значимые мутации могут находиться в генах определенного фермента [5]. Например, развитие устойчивости *Mycoplasma hominis* к перфлоксацину, офлоксацину, ципрофлоксацину и тровафлоксацину *in vitro* связано с мутациями в гене топоизомеразы IV, а к спарфлокса-

цину – в гене ДНК-гиразы [5, 41, 56]. Устойчивые к фторхинолонам клинические изоляты микоплазм обычно проявляют перекрестную устойчивость ко всем препаратам этой группы. При этом уровень устойчивости часто коррелирует с количеством мутаций и их локализацией [5, 57]. Вместе с тем, в серии длительных наблюдений адаптации микоплазм к фторхинолонам было показано, что вытеснение из культуры клеток, не мутантных по QRDR-локусу, происходит только при культивировании бактерий на средах с высокими концентрациями цiproфлоксацина [58]. При низких концентрациях цiproфлоксацина ключевую роль, по-видимому, играют другие механизмы, например, выведение из клетки. Этот способ адаптации к фторхинолонам, описанный у ряда бактерий, осуществляется с помощью эндогенных насосов типа ABC, ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью (MDR). Увеличение экспрессии соответствующих генов может определять MDR-фенотип. В геномах некоторых микоплазм обнаружены гены ABC-типа, аннотированные как «предположительно гены MDR» [22–24]. Согласно данным количественной конкурентной ОТ-ПЦР, в исходных штаммах эти гены экспрессируются конститутивно, а в штаммах с MDR-фенотипом уровень их экспрессии повышен [18]. Однако объяснить этим быструю адаптацию разных микоплазм к фторхинолонам все-таки не удастся.

Попытки выяснить причины роста устойчивости микроорганизмов к фторхинолонам, регистрируемого в последнее время во всех регионах мира [56, 59, 60], привели к предположению, что, помимо перечисленных механизмов, существуют и другие способы, определяющие возможность быстрой адаптации бактерий к антибактериальным препаратам в микробных сообществах [55]. Это предположение основано как на результатах экспериментальных исследований, так и на данных мониторинга в разных странах – очень быстрое повышение устойчивости к фторхинолонам наблюдается у сельскохозяйственных животных, хотя в ветеринарную практику эти препараты были введены лишь два десятилетия назад [5, 61–63].

Поскольку представителей класса Mollicutes считают тахителичными организмами, предполагается, что их быстрая адаптация к антимикробным препаратам обусловлена частыми мутационными событиями, существенными из которых являются изменения в генах целевых белков [19, 64, 65]. Однако согласно результатам анализа полных нуклеотидных последовательностей генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* штаммов *Ureaplasma parvum* и *U. urealyticum* значительная часть нуклеотидных замен в этих генах микоплазм представляет собой видовой полиморфизм и никак

не влияет на чувствительность к антибиотику [66]. Это заключение ставит под сомнение правильность представлений о мутационных механизмах резистентности микоплазм (и других бактерий) к антибиотикам, и диктует необходимость проверки этих данных с использованием новых подходов. Между тем, за последнее время опубликованы данные об активной роли внеклеточных везикул в адаптации бактерий к стрессовым условиям, в том числе антибиотикам [3, 67–72]. Продуцируемые клетками везикулы содержат различные соединения и участвуют в межклеточных взаимодействиях про- и эукариот [69, 73–75]. Еще в 1996 году установили, что везикулы грамотрицательных бактерий участвуют в транспорте антибиотиков и контроле антибиотикоустойчивости в бактериальной популяции [76]. Однако участие везикул в ответе бактерий на антимикробные препараты начали активно изучать только недавно в связи с «универсальностью» везикулярного транспорта, обнаруженного у всех организмов, включая мельчайших прокариот, и появлением методов высокого разрешения для их анализа [3, 6–9, 69–71, 73, 74, 76–80].

Активное участие внеклеточных везикул в развитии устойчивости бактерий к фторхинолонам впервые показали на примере *Acholeplasma laidlawii* – микоплазмы, инфицирующей человека, животных, растения, основного контаминанта клеточных культур [71, 81]. В результате пошаговой селекции получены штаммы *A. laidlawii*, различающиеся чувствительностью к цiproфлоксацину. Оказалось, что везикулы, продуцируемые клетками микоплазмы, растущей на среде с цiproфлоксацином, опосредуют выведение этого препарата из клетки, оказывают бактериостатическое действие в отношении чувствительного к антибиотику штамма *Staphylococcus aureus* и переносят мутантные гены белков – мишеней фторхинолонов. Дифференциальная экспрессия генов ABC-транспортеров, участвующих у ряда бактерий в активном выведении антибиотиков и формировании множественной лекарственной устойчивости, регистрируемая в ответ на действие цiproфлоксацина, указывает на то, что быстрое выведение цiproфлоксацина из клеток микоплазмы (в том числе посредством везикул) может быть связано и с модуляцией системы ABC-транспортеров.

Обнаружение в составе везикул генетического материала также позволяет предполагать их участие в горизонтальном переносе генов [8, 81–83]. Транспорт генов-мишеней фторхинолонов, опосредуемый везикулами *A. laidlawii*, может способствовать быстрому распространению мутантных генов в бактериальной популяции [71, 81]. Возможность таких событий показана на примере *Acinetobacter*

baumannii – внеклеточные везикулы этой бактерии обеспечивают перенос гена *OXA-24*, определяющего устойчивость к карбапенемам [84]. При этом перенос факторов устойчивости к антибиотикам, опосредованный везикулами определенной бактерии, может способствовать выживанию различных бактерий в микробном сообществе. Пример такой взаимопомощи показан на модели *S. aureus*, когда опосредованное везикулами распространение β-лактамазы этой бактерии в популяциях микроорганизмов обеспечило выживание на среде с ампициллином грамотрицательных и грамположительных бактерий, чувствительных к этому антибиотику [78]. К настоящему времени получены убедительные доказательства участия внеклеточных везикул в адаптации бактерий к разнообразным стрессовым условиям, в том числе к антимикробным препаратам. Однако очевидно, что выяснение места везикулярной компоненты в развитии устойчивости бактерий к антибиотикам

требует комплексных систематических исследований с использованием методов высокого разрешения.

Развитие постгеномных технологий открыло принципиально новые возможности определения резистомов – совокупности генов и их продуктов, которые принимают участие в формировании резистентности к антимикробным препаратам. Уже получены сведения о резистомах некоторых бактерий в отношении ряда препаратов [85–104]. Недавно такие сведения получены и для представителя класса Mollicutes – *A. laidlawii* [105]. Они основаны на анализе полных геномов *A. laidlawii*, а также клеточных и везикулярных протеомов штаммов, различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину – лабораторного штамма PG8 (МИК 0.5 мкг/мл) и полученного от него методом пошаговой селекции устойчивого к ципрофлоксацину штамма PG8R₁₀ (МИК 20 мкг/мл).

В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей *A. laidlawii* PG8 и *A.*

Таблица 2. Белки, идентифицированные во внеклеточных везикулах *A. laidlawii* PG8R₁₀

№	Белок (ген)	NCBI ¹	COG ²	score ³	n ⁴	% ⁵
1	P-белок глицинрасцепляющего комплекса, субъединица 1 (ACL_1410)	162447261	E	18	2	12.1
2	Енолаза (<i>eno</i>)	162447267	G	662	6	22.7
3	Фосфоглицераткиназа (<i>pgk</i>)	162448052	G	26	2	25.3
4	S-аденозилметионин-синтаза (<i>metK1</i>)	162447194	H	23	2	15
5	50S рибосомный белок L17 (<i>rplQ</i>)	162446985	J	300	2	20.2
6	Метионил-тРНК-синтаза (<i>metG</i>)	162447002	J	19	2	13.4
7	Фактор элонгации EF-Tu (<i>tuf</i>)	162447058	J	113	3	23.3
8	Метионил-тРНК-формилтрансфераза (<i>fmt</i>)	162447191	J	17	2	23
9	РНК-метилтрансфераза (ACL_0513)	162447375	J	21	2	8.9
10	Фактор рециклизации рибосом (<i>frr</i>)	162447997	J	75	2	40.8
11	ДНК-зависимая РНК-полимераза, β-субъединица (<i>rpoB</i>)	162447041	K	17	2	24.7
12	UDP-глюкозо-пирофосфорилаза (<i>galU</i>)	162447697	M	17	2	32.9
13	Транспортная система ABC-типа, субстратсвязывающий белок (ACL_0720)	162447580	P	31	2	6.5
14	Ацилпереносящий белок (<i>acpP</i>)	162447111	Q	131	2	42.1
15	Пептидаза U35 (ACL_0611)	162447472	R	47	2	35.4
16	Белок компетентности comEC-подобный (ACL_0895)	162447752	R	295	2	21.2
17	Гипотетический белок (ACL_0450)	162447314	-	22	2	10.5

¹Идентификационный номер белка в базе NCBI.

²Классификация белков по функциональным категориям указана согласно COG (E – транспорт и метаболизм аминокислот, G – транспорт и метаболизм углеводов, H – метаболизм коэнзимов, J – трансляция, K – транскрипция, M – биогенез мембран, P – транспорт и метаболизм неорганических ионов, Q – биосинтез, транспорт и катаболизм вторичных метаболитов, R – предсказана только общая функция, «-» – нет в COG).

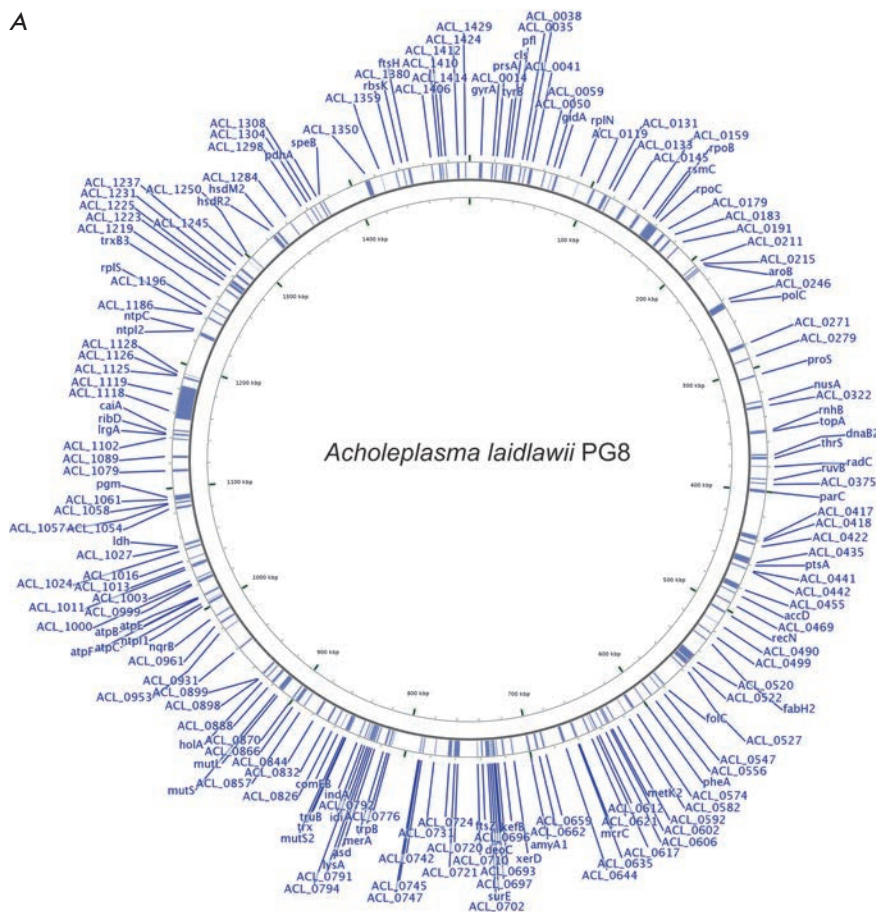
■ – факторы вирулентности бактерий.

³Достоверность поиска белков в базе данных NCBI с использованием программы Mascot.

⁴Количество разных по аминокислотной последовательности пептидов, по которым идентифицировали белок.

⁵Процент перекрытия аминокислотной последовательности.

А



Б

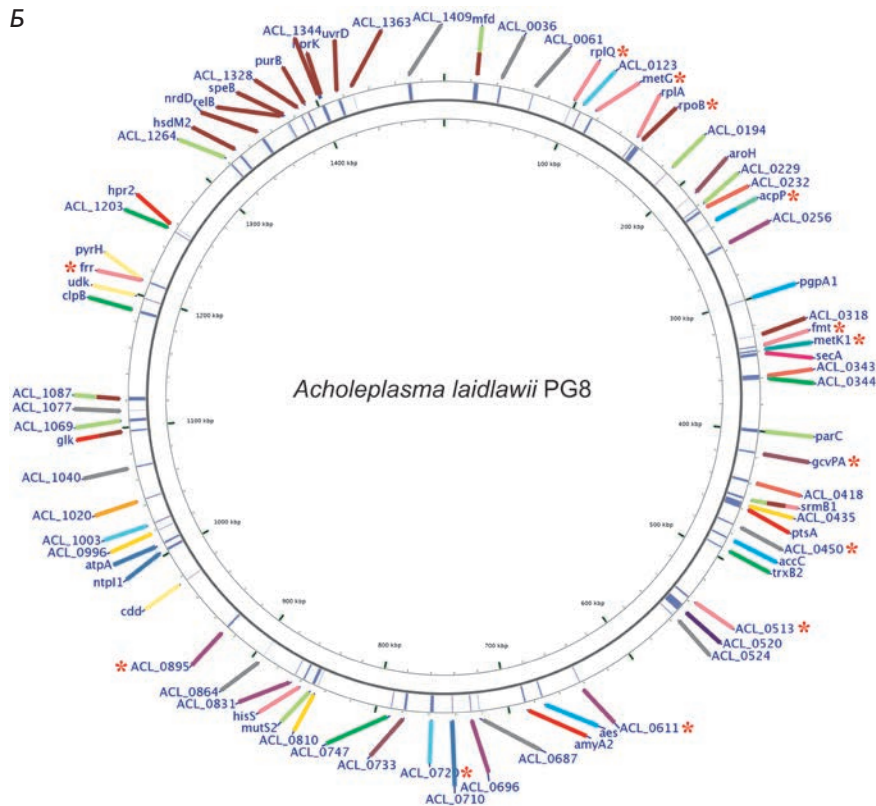


Рис. 1. Локализация на геномной карте *Acholeplasma laidlawii* генов, нуклеотидная последовательность которых отличается у штаммов PG8 и PG8₁₀ (А), и генов белков, относительное содержание которых у этих штаммов значительно различается (Б). * Гены белков в везикулах штамма *A. laidlawii* PG8₁₀, не обнаруженные в везикулах *A. laidlawii* PG8. Классификация белков по функциональным категориям представлена согласно COG: ■ – [С] энергообразование, ■ – [Е] транспорт и метаболизм аминокислот, ■ – [F] транспорт и метаболизм нуклеотидов, ■ – [G] транспорт и метаболизм углеводов, ■ – [H] метаболизм коэнзимов, ■ – [I] транспорт и метаболизм липидов, ■ – [J] трансляция, ■ – [K] транскрипция, ■ – [L] репликация, рекомбинация и репарация, ■ – [M] биогенез мембран, ■ – [N] подвижность клеток, ■ – [O] посттрансляционные модификации, ■ – [P] транспорт и метаболизм неорганических ионов, ■ – [Q] биосинтез, транспорт и катаболизм вторичных метаболитов, ■ – [R] предсказана только общая функция, ■ – [S] функция не определена, ■ – [T] механизмы сигнальной трансдукции, ■ – [U] внутриклеточный трафик, секреция и везикулярный транспорт, ■ – [V] защитные механизмы, ■ – [-] нет в COG. Графическое изображение хромосомы получено с помощью GCView Server (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/index.html)

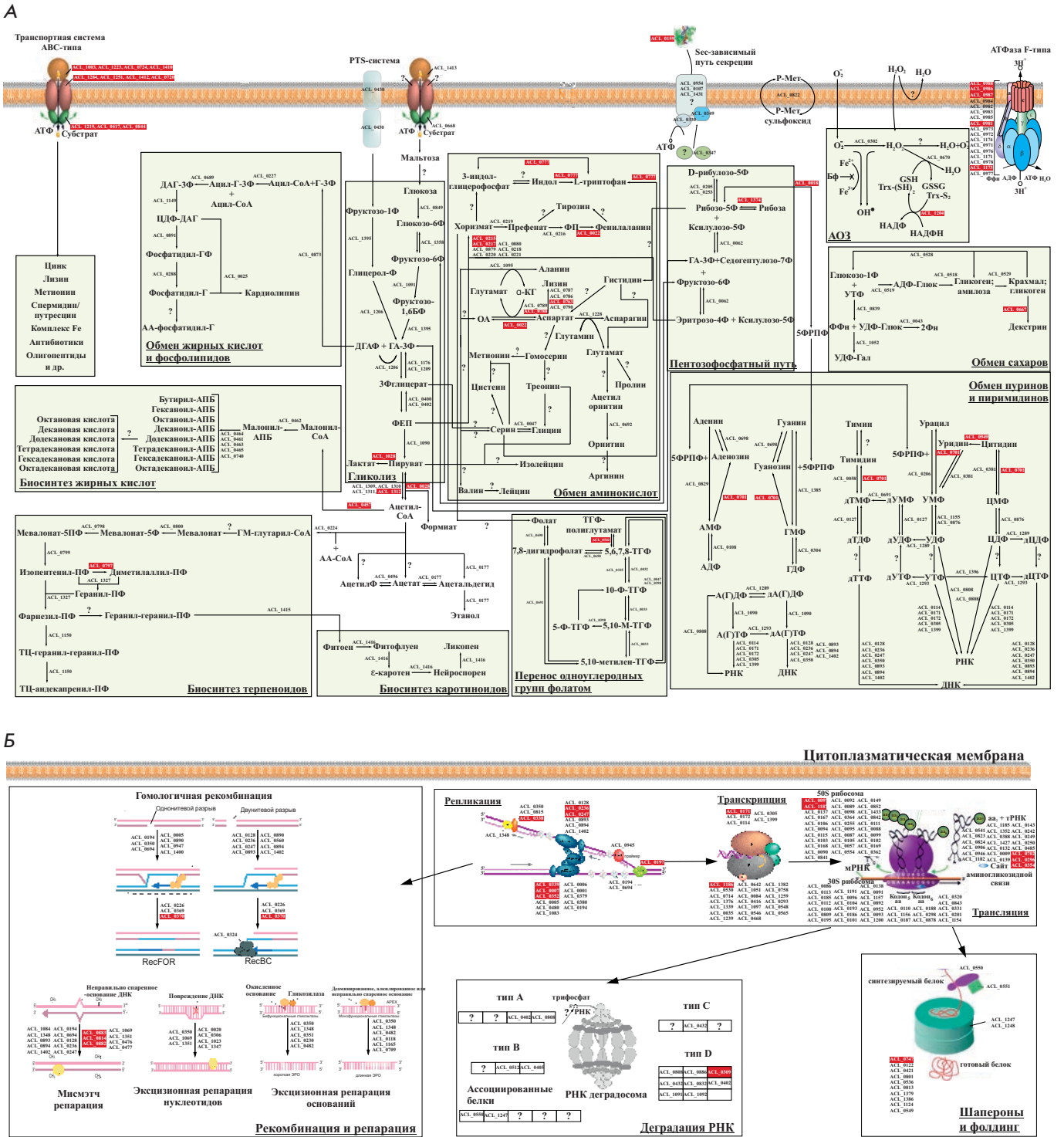


Рис. 2. Схемы метаболических путей (А) и клеточных процессов (Б) у *Acholeplasma laidlawii* PG8 (согласно [108], NCBI (accession number NC_010163) и KEGG). ■ – продукты генов, в которых выявлены значимые SNP и инсерции/делеции у штамма *A. laidlawii* PG8R₁₀; PTS – фосфоенолпируват-углевод-трансферазная система; Фруктозо-1Ф – фруктозо-1-фосфат; Глюкозо-6Ф – глюкозо-6-фосфат; Фруктозо-6Ф – фруктозо-6-фосфат; Фруктозо-1,6БФ – фруктозо-1,6-бисфосфат; ДГАФ – дигидроксиацетонфосфат; ГА-3Ф – глициральдегид-3-фосфат; 3Фглицерат – 3-фосфоглицерат; ФЕП – фосфоенолпируват; D-рибулозо-5Ф – D-рибулозо-5-фосфат; Рибозо-5Ф – рибозо-5-фосфат; Ксилулозо-5Ф – ксилулозо-5-фосфат; Седогептулозо-7Ф – седогептулозо-7-фосфат; Эритрозо-4Ф – эритрозо-4-фосфат; Глюкозо-1Ф – глюкозо-1-фосфат; АДФ-Глюк – адено-

зиндифосфат-глюкоза; УДФ-Глюк – уридиндифосфат-глюкоза; УДФ-Гал – уридиндифосфатгалактоза; Ацетил-СоА – ацетил-коэнзим А; АцетилФ – ацетилфосфат; Малонил-СоА – малонил-коэнзим А; Малонил-АПБ – малонил-ацилпереносящий белок; Бутирил-АПБ – бутирил-ацилпереносящий белок; Гексаноил-АПБ – гексаноил-ацилпереносящий белок; Октаноил-АПБ – октаноил-ацилпереносящий белок; Деканоил-АПБ – деканоил-ацилпереносящий белок; Додеcanoил-АПБ – додеcanoил-ацилпереносящий белок; Тетрадеcanoил-АПБ – тетрадеcanoил-ацилпереносящий белок; Гексадеcanoил-АПБ – гексадеcanoил-ацилпереносящий белок; Октадеcanoил-АПБ – октадеcanoил-ацилпереносящий белок; Г-3Ф – глицеро-3-фосфат; Ацил-СоА – ацил-коэнзим А; Ацил-Г-3Ф – ацилглицерол-3-фосфат; ДАГ-3Ф – диацилглицерол-3-фосфат; ЦДФ-ДАГ – цитидиндифосфат-диацилглицерол; Фосфатидил-ГФ – фосфатидилглицеролфосфат; Фосфатидил-Г – фосфатидилглицерол; АА-СоА – ацетоацетил-коэнзим А; ГМ-глутарил-СоА – 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А; Мевалонат-5Ф – мевалонат-5-фосфат; Мевалонат-5ПФ – мевалонат-5-пирофосфат; Изопентенил-ПФ – изопентенил-пирофосфат; Геранил-ПФ – геранил-пирофосфат; Фарнезил-ПФ – фарнезил-пирофосфат; ТЦ-геранил-геранил-ПФ – дитранс, полицис-геранил-геранил-пирофосфат; ТЦ-андекапренил-ПФ – дитранс, полицис-андекапренил-пирофосфат; Геранил-геранил-ПФ – геранил-геранил-пирофосфат; 5,6,7,8-ТГФ – 5,6,7,8-тетрагидрофолат; 5,10-М-ТГФ – 5,10-метенил-тетрагидрофолат; 10-Ф-ТГФ – 10-формил-тетрагидрофолат; ФП – фенилпируват; α -КГ – α -кетоглутаровая кислота; ОА – оксалоацетат; 5ФРПФ – 5-фосфорибозилпирофосфат; АМФ – аденозинмонофосфат; АДФ – аденозиндифосфат; АТФ – аденозинтрифосфат; дАДФ – дезоксиаденозиндифосфат; дАТФ – дезоксиаденозинтрифосфат; ГМФ – гуанозинмонофосфат; ГДФ – гуанозиндифосфат; ГТФ – гуанозинтрифосфат; дГДФ – дезоксигуанозиндифосфат; дГТФ – дезоксигуанозинтрифосфат; дТМФ – дезокситимидинмонофосфат; дТДФ – дезокситимидиндифосфат; дТТФ – дезокситимидинтрифосфат; дУМФ – дезоксиуридинмонофосфат; дУДФ – дезоксиуридиндифосфат; дУТФ – дезоксиуридинтрифосфат; УМФ – уридинмонофосфат; УДФ – уридиндифосфат; УТФ – уридинтрифосфат; ЦМФ – цитидинмонофосфат; ЦДФ – цитидиндифосфат; ЦТФ – цитидинтрифосфат; дЦМФ – дезоксицитидинмонофосфат; дЦДФ – дезоксицитидиндифосфат; дЦТФ – дезоксицитидинтрифосфат; РНК – рибонуклеиновая кислота; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота; тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота; А – аденин; Г – гуанин; С – цитозин; У – урацил; O_2^- – супероксид; H_2O_2 – перекись водорода; H_2O – вода; GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион; Trx- S_2 – окисленный тиоредоксин; Trx-(SH) $_2$ – восстановленный тиоредоксин; НАДФН – никотинамидаденин-динуклеотидфосфат восстановленный; НАДФ – никотинамидаденин-динуклеотидфосфат; ФФн – пирофосфат неорганический; Фн – фосфат неорганический; H^+ – протон; P-Met – метионин; Fe – железо

laidlawii PG8R₁₀ в геноме устойчивого к ципрофлоксацину штамма обнаружены множественные мутации (инсерции, делеции, однонуклеотидные замены (SNP)), локализованные как в генах мишеней фторхинолонов (ДНК-гираза и ДНК-топоизомераза), так и во многих других генах, продукты которых участвуют в различных клеточных процессах и бактериальной патогенности. Всего в геноме *A. laidlawii* PG8R₁₀ обнаружено 225 мутаций в 188 генах (рис. 1). Некоторые из этих мутаций были идентифицированы ранее у других микроорганизмов в связи с развитием устойчивости к тем или иным антибиотикам (например, у *S. aureus* к даптомицину, у *A. baumannii* при множественной лекарственной устойчивости – к ципрофлоксацину, имипенему, амикацину, миноциклину, левофлоксацину, пиперациллину, тазобактаму, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму, цефоперазону, сульфбактаму и меропенему [95, 102]).

В результате протеомного анализа клеток *A. laidlawii* PG8 и PG8R₁₀ идентифицированы белки, относительное содержание которых в этих штаммах существенно различалось. Всего выявлено 64 таких белка, из них только четыре оказались продуктами мутантных генов (ACL_0380, ACL_0418, ACL_0435,

ACL_0436). Многие из этих белков участвуют в фундаментальных клеточных процессах (энергообразование, трансляция, транскрипция, репликация, биогенез мембран, фолдинг белков, транспорт и метаболизм аминокислот, нуклеотидов, углеводов, липидов, неорганических ионов, трансдукции сигналов, защитные механизмы) и бактериальной патогенности; некоторые вовлечены в развитие резистентности к антибиотикам у других бактерий (например, у *A. baumannii* к карбапенему, *S. aureus* – к оксациллину [106, 107]).

У штаммов, различающихся чувствительностью к ципрофлоксацину, обнаружены существенные отличия в протеомном профиле внеклеточных везикул (табл. 2). Так, в везикулах *A. laidlawii* PG8 идентифицированы 97 белков, а в везикулах *A. laidlawii* PG8R₁₀ – 17, из которых 13 отсутствуют в везикулах исходного штамма [105]. При этом в везикулах *A. laidlawii* PG8 найден белок семейства металло- β -лактамаз, обеспечивающий гидролиз антибиотиков β -лактаминового ряда. Поскольку действие антибиотиков β -лактаминового ряда направлено на клеточную стенку бактерий, которая отсутствует у представителей класса Mollicutes, назначение этого фермен-

та у *A. laidlawii* PG8 остается загадкой. Не исключено, что таким образом *A. laidlawii* PG8, подобно *S. aureus* [78], может оказывать помощь в адаптации к антибиотикам β-лактамного ряда другим бактериям, обладающим клеточной стенкой, и необходимым для выживания этой микоплазмы в микробиоценозе [6].

Вклад каждого реагирующего на стресс белка и гена микоплазмы в развитие резистентности к ципрофлоксацину еще предстоит выяснить. Вместе с тем, очевидно, что множественные изменения в геномных профилях, а также в клеточных и везикулярных протеомах у устойчивого к ципрофлоксацину штамма *A. laidlawii* могут определять существенную перестройку биохимических процессов в клетке микоплазмы (рис. 2). Такие данные получены для *Pseudomonas aeruginosa* в связи с развитием устойчивости к тем или иным антибиотикам, в том числе ципрофлоксацину [87, 96, 109]. Формирование устойчивости у разных видов бактерий к антимикробным препаратам оказалось ассоциированным с изменениями не только мишеней этих препаратов, но также многих генов и белков, вовлеченных в процессы энергообеспечения, транспорта и защитные механизмы, а также в реализацию вирулентности. Эти результаты требуют особого внимания исследователей, занимающихся разработкой средств контроля патогенных бактерий, поиском новых мишеней антимикробных препаратов, кандидатами на роль которых являются как раз факторы вирулентности.

Изучение адаптации микроорганизмов к антимикробным препаратам с использованием омических технологий только начинается. Однако полученные результаты позволяют заключить, что формирование устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам, по-видимому, обеспечивается более

сложными механизмами, чем предполагалось ранее. Развитие резистентности оказалось связанным со значительными изменениями в их геномном, транскриптомном, протеомном и секретомном профилях микроорганизмов, которые могут определять существенную перестройку клеточных процессов и патогенности. Элементы резистомов, общие для разных бактерий, могут указывать на существование универсальных модулей регуляции клеточного репрограммирования, обеспечивающего выживание в условиях стресса. Идентификация и выяснение закономерности их работы представляют значительный интерес для понимания «логики жизни» микоплазм, быстрой адаптации бактерий к стрессу в микробиоценозах и поиска путей решения проблемы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур. Для получения соответствующей информации потребуются крупномасштабные исследования микроорганизмов как в аксеничных культурах, так и в ассоциатах в разных условиях среды, основанные на высокотехнологических методических платформах с применением метаомических подходов. ●

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета Министерства образования и науки РФ. Данное исследование выполнено с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003), а также РФФИ (гранты № 14-04-00883а, 15-44-02594).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nikfarjam L., Farzaneh P. // Cell J. (Yakhteh). 2012. V. 13. P. 203–212.
- Rottem S., Kornspan J.D., Kosower N.S. Biomedical Tissue Culture. InTech, 2012. P. 248. <http://www.intechopen.com/books/biomedical-tissue-culture>
- Чернов В.М., Чернова О.А., Санчес-Бера Х.Т., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. // Acta Naturae. 2014. Т. 6. № 3. С. 43–54.
- Uphoff C.C., Drexler H.G. // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2014. V. 106. P. 28.5.1–28.5.12.
- Waites K.B., Lysnyansky I., Bebear C.M. Emerging antimicrobial resistance in mycoplasmas of humans and animals. In: Mollicutes: molecular biology and pathogenesis. UK: Caister Acad. Press, 2014. P. 350.
- Музыкантова А.А., Баранова Н.Б., Медведева Е.С., Григорьева Т.Ю., Чернова О.А., Чернов В.М. // ДАН. 2014. Т. 455. № 1. С. 99–104.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Medvedeva E.S., Mouzykantov A.A., Ponomareva A.A., Shaymardanova G.F., Gorshkov O.V., Trushin M.V. // J. Proteomics. 2011. V. 4. P. 2920–2936.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Efimova I.R., Shaymardanova G.F., Medvedeva E.S., Trushin M.V. // ScientificWorldJournal. 2011. V. 11. P. 1120–1130.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Gorshkov O.V., Trushin M.V., Nesterova T.N., Ponomareva A.A. // ScientificWorldJournal. 2012. Article ID 315474. P. 6.
- Vanyushkina A.A., Fisunov G.Y., Gorbachev A.Y., Kamashev D.E., Govorun V.M. // PLoS One. 2014. V. 9(3). e89312.
- Mazin P.V., Fisunov G.Y., Gorbachev A.Y., Kapitskaya K.Y., Altukhov I.A., Semashko T.A., Alexeev D.G., Govorun V.M. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42(21). P. 13254–13268.
- Citti C., Blanchard A. // Trends Microbiol. 2013. V. 21. P. 196–203.
- Güell O., Sagués F., Serrano M.Á. // Sci. Rep. 2012. V. 2. P. 621.

14. Лазарев В.Н. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 121–123.
15. Béven L., Wróblewski H. // *Res. Microbiol.* 1997. V. 148. № 2. P. 163–175.
16. Borth W.B., Jones V.P., Ullman D.E., Hu J.S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. № 6. P. 1894–1895.
17. Béven L., Castano S., Dufourcq J., Wieslander A., Wróblewski H. // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. № 10. P. 2207–2217.
18. Lazarev V.N., Stipkovits L., Biro J., Miklodi D., Shkarupeta M.M., Titova G.A., Akopian T.A., Govorun V.M. // *Microbes Infect.* 2004. V. 6. № 6. P. 536–541.
19. Fehri L.F., Sirand-Pugnet P., Gourgues G., Jan G., Wróblewski H., Blanchard A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. № 10. P. 4154–4165.
20. Park H.J., Kang K.M., Dybvig K., Lee B.L., Jung Y.W., Lee I.H. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. № 20. P. 3321–3326.
21. Shelton C.L., Raffel F.K., Beatty W.L., Johnson S.M., Mason K.M. // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7. e1002360.
22. van Veen H.W., Konings W.N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1365. P. 31–36.
23. Paulsen I.T., Nguyen L., Sliwinski M.K., Rabus R., Saier M.H. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 301. P. 75–100.
24. Raheison S., Gonzalez P., Renaudin H., Charron A., Bébéar C., Bébéar C.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. P. 421–424.
25. Piddock L.J. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2006. V. 19. P. 382–402.
26. Martínez J.L., Sánchez M.B., Martínez-Solano L., Hernandez A., Garmendia L., Fajardo A., Alvarez-Ortega C. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. P. 430–449.
27. Pereyre S., Gonzalez P., De Barbeyrac B., Darnige A., Renaudin H., Charron A., Raheison S., Bébéar C., Bébéar C.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. P. 3142–3150.
28. Antunes N.T., Assunção P., Poveda J.B., Tavio M.M. // *Vet. J.* 2015. V. 204. P. 327–332.
29. Lu C., Ye T., Zhu G., Feng P., Ma H., Lu R., Lai W. // *Curr. Microbiol.* 2010. V. 61. P. 44–49.
30. Duffy L.B., Crabb D., Searcey K., Kempf M.C., Duffy L. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2000. V. 45. P. 29–33.
31. Bartlett J.G. // *Clin. Infect. Dis.* 2008. V. 47. Suppl 3. P. S232–S236.
32. Nguyen F., Starosta A.L., Arenz S., Sohmen D., Dönhöfer A., Wilson D.N. // *Biol. Chem.* 2014. V. 395. P. 559–575.
33. Chopra I., Roberts M. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. V. 65. № 2. P. 232–260.
34. Thaker M., Spanogiannopoulos P., Wright G.D. // *Cell Mol. Life Sci.* 2010. V. 67. P. 419–431.
35. Dai M., Lu J., Wang Y., Liu Z., Yuan Z. // *J. Microbiol.* 2012. V. 50. № 5. P. 807–812.
36. Sullivan B.A., Gentry T., Karthikeyan R. // *J. Appl. Microbiol.* 2013. V. 115. P. 774–785.
37. Pinto T.C., Costa N.S., Corrêa A.B., de Oliveira I.C., de Mattos M.C., Rosado A.S., Benchetrit L.C. // *Braz. J. Microbiol.* 2014. V. 45. № 3. P. 785–789.
38. Jahan M., Zhanel G.G., Sparling R., Holley R.A. // *Int. J. Food Microbiol.* 2015. V. 199. P. 78–85.
39. Taraskina A.E., Savicheva A.M., Akopian T.A., Soroka A.E., Momynaliev K.T., Govorun V.M. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2002. V. 134. № 1. P. 60–63.
40. Shen X., Yang H., Yu S., Yao K., Wang Y., Yuan L., Yang Y. // *Microb. Drug Resist.* 2008. V. 14. P. 155–161.
41. Bebear C.M., Kempf I. *Mycoplasmas: molecular biology pathogenicity and strategies for control*. UK: Horizon Bioscience, 2005. P. 535–569.
42. Dégrange S., Renaudin H., Charron A., Pereyre S., Bébéar C., Bébéar C.M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2008. V. 61. № 6. P. 1390–1392.
43. Schelonka R.L., Waites K.B. // *Semin. Perinatol.* 2007. V. 31. P. 2–9.
44. Lerner U., Amrama E., Ayling R.D., Mikula I., Gerchman I., Harrus S., Teff D., Yogev D., Lysnyansky I. // *Vet. Microbiol.* 2013. V. 168. P. 365–371.
45. Meyer Sautteur P.M., van Rossum A.M., Vink C. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2014. V. 27. P. 220–227.
46. Spuesens E.B., Meyer Sautteur P.M., Vink C., van Rossum A.M. // *J. Infect.* 2014. V. 69. Suppl 1. P. S42–S46.
47. Gautier-Bouchardon A.V., Ferré S., Le Grand D., Paoli A., Gay E., Poumarat F. // *PLoS One.* 2014. V. 9. e87672.
48. Leclercq R. // *Clin. Infect. Dis.* 2002. V. 34. № 4. P. 482–492.
49. Alekshun M.N., Levy S.B. // *Cell.* 2007. V. 128. № 6. P. 1037–1050.
50. Lysnyansky I., Gerchman I., Flaminio B., Catania S. // *Microb. Drug Resist.* 2015. V. 3. [Epub ahead of print].
51. Paterna A., Sánchez A., Gómez-Martín A., Corrales J.C., De la Fe C., Contreras A., Amores J. // *J. Dairy Sci.* 2013. V. 96. № 11. P. 7073–7076.
52. Wang Q.Y., Li R.H., Zheng L.Q., Shang X.H. // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2014. pii: S1684-1182(14)00118-2.
53. Couldwell D.L., Lewis D.A. // *Infect. Drug Resist.* 2015. V. 8. P. 147–161.
54. Fàbrega A., Madurga S., Giralt E., Vila J. // *Microb. Biotechnol.* 2009. V. 2. P. 40–61.
55. Redgrave L.S., Sutton S.B., Webber M.A., Piddock L.J.V. // *Trends Microbiol.* 2014. V. 22. P. 438–445.
56. Meng D.-Y., Sun C.-J., Yu J.-B., Ma J., Xue W.-C. // *Braz. J. Microbiol.* 2014. V. 45. P. 239–242.
57. Bébéar C.M., de Barbeyrac B., Pereyre S., Renaudin H., Clerc M., Bébéar C. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2008. V. 14. P. 801–805.
58. Говорун В.М., Гуцин А.Е., Ладыгина В.Г., Абрамычева Н.Ю., Тополь Ю.Ю. // *Молекул. генет. микробиол. вирусол.* 1998. № 3. С. 16–19.
59. Li L., Weimin S., Zhang K., Tang X., Guo N., Shen F., Xing M., Liua L., Yuan P., Shi Q., Liang J., Yu L. // *Iranian J. Pharm. Res.* 2012. V. 11. P. 1111–1119.
60. Kikuchi M., Ito S., Yasuda M., Tsuchiya T., Hatazaki K., Takanashi M., Ezaki T., Deguchi T. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. V. 69. P. 2376–2382.
61. Engberg J., Aarestrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., Nachamkin I. // *Emerging Infect. Dis.* 2001. V. 7. № 1. P. 24–34.
62. de Jong A., Stephan B., Silley P. // *J. Appl. Microbiol.* 2011. V. 112. P. 239–245.
63. Kong L.-C., Gao D., Gao Y.-H., Liu S.-M., Ma H.-X. // *J. Vet. Med. Sci.* 2014. V. 76. № 12. P. 1655–1657.
64. Dybvig K., Voelker L.L. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. V. 50. P. 25–57.
65. Delaney N.F., Balenger S., Bonneaud C., Marx C.J., Hill G.E., Ferguson-Noe N., Tsai P., Rodrigo A., Edwards S.V. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8(2). e1002511.
66. Beeton M.L., Chalker V.J., Kotecha S., Spiller O.B. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. V. 64. P. 529–538.
67. Manning A.J., Kuehn M.J. // *BMC Microbiol.* 2011. V. 11. P. 258.
68. Schrempf H., Koebisch I., Walter S., Engelhardt H., Meschke H. // *Microb. Biotechnol.* 2011. V. 4. P. 286–299.
69. Schertzer J.W., Whiteley M. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 23. P. 118–130.
70. Kulkarni H.M., Swamy Ch.V.B., Jagannadham M.V. // *J. Proteome Res.* 2014. V. 13. P. 1345–1358.
71. Medvedeva E.S., Baranova N.B., Mouzykantov A.A., Grigorieva T.Y., Davydova M.N., Trushin M.V., Chernova O.A., Chernov V.M. // *ScientificWorldJournal.* 2014. Article ID 150615.
72. Chattopadhyay M.K., Jagannadham M.V. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 758.

73. Kulp A., Kuehn M.J. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. V. 64. P. 163–184.
74. Deatherage B.L., Cookson B.T. // *Infect. Immun.* 2012. V. 80. P. 1948–1957.
75. Kim J.H., Lee J., Park J., Gho Y.S. // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2015. V. 40. P. 97–104.
76. Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 2767–2774.
77. Manning A.J., Kuehn M.J. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 23. P. 131–141.
78. Lee J., Lee E.Y., Kim S.H., Kim D.K., Park K.S., Kim K.P., Kim Y.K., Roh T.Y., Gho Y.S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. P. 2589–2595.
79. Bonnington K.E., Kuehn M.J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843. P. 1612–1619.
80. Park A.J., Suretteand M.D., Khursigara C.M. // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 464.
81. Медведева Е.С., Баранова Н.Б., Музыкантов А.А., Григорьева Т.Ю., Давыдова М.Н., Чернова О.А., Чернов В.М. // *ДАН.* 2014. Т. 454. № 6. С. 725–728.
82. Mashburn-Warren L., Howe J., Brandenburg K., Whiteley M. // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. P. 3411–3414.
83. Vidakovics M.L., Jendholm J., Mörgelin M., Månsson A., Larsson C., Cardell L.O., Riesbeck K. // *PLoS Pathog.* 2010. V. 6. e1000724.
84. Rumbo C., Fernández-Moreira E., Merino M., Poza M., Mendez J.A., Soares N.C., Mosquera A., Chaves F., Bou G. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. V. 55. P. 3084–3090.
85. D'Costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W., Wright G.D. // *Science.* 2006. V. 311. № 5759. P. 374–377.
86. Wright G.D. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012. V. 211. P. 13–30.
87. Cox G., Wright G.D. // *Int. J. Med. Microbiol.* 2013. V. 303. P. 287–292.
88. Gillings M.R. // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. P. 4.
89. Perry J.A., Westman E.L., Wright G.D. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2014. V. 21. P. 45–50.
90. Breidenstein E.B.M., Khaira B.K., Wiegand I., Overhage J., Hancock R.E.W. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 12. P. 4486–4491.
91. Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán J.C., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tümmler B., Baquero F., et al. // *PLoS One.* 2008. V. 3. e1619.
92. Girgis H.S., Hottes A.K., Tavazoie S. // *PLoS One.* 2009. V. 4. e5629.
93. Alvarez-Ortega C., Wiegand I., Olivares J., Hancock R.E., Martínez J.L. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 10. P. 4159–4167.
94. Poirel L., Bonnin R.A., Nordmann P. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. V. 55. P. 4224–4229.
95. Peleg A.Y., Miyakis S., Ward D.V., Earl A.M., Rubio A., Cameron D.R., Pillai S., Moellering Jr. R.C., Eliopoulos G.M. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e28316.
96. Su H.-C., Khatun J., Kanavy D.M., Giddings M.C. // *Microbial. Drug Resistance.* 2013. V. 19. P. 428–436.
97. Tan S.Y., Chua S.L., Liu Y., Høiby N., Andersen L.P., Givskov M., Song Z., Yang L. // *Genome Biol. Evol.* 2013. V. 5. P. 807–818.
98. Hu Y., Zhu Y., Ma Y., Liu F., Lu N., Yang X., Luan C., Yi Y., Zhu B. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. P. 1152–1161.
99. Sánchez M.B. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 658.
100. Ilina E.N., Shitikov E.A., Ikryannikova L.N., Alekseev D.G., Kamashev D.E., Malakhova M.V., Parfenova T.V., Afanas'ev M.V., Ischenko D.S., Bazaleev N.A., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e56577.
101. Zhu L., Yan Z., Zhang Z., Zhou Q., Zhou J., Wakeland E.K., Fang X., Xuan Z., Shen D., Li Q.Z. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e66584.
102. Petty N.K., Ben Zakour N.L., Stanton-Cook M., Skippington E., Totsika M., Forde B.M., Phan M.D., Gomes Moriel D., Peters K.M., Davies M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 5694–5699.
103. Coldham N.G., Randall L.P., Piddock L.J., Woodward M.J. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2006. V. 58. № 6. P. 1145–1153.
104. Madeira A., Santos P.M., Coutinho C.P., Pinto-de-Oliveira A., Sá-Correia I. // *Proteomics.* 2011. V. 11. P. 1313–1328.
105. Медведева Е.С., Давыдова М.Н., Музыкантов А.А., Баранова Н.Б., Григорьева Т.Ю., Синягина М.Н., Бульгина Е.А., Чернова О.А., Чернов В.М. // *ДАН.* 2016. Т. 466. № 2. С. 228–232.
106. Tiwari V., Vashist J., Kapil A., Moganty R.R. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e39451.
107. Liu X., Hu Y., Pai P.J., Chen D., Lam H. // *J. Proteome Res.* 2014. V. 13. № 3. P. 1223–1233.
108. Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B.C., Herrmann R. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 4420–4449.
109. Perry J.A., Wright G.D. // *Bioessays.* 2014. V. 36. P. 1179–1184.

УДК 577.322

Моделирование структуры комплексов потенциал-управляемых калиевых каналов с пептидными блокаторами: методы и результаты

В. Н. Новоселецкий^{1*}, А. Д. Волынцева¹, К. В. Шайтан¹, М. П. Кирпичников^{1,2},
А. В. Феофанов^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

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

*E-mail: valeryns@gmail.com

Поступила в редакцию 06.07.2015

Принята к печати 02.12.2015

РЕФЕРАТ Моделирование структуры комплексов потенциал-управляемых калиевых (K_v) каналов с пептидными блокаторами призвано выявить ключевые для формирования высокоаффинных комплексов аминокислотные остатки и расшифровать систему их взаимодействий. Эти работы открывают возможность конструирования *in silico* селективных блокаторов, новых молекулярных инструментов для изучения распределения и функциональной роли калиевых каналов. Предполагается, что оптимизированные блокаторы могут стать основой для разработки лекарств, снижающих гиперактивность калиевых каналов и корректирующих патологические процессы, связанные с этой активностью. В обзоре рассмотрены современные методы компьютерного моделирования комплексов пептидных блокаторов поры с K_v -каналами, алгоритмы анализа межмолекулярных взаимодействий и результаты их применения для описания структурных особенностей этих комплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА блокаторы, калиевые каналы, молекулярное моделирование, структура комплексов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БД – броуновская динамика; МД – молекулярная динамика; ПСС – потенциал средней силы (англ. potential of mean force, PMF); РСА – рентгеноструктурный анализ; СФ – селективный фильтр; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; K_v -каналы – потенциал-управляемые калиевые каналы; α -КТх – семейство пептидных блокаторов калиевых каналов; ММ-РБСА – метод расчета свободной энергии, сочетающий использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона–Больцмана (molecular mechanics/Poisson–Boltzmann surface area); VSD – потенциал-чувствительный домен (voltage-sensor domain).

ВВЕДЕНИЕ

Калиевые (K^+) каналы – это порообразующие трансмембранные белки, регулирующие различные биологические процессы за счет контроля потоков ионов калия через клеточную мембрану. Калиевые каналы экспрессируются во многих тканях и принимают участие в разнообразных биологических функциях, таких, как поддержание потенциала покоя мембраны, контроль сердечного и нервного возбуждения, высвобождение нейротрансмиттеров, мышечное сокращение и секреция гормонов [1, 2]. Калиевые каналы играют важную роль в диагностике и лечении различных заболеваний [3–6].

Калиевые каналы человека включают в себя Ca^{2+} -активируемые (K_{Ca}), каналы входящего вы-

прямления (K_{IR}), двухпоровые каналы утечки (K_{2p}), а также потенциал-управляемые (K_v) калиевые каналы. Наибольшее семейство формируют K_v -каналы, включающие в себя 12 подсемейств: Shaker/ K_v1 (KCNA), Shab/ K_v2 (KCNB), Shaw/ K_v3 (KCNC) и др. Они обладают сходным строением и являются (за исключением подсемейств K_v4 – K_v9) гомотетрамерами с осью симметрии 4-го порядка. Механизмы активации K_v -каналов рассмотрены в обзоре [7].

Развитие ряда заболеваний сопровождается нарушением нормального функционирования K_v -каналов определенного типа, а в их терапии используют коррекцию активности данных каналов. Например, к таким патологиям относятся нарушения мембранной возбудимости и функционирования нейронов

и сердечно-сосудистой системы [8]. Эпизодическая атаксия-1, аутосомно-доминантное неврологическое расстройство человека, связано с мутациями остатка V408 потенциал-зависимого калиевого канала $K_v1.1$ (*KCNA1*) [9]. С мутациями генов *KCNQ2* и *KCNQ3*, кодирующих потенциал-управляемые каналы $K_v7.2$ и $K_v7.3$, связано такое генетическое заболевание, как доброкачественные семейные неонатальные судороги [10]. Анализ экспрессии генов на разных стадиях развития болезни Альцгеймера показывает, что усиление экспрессии $K_v3.4$ (*KCNC4*) и нарушение регуляции $K_v3.1$ (*KCNC1*) изменяет потоки ионов калия в нейронах, что приводит к изменению синаптической активности и может лежать в основе нейродегенерации [11]. С нарушениями функций потенциал-управляемых калиевых каналов ($K_v7.1$ (*KCNQ1*), $K_v11.1$ (*KCNH2*), *KCNE1*, *KCNE2*) связывают возникновение такого сердечно-сосудистого заболевания, как синдром удлиненного интервала QT [12]. Возникновение синдрома Бругада связывают с мутациями гена *KCND3*, кодирующего канал $K_v4.3$ [13]. Исследование экспрессии калиевых каналов у пациентов с острым коронарным синдромом выявило роль канала $K_v1.3$ [14]. Ингибиторы $K_v1.3$ подавляют пролиферацию Т-лимфоцитов (а именно, эффекторных клеток памяти T_{EM}), что способствует улучшению состояния больных рассеянным склерозом, сахарным диабетом типа 1, ревматоидным артритом, псориазом и бронхиальной астмой [15]. Блокирование канала $K_v2.1$ оказывает терапевтическое действие при сахарном диабете типа 2 [16]. Токсины из ядов скорпионов, пауков, змей, конусов и морских анемонов являются природными пептидами-блокаторами, обладающими высоким терапевтическим потенциалом. Эти пептиды классифицируют по механизму действия:

- блокаторы поры, которые связываются с внеклеточной стороны в области поры канала и препятствуют прохождению через нее ионов калия (пептиды из яда скорпионов и анемонов);
- пептиды, которые взаимодействуют с VSD-доменом, стабилизируют конформацию с закрытой порой и препятствуют открыванию канала (пептиды из яда тарантулов).

В настоящее время установлены структуры лишь нескольких комплексов K_v -каналов с блокаторами [17, 18], а недостаток экспериментальных данных об особенностях строения таких комплексов активно восполняется за счет разработки и применения методов молекулярного моделирования.

Пептидные блокаторы обладают высоким сродством (пико- и наномолярные константы диссоциации комплексов), но часто сразу к нескольким близкородственным K_v -каналам. Поэтому работы в области

фармацевтического использования токсинов направлены на повышение их селективности путем оптимизации структуры. Одним из примеров является разработка синтетического производного пептида актинии ShK-186, блокирующего потенциал-управляемый калиевый канал $K_v1.3$ при пикомолярных концентрациях и проходящего в настоящее время стадию 1В клинических исследований в качестве средства против аутоиммунных заболеваний [19]. Другое преимущество селективных токсинов – возможность их применения для идентификации каналов, изучения распределения каналов в клетках и тканях, а также для выяснения роли каналов в развитии различных патологий. Большую роль в направленной разработке селективных блокаторов призваны сыграть методы молекулярного моделирования.

В данном обзоре рассмотрено современное состояние проблемы изучения комплексов K_v -каналов с блокаторами поры методами компьютерного моделирования, включая предсказание структур этих комплексов, расчет интерфейсов взаимодействия и энергии связывания. Общий обзор теории и методов расчета, применимых к моделированию различных ионных каналов, а также примеры использования методов молекулярного моделирования для ряда ионных каналов, отличных от семейства K_v , выходят за рамки данного обзора, а их рассмотрение может быть найдено в недавно опубликованной работе [20].

СТРУКТУРЫ K_v -КАНАЛОВ, ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРОВ ПОРЫ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Анализ взаимодействий между калиевыми каналами и токсинами с помощью компьютерного моделирования значительно облегчается благодаря установлению их пространственной структуры методами рентгеноструктурного анализа (РСА), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и электронной микроскопии. В настоящее время известны структуры большого числа пептидных блокаторов поры, 12 калиевых каналов [21] и двух комплексов калиевых каналов с блокатором харибдотоксином. Экспериментальные данные о структурах калиевых каналов и их комплексов существенно ограничены из-за известных сложностей в выделении, очистке и кристаллизации мембранных белков. Эти сложности придают дополнительную ценность каждой расшифрованной структуре, проливающей свет на механизмы активации каналов, их функционирование и особенности взаимодействия с блокаторами [22].

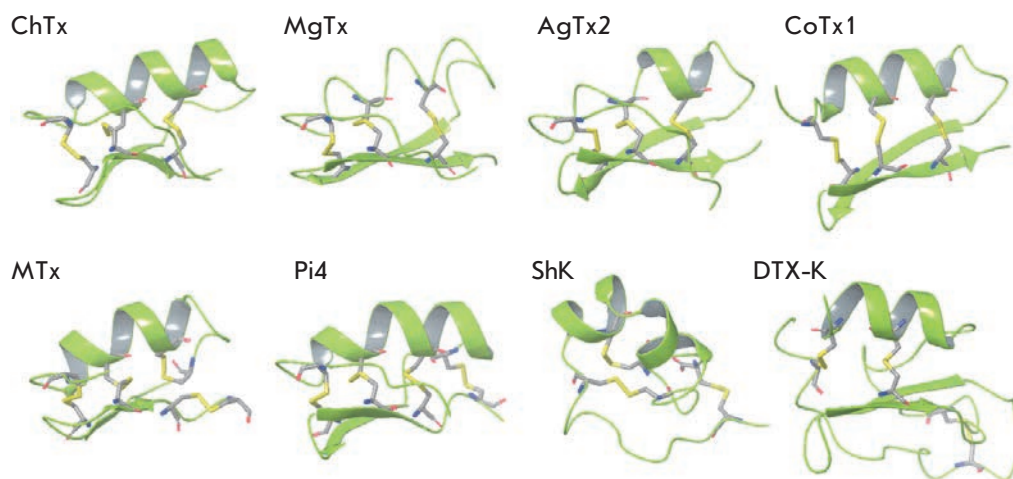
Структуры пептидных блокаторов калиевых каналов

Большинство пептидных блокаторов K_v -каналов найдено в ядах скорпионов и отнесено к семейству

Таблица 1. Активно исследуемые пептидные блокаторы K_v -каналов с известной структурой

Название	Обозначение	Подсемейство	Код PDB (ссылка)	Блокируемые каналы
Харибдотоксин	ChTx	α -КТх 1.1	2CRD [23]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, 1.6, K_{Ca} 1.1, 3.1
	Lq2	α -КТх 1.2	1LIR [24]	K_v , K_{Ca} , K_{IR}
Ноксиустоксин	NTx	α -КТх 2.1	1SXM [25]	K_v 1.2, 1.3
Маргатоксин	MgTx	α -КТх 2.2	1MTX [26]	K_v 1.1, 1.2, 1.3
Хонготоксин	HgTx	α -КТх 2.5	1HLY [27]	K_v 1.2, 1.3
Калиотоксин	КТх	α -КТх 3.1	1XSW [28]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, 1.6, K_{Ca} 3.1
Аджитоксин	AgTx2	α -КТх 3.2	1AGT [29]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, 1.6
	BmKTx	α -КТх 3.6	1BKT [30]	K_v 1.3
	OSK1	α -КТх 3.7	1SCO [31]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, K_{Ca} 3.1
Мауротоксин	Pi1	α -КТх 6.1	1WZ5 [32]	K_v 1.2
	MTx	α -КТх 6.2	1TXM [33]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, K_{Ca} 3.1
	HsTx1	α -КТх 6.3	1QUZ [34]	K_v 1.1, 1.3, K_{Ca} 3.1
	Pi4	α -КТх 6.4	1N8M [35]	K_v 1.2
	BmP01	α -КТх 7.2	1WM7 [36]	K_v 1.3
Кобатоксин	CoTx1	α -КТх 10.1	1PJV [37]	K_v 1.2
	Vm24	α -КТх 23.1	2K9O [38]	K_v 1.3
	ShK		1ROO [39]	K_v 1.1, 1.3, 1.6, 3.2, K_{Ca} 3.1
Дендротоксин-К	DTX-K		1DTK [40]	K_v 1.1

Рис. 1. Структуры харибдотоксина (ChTx), маргатоксина (MgTx), аджитоксина-2 (AgTx2), кобатоксина-1 (CoTx1), мауротоксина (MTx), токсина Pi4, токсина ShK и дендротоксина DTX-K в ленточном представлении. В стержневом представлении показаны остатки цистеина, образующие дисульфидные мостики



α -КТх. Эффективными блокаторами K_v -каналов являются также пептид ShK из морского анемона и дендротоксины (α -DTX, DTX-I, DTX-K, δ -DTX) из яда мамбы. Отдельные пептиды способны блокировать не только K_v -, но и K_{Ca} -каналы (табл. 1). Методом ЯМР или реже с помощью РСА получена пространственная структура многих блокаторов (табл. 1), что создает основу для моделирования их комплексов с калиевыми каналами.

Блокаторы семейства α -КТх (известно более 50 структур) обладают сходным α/β -типом укладки (рис. 1, 2), включающим α -спираль, а также два или три β -тяжа. Отличия в структурах связаны

с различающейся длиной полипептидной цепи (29–40 остатков) и конкретным аминокислотным составом (рис. 2), который влияет на размер α -спиральных и β -структурированных участков.

Пептиды α -КТх содержат три или четыре дисульфидных связи, делающих их структуру конформационно жесткой. Система дисульфидных связей постоянна внутри каждого подсемейства за исключением подсемейства α -КТх6. Для пептидов α -КТх6 предпочтительно образование дисульфидных связей между остатками цистеина 1 и 5, 2 и 6, 3 и 7, 4 и 8, как, например, в токсине Pi4 (рис. 1, 2). Однако в мауротоксине (рис. 1, 2) и спинотоксине (α -КТх6.13) свя-

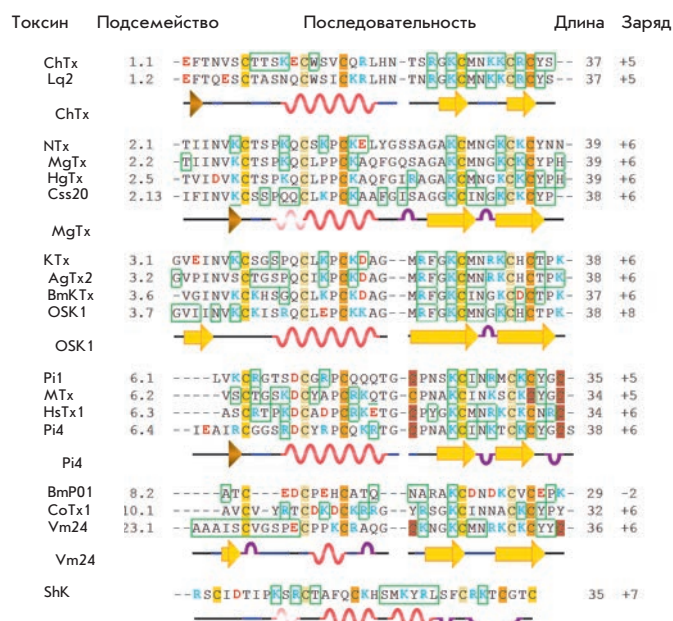


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей токсинов – блокаторов K_v -каналов. Зелеными рамками отмечены все аминокислотные остатки, которые по данным моделирования образуют контакты с различными каналами. Желтым и оттенками коричневого выделены остатки Cys (одним цветом обозначены остатки, образующие дисульфидную связь), синим — положительно заряженные остатки, красным — отрицательно. Показана вторичная структура некоторых токсинов (по данным PDB, табл. 1). Желтые стрелки — β -тяжи, яркие волнистые линии — α -спирали, неяркие волнистые линии — 3/10-спирали, фиолетовые дуги — повороты, синие линии — изгибы, черные линии — неструктурированные участки

зи образуются между остатками цистеина 1 и 5, 2 и 6, 3 и 4, 7 и 8. Предполагается, что в этих пептидах возможно переключение дисульфидных связей без заметного изменения структуры, так как атомы серы в остатках 3, 4, 7 и 8 находятся близко друг к другу [41].

При pH 7 токсины α -КТх имеют суммарный положительный заряд, который варьирует от +2 до +8, а отрицательно заряженные остатки встречаются преимущественно в N-концевой половине пептида (рис. 2). Исключение составляют токсины подсемейства α -КТх8, в частности VmP01 [41] с суммарным зарядом -2 (табл. 1, рис. 2), активный в отношении канала $K_v1.3$ [42].

Токсин ShK и дендротоксин DTX-K по размеру и наличию дисульфидных мостиков схожи с токсинами из яда скорпиона, но существенно отличаются структурой (рис. 1, 2).

Экспериментальные структуры калиевых каналов

Бактериальный канал KcsA — первый калиевый канал, структура которого была определена методом РСА (табл. 2). Канал имеет форму конуса, образованного четырьмя α -субъединицами, состоящими из двух трансмембранных α -спиралей M1 и M2 и поровой области P, которая, в свою очередь, содержит три различающихся фрагмента: P-петлю, P-спираль и селективный фильтр (СФ, рис. 3). СФ образован атомами кислорода главной цепи аминокислотных остатков, входящих в характерный для всех калиевых каналов мотив TVGYG (в некоторых каналах TIGYG или SVGFY), имеет протяженность всего 12 Å и диаметр, точно соответствующий ионам калия. Хотя канал KcsA не является потенциал-управляе-

Таблица 2. Структуры потенциал-управляемых калиевых каналов и их комплексов с пептидом харибдотоксином, используемые для моделирования по гомологии

Описание	pdb-код (разрешение, Å) (ссылка)	Примеры моделирования
Канал KcsA	1BL8 (3.20 Å) [54]	[55]
Канал K_vAP	1ORQ (3.20 Å) [56]	[57]
Канал $K_v1.2$	2A79 (2.90 Å) [43]	[58, 59]
	3LUT (2.90 Å) [44]	[60–62]
Химерный канал $K_v1.2-2.1$	2R9R (2.40 Å) [45]	[63–68]
Канал KcsA с мутациями в комплексе с ChTx	2A9H# [17]	[69, 70]
Канал $K_v1.2-2.1$ в комплексе с ChTx	4JTA (2.50 Å) [18]	[71]

#Структура получена методом ЯМР, в отличие от остальных структур, установленных методом РСА.

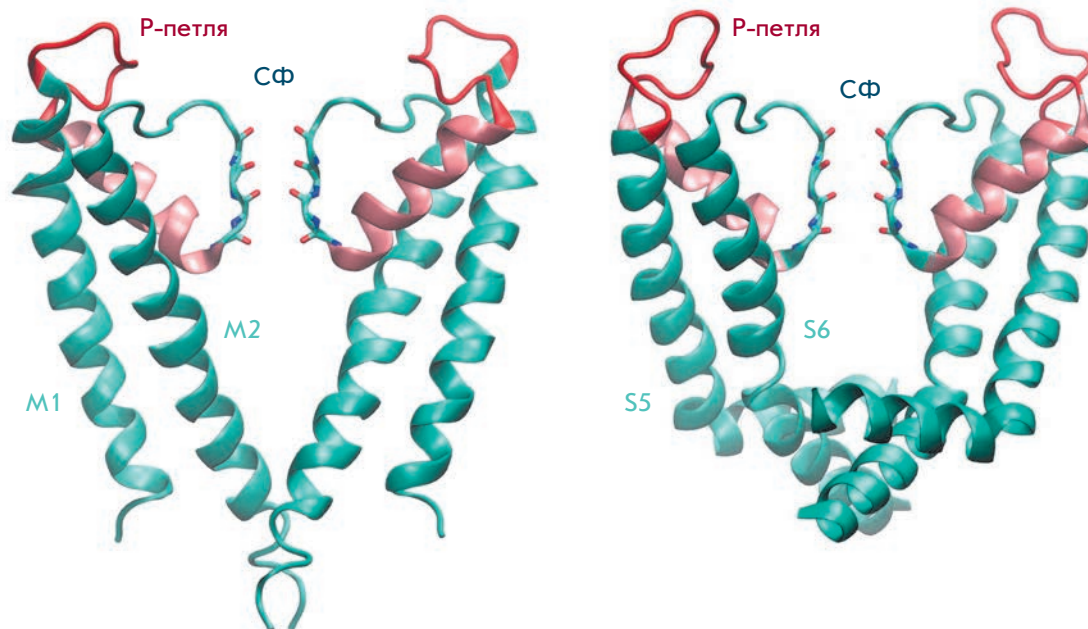


Рис. 3. Кристаллографические структуры канала KcsA (pdb-код 1BL8) (слева) и порового домена канала Kv1.2 (pdb-код 2A79) (справа) в ленточном представлении. Для наглядности показаны только две α -субъединицы из четырех. Р-петля показана красным, Р-спираль розовым. Показаны атомы кислорода главной цепи остатков, образующих СФ. Ионы калия не показаны

мым, в поровой области он обладает высокой гомологией с Kv-каналами эукариот (рис. 4).

Известно около 60 различных структур канала KcsA, отличающихся друг от друга состоянием (открытая или закрытая конформация), связанными с каналом низкомолекулярными лигандами, ионами в селективном фильтре (K^+ , Cs^+ , Rb^+ , Tl^+), а также мутациями и гибридными вставками, призванными имитировать поровые домены эукариотических калиевых каналов. Во всех этих структурах конформация Р-петель и строение интерфейса потенциального взаимодействия с блокаторами поры остаются практически неизменными.

Еще один прокариотический калиевый канал, кристаллографическую структуру которого удалось получить, – потенциал-управляемый канал KvAP архей (табл. 2). Главное отличие этого канала от KcsA состоит в более сложной структуре α -субъединиц, которые содержат шесть спиралей (S1–S6). Спираль S5 и S6 четырех субъединиц, подобно спиральям M1 и M2 канала KcsA, собраны в конусообразную структуру и образуют пору канала, а спираль S1–S4 формируют потенциал-чувствительный домен (VSD-домен).

В настоящее время известно лишь несколько структур эукариотических калиевых каналов (табл. 2), первой из которых стала структура Kv1.2 [43], улучшенная позднее [44]. Как и в случае канала

KvAP, α -субъединицы Kv1.2 имеют в своем составе шесть спиралей (S1–S6), образующих пору канала (спираль S5–S6), и VSD-домен (S1–S4). В улучшенной структуре Kv1.2 дополнительно различимы петли S1–S2, S2–S3 и S3–S4, соединяющие спираль VSD-домена, а также боковые цепи ряда остатков спиралей S2, S4 и петли S5–P. Анализ структуры Kv1.2 выявил значительное сходство в строении порового домена этого канала и KvAP, и KcsA (рис. 4). Так, структура СФ и примыкающих к нему остатков характеризуется удивительной консервативностью (среднеквадратичное отклонение положения α -атомов остатков 65–85 KcsA от положения соответствующих им остатков Kv1.2 составляет менее 0.8 \AA) при сходстве последовательностей, составляющем 65%. В то же время поровые домены Kv1.2 и KcsA немного отличаются по длине и конформации Р-петель (рис. 3), а также по конформации трансмембранных спиралей ближе к цитоплазматической стороне мембраны. Сравнительный анализ кристаллографических структур канала Kv1.2 показал, что конформация Р-петель определена неоднозначно: наиболее часто реализуется конформация, характерная для структур с pdb-кодами 2A79 и 3LNM, а конформация, наблюдаемая в структуре с pdb-кодом 3LUT, уникальна.

При высоком сходстве поровых доменов Kv1.2 и KvAP структура их VSD-доменов значительно от-

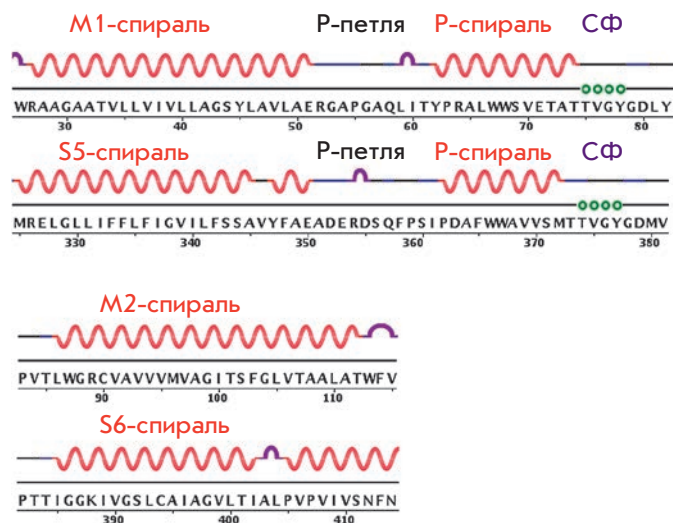


Рис. 4. Сопоставление первичной и вторичной структуры канала KcsA (pdb-код 1BL8) и порового домена канала K_v1.2 (pdb-код 2A79). Кружками показаны остатки, контактирующие с ионами K⁺ в СФ (фрагмент мотива TVGYG). Обозначения вторичной структуры как на рис. 2.

личается. Предполагается, что эти отличия связаны с искажением структуры, возникающим при выделении и кристаллизации канала K_vAP [43].

Структуры других эукариотических K_v-каналов пока не определены, но на основании высокой гомологии предполагается, что структура их поровых доменов сходна с каналом K_v1.2.

Экспериментальные структуры комплексов калиевых каналов с пептидными блокаторами

Первая структура комплекса калиевого канала с пептидным блокатором была определена методом ЯМР для модифицированного KcsA и харибдотоксина (табл. 2) благодаря использованию уже известных индивидуальных структур канала и блокатора [17]. В структуру природного KcsA, не связывающего известные пептидные блокаторы эукариотических калиевых каналов, были введены три мутации (Q58A, T61S, R64D), повысившие сродство KcsA к харибдотоксину и усилившие тем самым его сходство с эукариотическими каналами семейства Shaker. Еще три мутации (F103Y, T107F, L110V) были введены в центральную полость для придания сходства с каналом K_v11.1 человека. Анализ спектров ЯМР показал, что связывание харибдотоксина приводит к структурным перестройкам участков канала, ответственных за взаимодействие, а расположение спиралей М1 и М2 остается неизменным. Главная цепь токсина не претерпевает существенных изме-

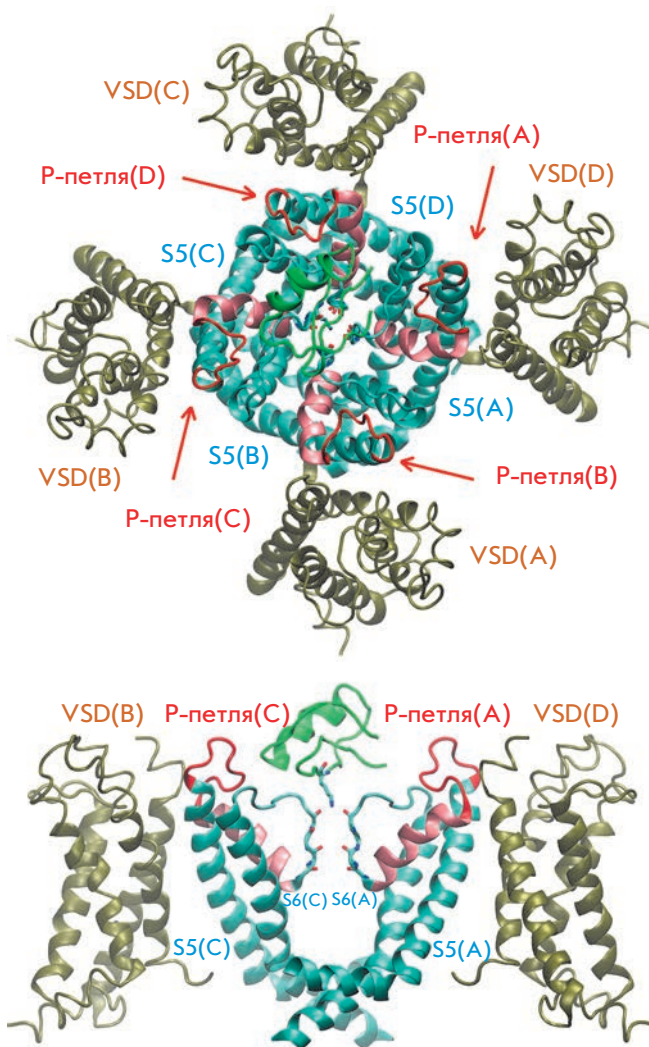


Рис. 5. Кристаллографическая структура комплекса харибдотоксина с гибридным каналом K_v1.2-2.1 (pdb-код 4JTA) в ленточном представлении (вид сверху и сбоку). Для наглядности показаны только две α-субъединицы. Оливковый цвет – потенциал-чувствительный домен (VSD). Токсин — ярко-зеленый, а его остаток K27, направленный в пору канала, показан в стержневом представлении. Остальные обозначения, как на рис. 3. А, В, С, D – субъединицы канала

нений в процессе связывания. Доказано связывание K27 харибдотоксина с порой канала, а также описан интерфейс взаимодействия.

Недавно методом PCA получили структуру комплекса гибридного канала K_v1.2-2.1 с харибдотоксином (табл. 2, рис. 5). Гибридизация затронула VSD-домен: в канале K_v1.2 «лопасть» сенсора потенциала (voltage-sensor paddle; участок S3b–S4 спирали) была заменена на аналогичную от канала K_v2.1, как уже опробовано ранее [45]. Анализ структуры

комплекса показал, что ни канал, ни токсин не пертерпели заметных изменений структуры при связывании [18].

Рассмотрение структур комплексов харибдотоксина с каналами (модифицированным KcsA и гибридным $K_v1.2-2.1$) показывает, что значительное число взаимодействий реализуется между аминокислотными остатками токсина и петлями каналов. Заметим, что Р-петли являются наиболее варибельным фрагментом K_v -каналов и, возможно, что именно этой варибельностью обусловлены отличия в силе взаимодействий блокатора с различными каналами.

МОДЕЛИРОВАНИЕ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ ПО ГОМОЛОГИИ

В ситуации, когда известна трехмерная структура лишь нескольких калиевых каналов и их комплексов с пептидными блокаторами, методы молекулярного моделирования важны и востребованы для анализа структурных особенностей всего многообразия K_v -каналов и комплексов. Основным вычислительным подходом здесь является моделирование по гомологии [46], которое состоит в построении трехмерной модели белка с неизвестной структурой на основе данных о структуре гомологичного белка. Моделирование по гомологии включает в себя несколько этапов [47]:

- поиск потенциальных шаблонов – белков с известной структурой, максимально гомологичных моделируемому белку, например, с помощью веб-сервисов BLAST [48] или FASTA [49];

- выравнивание последовательностей шаблона и моделируемого белка, например, с помощью веб-сервиса CLUSTALW [50];

- построение структурной модели неизвестно-го белка по шаблону путем сохранения одинаковых остатков, замены различающихся и достройки фрагментов, отсутствующих в шаблоне, например, с помощью программы Modeller [51].

Отметим, что использование веб-сервиса Swiss-model [52] позволяет выполнить все эти три этапа автоматически.

Необходимое условие применимости моделирования по гомологии – значительное (не ниже 20–30%) сходство последовательностей моделируемого белка и шаблона [53]. Поровые домены калиевых каналов идеально соответствуют этому условию: сходство K_v -каналов в этом домене достигает 80% и более, а основные различия локализованы в небольшой по размеру поровой петле. Расшифровка структуры канала $K_v1.2-2.1$ в комплексе с харибдотоксином [18] подтвердила данные других экспериментальных методов о том, что VSD-домен не участвует в связывании блокаторов поры. Поэтому при моделировании

комплексов блокаторов с K_v -каналами ограничиваются рассмотрением только поровых доменов.

Сходство последовательностей поровых доменов K_v -каналов и бактериального канала KcsA достигает 30%, поэтому структура последнего также используется в качестве шаблона для моделирования поровых доменов K_v -каналов и их комплексов с блокаторами [55, 69, 70, 72] наряду с некоторыми другими структурами (табл. 2). Обоснованием такого подхода к моделированию служат, в том числе, экспериментальные данные, показывающие, что гибридные каналы KcsA- $K_v1.x$ (KcsA, в котором Р-петля заменена гомологичной петлей канала $K_v1.x$, $x = 1, 2, 3, 6$) сохраняют специфический профиль высокоаффинного связывания блокаторов, характерный для каналов $K_v1.x$ [73–75].

Моделирование по гомологии, как правило, сопровождается дальнейшим изучением структуры получаемых моделей с помощью методов броуновской динамики (БД), молекулярного докинга или молекулярной динамики (МД).

БРОУНОВСКАЯ ДИНАМИКА

Метод БД – это разновидность метода стохастической динамики, рассматривающий движение молекул как твердых тел под действием внешних сил, сил трения, имитирующих взаимодействие с молекулами растворителя, и случайных сил. БД широко применяется для анализа ионного транспорта [76, 77] и ограничено – для моделирования взаимодействий токсинов с каналами [78, 79]. При этом используют приближение, в котором каналы и блокаторы полагают жесткими структурами, растворитель – неявным, а мембрану – идеализированным диэлектрическим слоем [20]. Расчеты БД в данном приближении позволяют значительно снизить требования к вычислительным ресурсам и достичь таких времен расчета, на которых проявляются макроскопические эффекты [80].

Расчет методом БД связывания токсина Lq2 (табл. 1) с модифицированным каналом KcsA позволил построить модель комплекса, выявить взаимодействующие с каналом аминокислотные остатки пептида и описать характер их взаимодействий [78]. Поскольку в методе БД структуры блокатора и канала считаются жесткими, то для учета конформационной подвижности блокатора использовали все 22 варианта структуры Lq2, представленные в pdb-файле. Один из этих вариантов обеспечил получение модели комплекса, хорошо соответствующей экспериментальным данным. Подвижность канала в расчетах не учитывали.

Более совершенный способ учета конформационной подвижности в расчетах БД – их сочетание с рас-

четами МД, как это сделано при анализе комплексов канала $K_v1.3$ с аджитоксином, харибдоксином, калиотоксином, маргатоксином и ноксиустоксином [79]. Сравнение расчетных значений энергии электростатического взаимодействия в комплексах и логарифмов констант диссоциации комплексов выявило их высокую корреляцию ($R^2 = 0.60$). Отметим, что в случае калиотоксина обнаружено несоответствие этой корреляции, которое можно объяснить использованием некорректной структуры пептида (pdb-код 1КТХ), значительно отличавшейся от структур гомологичных пептидов аджитоксина и OSK1. Уточненные структуры калиотоксина (pdb-коды 1XSW, 3ODV), полученные позже, не имеют такого отличия.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ

Молекулярный докинг — метод, цель которого состоит в поиске наиболее достоверной ориентации и конформации лиганда в сайте связывания белка-мишени, широко используется для моделирования комплексов блокаторов с калиевыми каналами [38, 62, 80].

При выполнении расчетов белок-белкового докинга одна из молекул фиксируется в пространстве, а вторая пристыковывается к ней с разных сторон и в разных ориентациях. Для каждой конфигурации полученного комплекса производят расчеты оценочной функции, основанной на комплементарности свойств поверхности, электростатических взаимодействиях, ван-дер-ваальсовском отталкивании, энергии десольватации, энергии внутренних напряжений (деформации валентных связей), водородных связей и взаимодействия ароматических групп.

Для молекулярного докинга необходимо применение одной из специализированных программ, таких, как AutoDock (<http://autodock.scripps.edu/>) [81], RosettaDock [82], BiGGER [83], HADDOCK (<http://haddock.science.uu.nl/>) [84] или ZDOCK (<http://zdock.umassmed.edu/>) [85]. Наиболее часто и успешно структуры комплексов канал-блокатор предсказывают с использованием трех последних программ [37, 86, 87].

Особенностью программы HADDOCK является ее ориентация на моделирование взаимодействия больших и гибких пептидных лигандов. Эту программу применяли при создании универсального протокола докинга для предсказания профилей селективности токсинов семейства α -КТх [87] и добились существенных успехов при моделировании структуры комплексов, но традиционная проблема всех задач молекулярного докинга — выбор наиболее правильной из предсказываемых конформаций — была решена не полностью, что указывает на несовершенство используемых оценочных функций.

Молекулярный докинг может использоваться и для учета конформационной подвижности токсинов. Так, в работе по улучшению селективности связывания аналогов токсина C_{ss}20 [58] проанализировали более миллиона решений молекулярного докинга, выполнив визуальное рассмотрение 2000 лучших решений. Недостатком такого подхода, помимо очевидной трудоемкости, является отмеченное выше несовершенство используемых оценочных функций: методы молекулярного докинга позволяют получить сотню лучших решений, среди которых гарантированно есть правильное, но не позволяют однозначно распознать его. Более оптимально проводить молекулярный докинг не столь масштабно, но сопровождать его оптимизацией получаемых решений с помощью МД, а константы связывания вычислять с помощью расчетов свободной энергии [20].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА

В расчетах молекулярной динамики временная эволюция системы взаимодействующих атомов или частиц отслеживается интегрированием их уравнений движения. Точность расчетов МД зависит от выбора так называемого силового поля, т.е. математических функций и их параметров, используемых для описания потенциальной энергии системы частиц. Функции силового поля и наборы параметров получают из экспериментальных работ и квантово-механических расчетов. При правильном использовании существующие в настоящее время силовые поля позволяют получать удивительно точные результаты [88]. Полноатомные силовые поля, такие, как OPLS-AA и различные варианты CHARMM, учитывают все типы атомов в системе. Альтернативно, силовые поля с объединенными атомами, такие, как GROMOS и OPLS-UA, рассматривают тяжелые неполярные атомы (углерод, сера) и связанные с ними атомы водорода в качестве единых центров взаимодействия [89].

При моделировании K_v -каналов наиболее часто используют программный пакет NAMD [90] в сочетании с силовым полем CHARMM [91], включая его варианты CHARMM22, CHARMM27 и CHARMM36 (табл. 3). Отметим, что поле CHARMM27 оптимизировано для расчетов ДНК, РНК и липидов, а в комбинации с полем CHARMM22 — для исследования ДНК-белковых взаимодействий. Хотя применение CHARMM27 для анализа белок-белковых взаимодействий представляется не совсем оптимальным, результаты расчета свободной энергии связывания, выполненные с его применением [60, 66, 92], хорошо согласуются с экспериментальными значениями (табл. 3). В CHARMM36 по сравнению с CHARMM22 введены изменения, улучшающие исследование кон-

Таблица 3. Сравнение расчетных (ΔG_{calc}) и экспериментальных (ΔG_{exp}) значений свободной энергии взаимодействия некоторых K_v -каналов с пептидными блокаторами поры

Канал (pdb-код шаблона)	Токсин (pdb-код структуры или шаблона)	Силовое поле метода МД	ΔG_{calc} , ккал/моль	ΔG_{exp} , ккал/моль	Ссылка
$K_v1.1$ (2R9R)	HsTx1 (1QUZ)	NAMD, CHARMM36	-10.1 ± 0.6	-11.1 ± 0.1	[68]
	ShK (1ROO)	NAMD, CHARMM22	-14.3 ± 1.1	-14.7 ± 0.1	[63]
	ShK-K-amide (1ROO)	NAMD, CHARMM22	-11.8 ± 1	-12.3 ± 0.1	[64]
	ShK-K18A (1ROO)	NAMD, CHARMM27	-11.7 ± 0.7	-11.3 ± 0.1	[66]
$K_v1.2$ (2R9R)	HsTx1 (1QUZ)	NAMD, CHARMM36	-8.9 ± 0.6	-9.5 ± 0.1	[68]
	ShK (1ROO)	NAMD, CHARMM22	-10.1 ± 1.1	-11 ± 0.1	[63]
	MTx (1TXM)	NAMD, CHARMM36	-12.6	-12.6	[92]
$K_v1.3$ (3LUT)	ChTx (2A9H)	NAMD, CHARMM27	-10.4	-12.5	[60]
	MgTx (1MTX)	NAMD, CHARMM36	-11.5	-13.9	[62]
$K_v1.3$ (2A79)	ChTx (2CRD)	GROMACS, OPLS-AA	-26 ± 1	-11.4 ± 0.2	[59]
$K_v1.3$ (2R9R)	HsTx1 (1QUZ)	NAMD, CHARMM36	-14.0 ± 0.6	-14.9 ± 0.2	[68]

формационного пространства при сворачивании белков, их сборке в комплексы и функционально значимых конформационных изменениях [93].

Современные МД-расчеты комплексов каналов с токсинами позволяют учитывать взаимодействия с липидами мембраны. При этом расчетная структура комплекса токсинов, связывающихся с VSD-доменом каналов, зависит от липидного состава мембраны [94]. При моделировании комплексов с пептидными блокаторами поры не обязательно учитывать липидный бислой в явном виде [55]. Это подтверждается хорошим согласием между экспериментальными данными и результатами расчетов свободной энергии образования таких комплексов, оптимизированных методом МД [95, 96]. Обоснованный отказ от учета липид-белковых взаимодействий при моделировании комплексов значительно уменьшает требования к вычислительным ресурсам, позволяя увеличить длину рассчитываемых МД траекторий и полноту исследования конформационного пространства. Еще один прием, позволяющий снизить ресурсоемкость расчетов, – применение модели неявного растворителя, в частности обобщенной борновской модели (generalized Born solvation model). Вне зависимости от используемой модели растворителя расчеты МД в настоящее время проводят с длиной траектории от 15–20 нс [68, 92] до 40–50 нс [62, 97].

В ряде случаев для расчета и анализа комплексов токсинов с каналами используют метод направленной МД. Метод заключается в расчете МД при постепенном уменьшении расстояния между одной или несколькими парами остатков, взаимодействие которых при образовании комплекса представляется наиболее существенным. Достоинство этого метода состоит в учете экспериментальных данных о вза-

имодействующих остатках, что позволяет считать образуемые контакты более точными. Метод направленной МД хорошо зарекомендовал себя при анализе связывания мауротоксина с каналом $K_v1.2$ [92], а также маргатоксина и хонготоксина с $K_v1.3$ [62].

РАСЧЕТ ЭНЕРГИИ КОМПЛЕКСА КАНАЛ–ТОКСИН

Для оценки достоверности структуры комплексов, полученных в результате моделирования, применяют расчеты свободной энергии связывания ΔG . Такие расчеты имеют фундаментальное значение для теоретической оценки возможности осуществления многих важных биологических процессов, в том числе формирования прочных комплексов лигандов с рецепторами и конформационных изменений в них [98].

Свободную энергию взаимодействия калиевых каналов с токсинами чаще всего оценивают с использованием метода расчета потенциала средней силы (ПСС), включающего получение набора конформаций методом зонтичной выборки [99]. Во многих случаях этот метод позволяет получить значения ΔG , которые согласуются с экспериментальными данными (табл. 3), что свидетельствует о хорошей точности численного моделирования и применимости такого анализа для конструирования пептидных блокаторов с заданными свойствами. В работе [59], где рассчитанное значение ΔG превышало измеренное более чем в 2 раза, это расхождение объяснено различиями в ионной силе растворов, использованных для расчетов и в эксперименте. Альтернативно причина расхождения может быть связана с меньшей точностью расчетов на основе силового поля OPLS-AA по сравнению с вариантами поля CHARMM (табл. 3).

Менее распространенный метод расчета свободной энергии – ММ-PBSA (molecular mechanics/Poisson-Boltzmann surface area), сочетает использование мо-

лекулярной механики для расчета потенциальной энергии молекул в вакууме и решение уравнения Пуассона–Больцмана для расчета свободной энергии сольватации. Метод реализован в программных пакетах AMBER [100] и GROMACS [101] и применительно к комплексам калиевых каналов с блокаторами качественно согласуется с экспериментальными данными [102].

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Моделирование комплексов K_v -каналов с природными и модифицированными пептидными блокаторами позволяет глубже понять структурные особенности и ключевые принципы межмолекулярных взаимодействий в них, детально описать интерфейсы взаимодействий, объяснить наблюдаемые интенсивность и спектр активностей блокаторов.

Моделирование по гомологии с использованием шаблонов мауротоксина (*табл. 1*) и KcsA позволило объяснить экспериментальные результаты по связыванию токсина P11 и его мутантов с каналом K_v 1.2 [86]. Выполнив молекулярный докинг, обнаружили важную роль основных остатков R5, R12, R28 и K31 пептида в стабилизации комплекса.

Аналогичный подход использован для определения интерфейса взаимодействия канала K_v 1.2 с кобатооксином (*табл. 1*) и его искусственным аналогом ACoTx1, отличающимся заменами T7P и D9Q [37]. Установили, что направление дипольного момента токсина не является определяющим для объяснения его селективности, и заключили, что молекулярное моделирование облегчает разработку более аффинных и/или селективных аналогов существующих блокаторов.

Сравнительный анализ результатов молекулярного докинга токсина Vm24 и ряда других токсинов позволил найти объяснение высокой селективности Vm24 в отношении канала K_v 1.3 [38]. Эта селективность, как полагают, связана с образованием плотных контактов N-конца Vm24 с каналом, что нехарактерно для других токсинов семейства α -КТх (*рис. 2*).

С использованием молекулярного докинга для предсказания структуры комплекса ShK с каналом K_v 1.3 и молекулярной динамики для оптимизации этой структуры обнаружены два вероятных положения блокатора в комплексе [55]. В первом случае СФ канала закрывался остатком K22 токсина, во втором – остатком R24. На основе расчета методом ММ-РBSA изменения ΔG при замене некоторых остатков в молекуле токсина на аланин и сопоставления расчетов с экспериментальными данными о константах диссоциации комплексов предпочтение было отдано второму варианту с участием R24.

Для исследования образования комплексов каналов с токсинами предложен метод анализа цикла мутаций (mutant cycle analysis), разработанный при картировании взаимодействий канала Shaker с аджитоксином [103]. Интуитивно понятно, что влияние одновременной замены остатка токсина и остатка канала на константу диссоциации комплекса зависит от того, взаимодействуют ли эти аминокислотные остатки, и может быть описано коэффициентом взаимосвязи. Учет экспериментальных данных о взаимодействующих остатках позволяет смоделировать структуру комплекса с помощью молекулярного докинга. По мере развития алгоритмов расчета ΔG метод анализа цикла мутаций находит все более широкое применение в молекулярном моделировании комплексов блокаторов с калиевыми каналами [55, 57, 95, 102, 104].

В ходе изучения взаимодействия мауротоксина с каналом K_v 1.2 [105] методами молекулярного докинга и МД были рассмотрены несколько возможных ориентаций токсина в комплексе. Расчеты методом ММ-РBSA изменений ΔG при введении аланиновых замен в сопоставлении с экспериментальными данными позволили установить наиболее вероятную ориентацию токсина и идентифицировать важные для формирования комплекса аминокислотные остатки токсина (K23, I25, Y32) и канала (R254, F359, R360, D379, V381, T383).

Изучение связывания блокатора ADWX-1 с каналами K_v 1.1 и K_v 1.3, поддержанное молекулярным моделированием структуры их комплексов [106], позволило предложить три варианта расположения поровых петель при взаимодействии с блокаторами: открытое, полуоткрытое (полузакрытое) и закрытое. В первом случае токсин взаимодействует лишь с остатками, окружающими СФ, и петли не влияют на связывание. Именно так, согласно [105], формируется комплекс мауротоксина с K_v 1.2. Во втором случае петли оказывают небольшое влияние на связывание, как, например, в комплексах ADWX-1 с каналами K_v 1.1 и K_v 1.3. В третьем случае и петли, и область вокруг СФ определяют интенсивность и селективность взаимодействия с токсином.

Показано [60], что электростатические взаимодействия в комплексах харибдотоксина, OSK1 и ShK с каналом K_v 1.3 преобладают над ван-дер-ваальсовыми, а ключевыми аминокислотными остатками токсинов в этих взаимодействиях являются лизин и аргинин: K27 и R25 у харибдотоксина, K27 и R24 – у OSK1, а также K22 и R11 – у ShK (*рис. 2*). Анализ энергии связывания, выполненный посредством расчета ПСС, дал значения, согласующиеся с экспериментальными данными (*табл. 3*). Высокая ресурсоемкость расчетов, необходимая для обеспе-

чения их точности, сдерживает широкое применение численного анализа энергии связывания и требует разработки более эффективных вычислительных процедур. Отметим, что отличия моделей комплексов ShK с $K_v1.3$, полученных в работах [55, 62], требуют проведения дополнительных исследований.

Применение МД для изучения конформационных изменений в гибридном канале KcsA- $K_v1.3$ при взаимодействии с калиотоксином [72] позволило построить структурную модель комплекса и выдвинуть гипотезу об участии в связывании токсина остатков Y78 и D80 канала, которое сопровождается изменением их ориентации. Эта гипотеза подтверждена данными спектроскопии ЯМР.

На раннем этапе изучения блокаторов калиевых каналов была выдвинута [107] и приобрела популярность гипотеза о том, что способность различных животных токсинов распознавать K_v -каналы связана с эволюционно-консервативной функциональной диадой, состоящей из лизина, взаимодействующего с СФ и отстоящего от него на 6–7 Å гидрофобного остатка (Tyr, Phe или Leu). В дальнейшем, в том числе и с применением методов молекулярного моделирования, показали, что избирательность связывания токсинов с различными K_v -каналами зависит от многих других аминокислотных остатков. Степень, в которой функциональная диада определяет силу взаимодействия, также варьирует у разных токсинов и модулируется вкладом в комплексобразование дополнительных аминокислотных остатков этих пептидов [108]. Результаты молекулярного моделирования позволяют заключить, что интерфейсы взаимодействия токсинов с каналами формируются сразу многими аминокислотами, создающими сложные системы связей. Эти системы существенно отличаются не только для пептидов из разных групп и подсемейств, но и токсинов с высокой гомологией.

Повышение селективности блокаторов K_v -каналов представляет актуальную задачу современной фармакологии, поскольку природные токсины зачастую имеют высокую аффинность сразу к нескольким типам каналов. Выявление достоверных отличий во взаимодействиях исследуемого токсина с родственными K_v -каналами, которое обеспечивают методы молекулярного моделирования, открывает возможность подбора аминокислотных замен, усиливающих или ослабляющих сродство токсина к заданному каналу.

Токсин Css20 характеризуется избирательностью связывания с каналами $K_v1.2$ и $K_v1.3$ по сравнению с $K_v1.1$ и $K_v1.4$ [58]. Моделирование структуры комплексов показало, что аминокислотные остатки каналов $K_v1.2$ и $K_v1.3$, контактирующие с Css20, со-

средоточены в основном вокруг СФ и в Р-петле (семь из восьми остатков, различающихся в рассматриваемых каналах). Установлено, что остаток K28 важен для связывания с $K_v1.2$ и $K_v1.3$, а остатки Q11, I30, K33 и Y37 образуют благоприятные контакты только с каналом $K_v1.2$. Показано, что дополнительные благоприятные контакты с $K_v1.2$ могут возникнуть при замене A19 и A20 токсина на положительно заряженные Arg или Lys. Предполагается, что введение подходящих мутаций позволит повысить селективность аналогов Css20 по отношению к одному из каналов $K_v1.2$ и $K_v1.3$.

Методику, включающую проведение расчетов МД и ПСС, применили к изучению взаимодействия OSK1 с каналами $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$ и подбору аминокислотных замен, способствующих увеличению селективности этого блокатора по отношению к $K_v1.3$ [65]. Сделан вывод, что замены K9S и S11R приведут к улучшению связывания с $K_v1.3$ при снижении связывания с $K_v1.1$ и $K_v1.2$. Расчеты констант связывания показали, что данные замены тысячекратно повышают селективность связывания пептида с каналом $K_v1.3$ и в 100 раз усиливают аффинность к этому каналу.

Сайт-направленный мутагенез использовали для создания высокоаффинного по отношению к каналу $K_v1.3$ токсина ADWX-1 путем введения замен G11R, I28T и D33N в токсин VmKTX [102]. Остатки, подлежащие замене, определяли, исходя из анализа пространственной структуры комплекса ADWX-1 с $K_v1.3$, полученной методами молекулярного моделирования. Расчеты энергии связывания ADWX-1 и ряда его мутантов (R23A, F24A, K26A, N29A, T35A) выявили важную роль положительно заряженных остатков в узнавании токсином канала $K_v1.3$. Кроме того, установлено, что замены R23A и F24A мешают взаимодействию ключевого остатка K26 с порой канала. Экспериментально измеренная аффинность ADWX-1 к $K_v1.3$ повысилась почти в 100 раз по сравнению с исходным VmKTx, а избирательность взаимодействия с каналом $K_v1.3$ усилилась в 340 и более чем 10^5 раз по сравнению с каналами $K_v1.1$ и $K_v1.2$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Более 30 масштабных исследований, проведенных с применением компьютерного моделирования, позволили существенно углубить наше понимание особенностей структуры калиевых каналов и их комплексов с токсинами. Вычислительные эксперименты обеспечили изучение механизмов взаимодействия и межмолекулярных контактов в комплексах пептидных блокаторов с K_v -каналами, создали основу для изучения молекулярных основ селективности и сродства токсинов к каналам, заложили базис

для направленной разработки блокаторов с заданными свойствами.

Наиболее распространенный алгоритм моделирования комплексов канал–блокатор включает моделирование структуры блокатора и канала по гомологии с уже существующими структурами, молекулярный докинг для предсказания структуры комплекса, а также проведение МД для релаксации структуры комплекса и расчет свободной энергии связывания методом ММ-PBSA или методом расчета ПСС. Конкретная реализация этого алгоритма, используемое программное обеспечение и параметры расчетов варьируют с учетом конкретных решаемых задач и индивидуальных предпочтений исследователей. Прослеживается общая тенденция в отказе от броуновской динамики при моделировании и переходе от моделей с неявным растворителем к явному учету растворителя, а также от расчета свободной энергии методом ММ-PBSA к расчетам ПСС.

Для успешного и быстрого расширения разработанных методов молекулярного моделирования на различные типы калиевых каналов желательно иметь структуры высокого разрешения представителей этих каналов и (или) их комплексов с блокаторами. В свою очередь, построение правильных моделей комплексов требует совершенствования силовых полей, дальнейшей разработки высокопроизводительных алгоритмов докинга и методов оценки свободной энергии образования комплексов.

С учетом важного биологического и медицинского значения калиевых каналов вычислительные методы будут все более востребованы, поддерживая, дополняя, а во многих случаях облегчая и даже заменяя сложные и дорогостоящие экспериментальные исследования. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00239).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wulff H., Zhorov B.S. // *Chem. Rev.* 2008. V. 108. № 5. P. 1744–1773.
- Haddy F.J., Vanhoutte P.M., Feletou M. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. V. 290. № 3. P. R546–R552.
- Tian C., Zhu R., Zhu L., Qiu T., Cao Z., Kang T. // *Chem. Biol. Drug Des.* 2014. V. 83. № 1. P. 1–26.
- Maljevic S., Lerche H. // *J. Neurol.* 2013. V. 260. № 9. P. 2201–2211.
- Castle N. // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2010. V. 20. № 11. P. 1471–1503.
- Huang X., Jan L.Y. // *J. Cell Biol.* 2014. V. 206. № 2. P. 151–162.
- Grizel A.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 23. P. 10–26.
- Shieh C.C., Coghlan M., Sullivan J.P., Gopalakrishnan M. // *Pharmacol. Rev.* 2000. V. 52. P. 557–594.
- Jan L.Y., Jan Y.N. // *J. Physiol.* 2012. V. 590(Pt 11). P. 2591–2599.
- Volkers L., Rook M.B., Das J.H., Verbeek N.E., Groenewegen W.A., van Kempen M.J., Lindhout D., Koeleman B.P. // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 462. № 1. P. 24–29.
- Angulo E., Noé V., Casadó V., Mallol J., Gomez-Isla T., Lluís C., Ferrer I., Ciudad C.J., Franco R.J. // *Neurochem.* 2004. V. 91. № 3. P. 547–557.
- Martin C.A., Matthews G.D., Huang C.L. // *Heart.* 2012. V. 98. № 7. P. 536–543.
- Giudicessi J.R., Ye D., Kritzerberger C.J., Nesterenko V.V., Tester D.J., Antzelevitch C., Ackerman M.J. // *Hum. Mutat.* 2012. V. 33. № 6. P. 989–997.
- Xu R., Cao M., Wu X., Wang X., Ruan L., Quan X., Lü C., He W., Zhang C. // *Clin. Immunol.* 2012. V. 142. № 2. P. 209–217.
- Chhabra S., Chang S.C., Nguyen H.M., Huq R., Tanner M.R., Londono L.M., Estrada R., Dhawan V., Chauhan S., Upadhyay S.K., et al. // *FASEB J.* 2014. V. 28. P. 3952–3964.
- Zhuang G.Q., Wu W., Liu F., Ma J.L., Luo Y.X., Xiao Z.X., Liu Y., Wang W., He Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 379. № 4. P. 812–816.
- Yu L., Sun C., Song D., Shen J., Xu N., Gunasekera A., Hajduk P.J., Olejniczak E.T. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. № 48. P. 15834–15841.
- Banerjee A., Lee A., Campbell E., Mackinnon R. // *Elife.* 2013. V. 2013. № 2. P. 1–22.
- Chi V., Pennington M.W., Norton R.S., Tarcha E.J., Londono L.M., Sims-Fahey B., Upadhyay S.K., Lakey J.T., Iadonato S., Wulff H., et al. // *Toxicon.* 2012. V. 59. № 4. P. 529–546.
- Gordon D., Chen R., Chung S.-H. // *Physiol. Rev.* 2013. V. 93. № 2. P. 767–802.
- Kuang Q., Purhonen P., Hebert H. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. V. 72. P. 3677–3693.
- MacKinnon R. // *FEBS Lett.* 2003. V. 555. № 1. P. 62–65.
- Bontems F., Gilquin B., Roumestand C., Ménez A., Toma F. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 34. P. 7756–7764.
- Renisio J.G., Lu Z., Blanc E., Jin W., Lewis J.H., Bornet O., Darbon H. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1999. V. 34. № 4. P. 417–426.
- Dauplais M., Gilquin B., Possani L.D., Gurrola-Briones G., Roumestand C., Ménez A. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 51. P. 16563–16573.
- Johnson B.A., Stevens S.P., Williamson J.M. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 50. P. 15061–15070.
- Pragl B., Koschak A., Trieb M., Obermair G., Kaufmann W.A., Gerster U., Blanc E., Hahn C., Prinz H., Schütz G., et al. // *Bioconjug. Chem.* 2002. V. 13. № 3. P. 416–425.
- Lange A., Becker S., Seidel K., Giller K., Pongs O., Baldus M. // *Angew. Chem. Int.* 2005. V. 44. № 14. P. 2089–2092.
- Krezel A.M., Kasibhatla C., Hidalgo P., MacKinnon R., Wagner G. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 8. P. 1478–1489.
- Renisio J.G., Romi-Lebrun R., Blanc E., Bornet O., Nakajima T., Darbon H. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2000. V. 38. № 1. P. 70–78.
- Jaravine V.A., Nolde D.E., Reibarkh M.J., Korolkova Y.V., Kozlov S.A., Pluzhnikov K.A., Grishin E.V., Arseniev A.S. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 6. P. 1223–1232.
- Carrega L., Mosbah A., Ferrat G., Beeton C., Andreotti N., Mansuelle P., Darbon H., De Waard M., Sabatier J.M. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2005. V. 61. № 4. P. 1010–1023.
- Blanc E., Sabatier J.M., Kharrat R., Meunier S., el Ayeub M., Van Rietschoten J., Darbon H. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1997. V. 29. № 3. P. 321–333.

34. Savarin P., Romi-Lebrun R., Zinn-Justin S., Lebrun B., Nakajima T., Gilquin B., Menez A. // *Protein Sci.* 1999. V. 8. № 12. P. 2672–2685.
35. Guijarro J.I., M'Barek S., Gómez-Lagunas F., Garnier D., Rochat H., Sabatier J.M., Possani L., Delepierre M. // *Protein Sci.* 2003. V. 12. № 9. P. 1844–1854.
36. Wu G., Li Y., Wei D., He F., Jiang S., Hu G., Wu H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 276. № 3. P. 1148–1154.
37. Jouirou B., Mosbah A., Visan V., Grissmer S., M'Barek S., Fajloun Z., van Rietschoten J., Devaux C., Rochat H., Lippens G., et al. // *Biochem. J.* 2004. V. 377. Pt 1. P. 37–49.
38. Gurrola G.B., Hernández-López R.A., Rodríguez de la Vega R.C., Varga Z., Batista C.V., Salas-Castillo S.P., Panyi G., del Río-Portilla F., Possani L.D. // *Biochemistry.* 2012. V. 51. № 19. P. 4049–4061.
39. Tudor J.E., Pállaghy P.K., Pennington M.W., Norton R.S. // *Nat. Struct. Biol.* 1996. V. 3. № 4. P. 317–320.
40. Berndt K.D., Güntert P., Wüthrich K. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. № 3. P. 735–750.
41. Romi-Lebrun R., Martin-Eauclaire M.F., Escoubas P., Wu F.Q., Lebrun B., Hisada M., Nakajima T. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 245. № 2. P. 457–464.
42. Zhu S., Peigneur S., Gao B., Luo L., Jin D., Zhao Y., Tytgat J. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2011. V. 10. № 2. P. M110.002832.
43. Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. // *Science.* 2005. V. 309. № 5736. P. 897–903.
44. Chen X., Wang Q., Ni F., Ma J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 25. P. 11352–11357.
45. Long S.B., Tao X., Campbell E.B., MacKinnon R. // *Nature.* 2007. V. 450. № 7168. P. 376–382.
46. Giorgetti A., Carloni P. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. V. 7. № 1. P. 150–156.
47. Cavasotto C.N., Phatak S.S. // *Drug Discovery Today.* 2009. V. 14. № 13–14. P. 676–683.
48. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410.
49. Pearson W.R. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 183. P. 63–98.
50. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., et al. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. № 21. P. 2947–2948.
51. Sali A., Blundell T.L. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. № 3. P. 779–815.
52. Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 13. P. 3381–3385.
53. Baker D., Sali A. // *Science.* 2001. V. 294. № 5540. P. 93–96.
54. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. // *Science.* 1998. V. 280. № 5360. P. 69–77.
55. Jin L., Wu Y. // *J. Chem. Inf. Model.* 2007. V. 47. № 5. P. 1967–1972.
56. Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. // *Nature.* 2003. V. 423. № 423(6935). P. 33–41.
57. Visan V., Fajloun Z., Sabatier J.M., Grissmer S. // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 66. № 5. P. 1103–1112.
58. Corzo G., Papp F., Varga Z., Barraza O., Espino-Solis P.G., Rodríguez de la Vega R.C., Gaspar R., Panyi G., Possani L.D. // *Biochem. Pharmacol.* 2008. V. 76. № 9. P. 1142–1154.
59. Khabiri M., Nikouee A., Cwiklik L., Grissmer S., Ettrich R. // *J. Phys. Chem. B.* 2011. V. 115. № 39. P. 11490–11500.
60. Chen R., Robinson A., Gordon D., Chung S.H. // *Biophys. J. Biophys. Soc.* 2011. V. 101. № 11. P. 2652–2660.
61. Chen R., Chung S.-H. // *Biophys. J. Biophys. Soc.* 2013. V. 105. № 8. P. 1829–1837.
62. Chen R., Chung S.-H. // *Toxins (Basel).* 2014. V. 6. № 7. P. 2149–2161.
63. Rashid M.H., Kuyucak S. // *J. Phys. Chem. B.* 2012. V. 116. № 16. P. 4812–4822.
64. Pennington M.W., Rashid M.H., Tajhya R.B., Beeton C., Kuyucak S., Norton R.S. // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. № 22. P. 3996–4001.
65. Chen R., Chung S.H. // *Biochemistry.* 2012. V. 51. № 9. P. 1976–1982.
66. Rashid M.H., Heinzelmann G., Huq R., Tajhya R.B., Chang S.C., Chhabra S., Pennington M.W., Beeton C., Norton R.S., Kuyucak S. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 11. P. e78712.
67. Rashid M.H., Huq R., Tanner M.R., Chhabra S., Khoo K.K., Estrada R., Dhawan V., Chauhan S., Pennington M.W., Beeton C., et al. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4509.
68. Rashid M.H., Kuyucak S. // *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. № 3. P. 707–716.
69. Chen P.C., Kuyucak S. // *Biophys. J. Biophys. Soc.* 2009. V. 96. № 7. P. 2577–2588.
70. Chen P.C., Kuyucak S. // *Biophys. J. Biophys. Soc.* 2011. V. 100. № 10. P. 2466–2474.
71. Kohl B., Rothenberg I., Ali S.A., Alam M., Seeböhm G., Kalbacher H., Voelter W., Stoll R. // *Toxicon.* 2015. V. 101. P. 70–78.
72. Zachariae U., Schneider R., Velisetty P., Lange A., Seeliger D., Wacker S.J., Karimi-Nejad Y., Vriend G., Becker S., Pongs O., et al. // *Structure.* 2008. V. 16. № 5. P. 747–754.
73. Legros C., Pollmann V., Knaus H.G., Farrell A.M., Darbon H., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F., Pongs O. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 22. P. 16918–16924.
74. Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Ignatova A.A., Korolkova Y.V., Grishin E.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. № 7. P. 2379–2389.
75. Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tytgat J., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 19. P. 12195–12209.
76. Turchenkov D.A., Bystrov V.S. // *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. № 31. P. 9119–9127.
77. Kurczynska M., Kotulska M. // *Acta Bioeng. Biomech.* 2014. V. 16. № 4. P. 107–116.
78. Cui M., Shen J., Briggs J.M., Luo X., Tan X., Jiang H., Chen K., Ji R. // *Biophys. J.* 2001. V. 80. № 4. P. 1659–1669.
79. Yu K., Fu W., Liu H., Luo X., Chen K.X., Ding J., Shen J., Jiang H. // *Biophys. J.* 2004. V. 86. № 6. P. 3542–3555.
80. Chung S.-H., Kuyucak S. // *Eur. Biophys. J.* 2002. V. 31. № 4. P. 283–293.
81. Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* 1998. V. 19. № 14. P. 1639–1662.
82. Gray J.J., Moughon S., Wang C., Schueler-Furman O., Kuhlman B., Rohl C.A., Baker D. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 331. № 1. P. 281–299.
83. Palma P.N., Krippahl L., Wampler J.E., Moura J.J. // *Proteins.* 2000. V. 39. № 4. P. 372–384.
84. Dominguez C., Boelens R., Bonvin A.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 7. P. 1731–1737.
85. Pierce B.G., Wiehe K., Hwang H., Kim B.H., Vreven T., Weng Z. // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 12. P. 1771–1773.
86. Mouhat S., Mosbah A., Visan V., Wulff H., Delepierre M., Darbon H., Grissmer S., De Waard M., Sabatier J.M. // *Biochem. J.* 2004. V. 377. Pt 1. P. 25–36.
87. Chen P.C., Kuyucak S. // *Toxins.* 2012. V. 4. № 2. P. 110–138.
88. Orozco M. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. № 14. P. 5051–5066.
89. Tang X., Koenig P.H., Larson R.G. // *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. № 14. P. 3864–3880.

90. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kalé L., Schulten K. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1781–1802.
91. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. // *J. Comput. Chem.* 1983. V. 4. № 2. P. 187–217.
92. Chen R., Chung S.H. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 10. P. 1–8.
93. Best R.B., Zhu X., Shim J., Lopes P.E., Mittal J., Feig M., Mackerell A.D. Jr. // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. V. 8. № 9. P. 3257–3273.
94. Bemporad D., Sands Z.A., Wee C.L., Grottesi A., Sansom M.S. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 39. P. 1844–1855.
95. Eriksson M.A.L., Roux B. // *Biophys. J.* 2002. V. 83. № 5. P. 2595–2609.
96. Wu Y., Cao Z., Yi H., Jiang D., Mao X., Liu H., Li W. // *Biophys. J.* 2004. V. 87. № 1. P. 105–112.
97. Almeida D.D., Torres T.M., Barbosa E.G., Lima J.P., de Freitas Fernandes-Pedrosa M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 430. № 1. P. 113–118.
98. Knight J.L., Brooks C.L. // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 30. № 11. P. 1692–1700.
99. Torrie G.M., Valleau J.P. // *J. Comput. Phys.* 1977. V. 23. № 2. P. 187–199.
100. Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2013. V. 3. № 2. P. 198–210.
101. Kumari R., Kumar R., Lynn A. // *J. Chem. Inf. Model.* 2014. V. 54. № 7. P. 1951–1962.
102. Han S., Yi H., Yin S.J., Chen Z.Y., Liu H., Cao Z.J., Wu Y.L., Li W.X. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 27. P. 19058–19065.
103. Hidalgo P., Mackinnon R. // *Science.* 1994. V. 268. № 5208. P. 307–310.
104. Jin L., Wu Y. // *J. Mol. Recognit.* 2011. V. 24. № 1. P. 101–107.
105. Yi H., Qiu S., Cao Z., Wu Y., Li W. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2008. V. 70. № 3. P. 844–854.
106. Yin S.J., Jiang L., Yi H., Han S., Yang D.W., Liu M.L., Liu H., Cao Z.J., Wu Y.L., Li W.X. // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. № 11. P. 4890–4897.
107. Dauplais M., Lecoq A., Song J., Cotton J., Jamin N., Gilquin B., Roumestand C., Vita C., de Medeiros C.L., Rowan E.G., et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 7. P. 4302–4309.
108. Mouhat S., De Waard M., Sabatier J.M. // *J. Pept. Sci.* 2005. V. 11. № 2. P. 65–68.

УДК 577.112

Белки системы врожденного иммунитета растений, осуществляющие транспорт липидов: структура, функции и практическое применение

Е. И. Финкина, Д. Н. Мельникова, И. В. Богданов, Т. В. Овчинникова*

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

*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 05.08.2015

Принята к печати 18.12.2015

РЕФЕРАТ Среди множества молекулярных факторов системы врожденного иммунитета растений особый интерес представляют небольшие белки, осуществляющие транспорт липидов и обладающие широким спектром биологической активности. Эти белки называют липид-переносчиками или липид-транспортирующими (ЛТБ). Можно выделить три основных аспекта, в контексте которых ЛТБ привлекают интерес исследователей. Первый из них – способность растительных ЛТБ связывать и переносить липиды, благодаря чему эти белки получили свое название и были объединены в один класс. Во-вторых, ЛТБ относятся к защитным белкам, являющихся факторами врожденного иммунитета растений. Кроме того, ЛТБ составляют один из наиболее клинически значимых классов растительных аллергенов. Цель настоящего обзора состоит в обобщении имеющихся данных о структуре, свойствах, функциях, механизмах действия и практическом применении ЛТБ для углубления понимания роли этих белков в физиологии растений и их значения в жизни человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллергены, антимикробная активность, защита растений, липид-транспортирующие белки растений, перекрестная реактивность, связывание и перенос липидов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЛТБ – липид-транспортирующие белки; ЖК – жирные кислоты; ФХ – фосфатидилхолины; ФИ – фосфатидилинозиты; ФГ – фосфатидилглицерин; PRP (Pathogenesis-Related Proteins) – белки, связанные с патогенезом; AMP (Antimicrobial Peptides) – антимикробные пептиды; PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) – ассоциированные с патогенами молекулярные структуры; DAMP (Damage Associated Molecular Patterns) – молекулярные структуры, ассоциированные с повреждением; ГФИ-якорь – гликозилфосфатидилинозитный якорь; АФК – активные формы кислорода; SAR (Systemic Acquired Resistance) – системная приобретенная резистентность; HR (Hypersensitive Response) – гиперчувствительный ответ; АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия.

ВВЕДЕНИЕ

Липиды и их производные принимают участие в самых разнообразных процессах, включая биогенез мембран, дифференцировку клеток, межклеточную и внутриклеточную передачу сигналов, образование водоотталкивающих и термоизоляционных покровов, защищающих растение от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды, а также выполняют запасающую и энергетическую функции. В клетках про- и эукариот важную роль в метаболизме липидов играют белки, осуществляющие их внутри- и внеклеточный транспорт. В растениях

обнаружено несколько классов белков, обладающих способностью связывать и транспортировать липиды и их производные: ацил-КоА-связывающие белки (Acyl-CoA-Binding Proteins), гликолипид-транспортирующие белки (Glycolipid Transfer Proteins), стерин-переносящие белки (Sterol Carrier Proteins), гомологи основного пыльцевого аллергена березы *Betula verrucosa*, зарегистрированного в базе данных аллергенов IUIS под аббревиатурой Bet v 1, белки, связывающие жирные кислоты (Fatty Acid Binding Proteins), пуриноидолины (Puroindolines) и липид-транспортирующие белки (Lipid Transfer Proteins).

Сравнительная характеристика двух подклассов растительных ЛТБ

Характеристика	ЛТБ1	ЛТБ2
M_r , кДа	9–10	6–7
Число аминокислотных остатков, а.о.	90–95	65–70
Консервативные а.о.	C, G, P, R, Y(F)	C, Q, P, Y(F)
Мотив $-C^VXC^{VI}-$	X – гидрофильный а.о. (как правило, N), экспонирован на поверхности молекулы белка	X – гидрофобный а.о. (чаще всего F), обращен внутрь молекулы белка
Организация дисульфидных связей	C^I-C^{VI} , $C^{II}-C^{III}$, $C^{IV}-C^{VII}$, C^V-C^{VIII}	C^I-C^V , $C^{II}-C^{III}$, $C^{IV}-C^{VII}$, $C^{VI}-C^{VIII}$
Пространственная структура	4 α -спирали, фрагмент 3_{10} -спирали и неструктурированный C-концевой фрагмент	3 α -спирали и область, содержащая одиночные повороты спирали
Форма гидрофобной впадины	Туннель с большим и малым входом, в его формировании принимают участие спирали H1, H2 и H3, расположенные параллельно друг другу	Трехгранный полый бокс, спирали H1 и H2 располагаются параллельно друг другу, а спираль H3 направлена под углом 90° относительно H2
Способность связывать стеринны	Нет	Есть
Взаимодействующие с лигандом а.о.	Arg44 и Tyr79 (нумерация для ЛТБ1 риса)	Phe36, Tyr45 и Tyr48 (нумерация для ЛТБ2 риса)
Сигнальный пептид, а.о.	21–27	27–35
Локализация	Органы, покрытые слоем кутина (листья, стебли, цветки)	Органы, покрытые слоем суберина (подземные органы)
Одна из предполагаемых функций	Биосинтез кутина	Биосинтез суберина
Активация иммунного ответа	Элиситоры в комплексе с жасмоновой кислотой	Элиситоры в комплексе со стеринном
Аллергены, зарегистрированные в IUIS	ЛТБ1 42 растений (не считая изоаллергенов и вариантов)	Sola l 6 томата, Api g 6 сельдерея, Arah 16 арахиса

Сопоставление аминокислотных последовательностей белков перечисленных классов выявило отсутствие значительной структурной гомологии между ними. Эти белки имеют внутри- или внеклеточную локализацию, относительно небольшую молекулярную массу (7–30 кДа), высокое значение изоэлектрической точки (pI ~9–11) и компактную структуру, стабилизированную дисульфидными связями. Для пространственной структуры белков, осуществляющих транспорт липидов, характерно наличие гидрофобной впадины, внутри которой располагается сайт связывания лигандов. Эти белки обратимо связывают липиды и доставляют их к месту назначения. Белки некоторых из перечисленных классов имеют высокоспецифичные лиганды, другие белки связывают и переносят широкий спектр липидов.

К функционально наиболее значимым классам белков растений, связывающих и переносящих липиды, относятся ЛТБ. Эти белки были открыты в 1970 г. и первоначально названы фосфолипид-обменивающими белками [1], а позднее переименованы в фосфолипид-транспортирующие белки [2]. Дальнейшие исследования показали, что лигандами данных белков могут быть не только фосфолипиды, но и другие гидрофобные молекулы, в связи с чем ЛТБ получили

свое нынешнее название – неспецифические липид-транспортирующие белки [3].

СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛТБ РАСТЕНИЙ

На основании особенностей структурной организации растительные ЛТБ подразделяются на два подкласса: ЛТБ1 с молекулярной массой 9–10 кДа и ЛТБ2 с молекулярной массой около 7 кДа (таблица). Гомология аминокислотных последовательностей у представителей двух подклассов не превышает 30% (рис. 1). Все ЛТБ являются основными белками (pI ~9–10). Подавляющее большинство ЛТБ содержат восемь консервативных остатков цистеина ($..C^I...C^{II}...C^{III}C^{IV}...C^VXC^{VI}...C^{VII}...C^{VIII}..$), образующих четыре дисульфидные связи, которые стабилизируют структуру и тем самым обуславливают устойчивость ЛТБ к действию высоких температур и протеолитических ферментов. Некоторые представители белков этого класса сохраняют нативную конформацию и биологическую активность даже после прогревания при температуре около 100°C [4]. Пространственная структура ЛТБ представлена в основном α -спиральными участками. Гидрофобные аминокислотные остатки ЛТБ обращены внутрь молекулы и не вступают в близкий контакт, формируя внутри белка впадину, содержащую по-

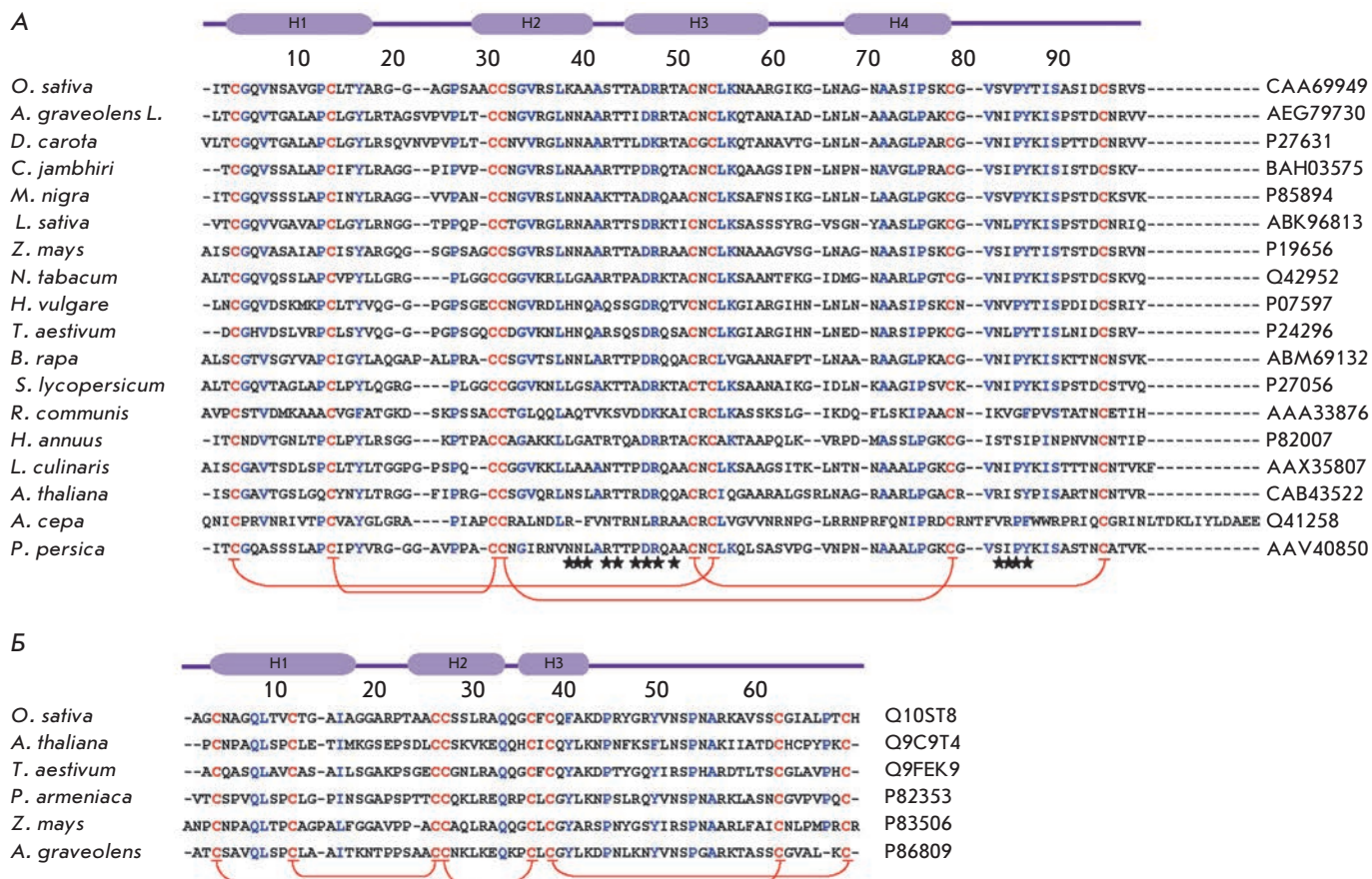


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей (А) ЛТБ1 и (Б) ЛТБ2. Красным цветом выделены консервативные остатки цистеина, синим – остатки, характерные для большинства представителей подкласса. Скобками показана организация дисульфидных связей. Сверху показано расположение α -спиралей в структурах ЛТБ1 (PDB ID: 1RZL) [5] и ЛТБ2 (PDB ID: 1L6H) [10] риса. Звездочками отмечены остатки, составляющие конформационные эпитопы Pru р 3 (GenBank: AAV40850) [98]

тенциальный сайт связывания гидрофобных и амфифильных молекул, таких, как липиды.

ЛТБ1 состоят из 90–95 аминокислотных остатков и имеют следующий порядок образования дисульфидных связей: C^I–C^{VI}, C^{II}–C^{III}, C^{IV}–C^{VII}, C^V–C^{VIII} (рис. 1А, 2А). Фрагмент –C^VXC^{VI}– в структуре ЛТБ1 содержит гидрофильную аминокислоту (чаще всего аспарагин), боковая группа которой экспонирована на поверхности молекулы. Пространственная структура этих белков сформирована четырьмя α -спиралями, фрагментом 3_{10} -спирали и протяженным неструктурированным С-концевым участком (рис. 2А) [5, 6]. В структуре некоторых ЛТБ1, например, выделенных из кукурузы (*Zea mays*) и табака (*Nicotiana tabacum*), спирали Н1 и Н4 разделены остатками пролина на два фрагмента (Н1а и Н1б, Н4а и Н4б соответственно). Гидрофобная впадина ЛТБ1 имеет форму вытянутого туннеля, в формировании которого принимают

участие спирали Н1, Н2 и Н3, расположенные параллельно друг другу. Гидрофобный характер поверхности туннеля обусловлен боковыми радикалами таких аминокислотных остатков, как Ile, Val, Leu, Ala, но наряду с этим в формировании впадины участвуют гидрофильные остатки Arg, Lys, Ser [7]. Туннель в молекулах белков ЛТБ1 имеет два входа, различающихся по размеру. У большинства ЛТБ1 около большого входа располагается основной остаток Arg44 (нумерация относительно ЛТБ1 риса *Oryza sativa*), который взаимодействует с полярными головками липидов [8]. У ЛТБ1 риса в этом взаимодействии принимает участие еще один основной остаток – Lys35. Кроме остатков цистеина в молекуле большинства ЛТБ1 присутствуют консервативные остатки глицина и пролина, обеспечивающие повороты между спиралями; два остатка тирозина, один из которых находится в N-концевой области на внешней стороне α -спирали,

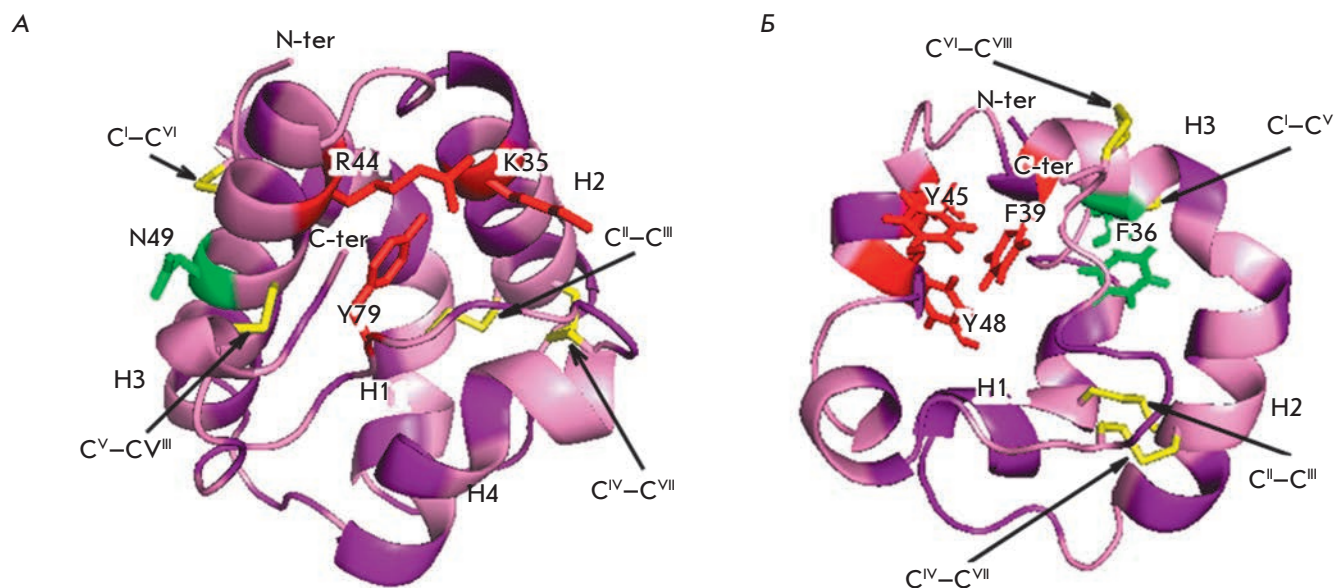


Рис. 2. Пространственные структуры (А) ЛТБ1 (PDB ID: 1RZL) и (Б) ЛТБ2 (PDB ID: 1L6H) из риса в ленточном представлении. Указаны номера α -спиралей (H1–H4). Фиолетовым цветом показаны гидрофобные остатки, красным – остатки, взаимодействующие с липидным лигандом [5, 10], желтым – дисульфидные связи, зеленым – остаток во фрагменте $-C^VXC^{VI}-$, обращенный наружу или внутрь молекулы белка

а второй расположен в С-концевой области у большого входа в гидрофобный туннель и участвует во взаимодействии с лигандами [7, 9].

ЛТБ2, состоящие из 65–70 аминокислотных остатков, изучены в меньшей степени, чем ЛТБ1. ЛТБ2 во фрагменте $-C^VXC^{VI}-$ в качестве центрального остатка чаще всего содержат фенилаланин, обращенный внутрь молекулы, и имеют иную организацию дисульфидных связей: C^I-C^V , $C^{II}-C^{III}$, $C^{IV}-C^{VII}$, $C^{VI}-C^{VIII}$ (рис. 1Б, 2Б) [10]. Пространственная структура белков этого подкласса включает три α -спирали и область, содержащую одиночные витки спирали (рис. 2Б). В структуре ЛТБ2 спирали H1 и H2 располагаются параллельно друг другу, а спираль H3 направлена под углом 90° относительно H2. Гидрофобная впадина ЛТБ2 по форме напоминает трехгранный полый бокс с расположенными внутри боковыми радикалами остатков Ala, Ile, Leu, Phe и Val. Трехгранный бокс ЛТБ2 по объему меньше гидрофобной полости ЛТБ1, однако его более выраженная пластичность позволяет белкам этого подкласса связывать крупные лиганды с жесткой структурой, например стеринны [10–12]. Боковые радикалы Phe39, Tyr45 и Tyr48 (нумерация относительно ЛТБ2 риса) повернуты внутрь полости и контактируют с липидным лигандом [13]. Помимо остатков цистеина в структуре ЛТБ2 присутствуют консервативные остатки Gln, Tyr и Pro.

Объем гидрофобной впадины у ЛТБ обоих подклассов может значительно изменяться. Например, размер гидрофобной впадины у ЛТБ1 риса равен 249 \AA^3 , однако при связывании белка с пальмитиновой кислотой ее объем увеличивается до 1354 \AA^3 . Такая пластичность молекул ЛТБ может быть причиной их низкой специфичности к липидному лиганду.

СВЯЗЫВАНИЕ И ТРАНСПОРТ ЛИПИДОВ

Наличие в структуре молекул ЛТБ гидрофобной впадины позволяет этим белкам связывать и переносить различные лиганды. Образование комплексов ЛТБ с лигандами *in vitro* зависит от размера гидрофобной полости и формирующих ее аминокислотных остатков, пространственной структуры лиганда, а также от условий эксперимента (рН, состав буфера, температура). Показано, что ЛТБ, выделенные из различных растительных источников, способны связывать липиды. Однако стоит отметить, что существуют и исключения из этого правила. Так, белок из семян лука (*Allium sepa*), названный Ace-AMP1, обладает выраженной гомологией с растительными ЛТБ, но не взаимодействует с липидами, возможно, из-за отсутствия единой полости внутри молекулы белка [14].

Различные ЛТБ связывают широкий спектр лигандов, включая жирные кислоты (ЖК) с длиной цепи $C_{10}-C_{18}$, ацильные производные коэнзима

А (КоА), фосфо- и галактолипиды, простагландин В₂, стерин, молекулы органических растворителей и некоторые лекарственные вещества [15, 16]. Хотя выраженной специфичности в отношении лигандов у ЛТБ нет, наиболее прочные комплексы эти белки образуют с ЖК, содержащими от 16 до 18 углеродных атомов. С молекулами, длина цепи которых превышает С₂₀, ЛТБ не образуют устойчивых комплексов из-за пространственных ограничений, налагаемых размерами гидрофобной впадины [17]. Кроме того, показано, что на прочность комплекса влияет количество двойных связей в молекулах ЖК и их конфигурация. Наиболее прочные комплексы ЛТБ образуют с различными непредельными ЖК с одной или двумя двойными связями в *cis*-конфигурации [18], две из которых – линолевая и олеиновая кислоты – являются предшественниками мономеров кутина и суберина.

ЛТБ₁, в отличие от ЛТБ₂, не связывают стерин. Установлено, что в зависимости от пространственной организации молекул ЛТБ₁ и лиганда ориентация последнего в гидрофобной впадине может быть различной. Например, в комплексах ЛТБ₁ кукурузы с 1-пальмитоиллизофосфатидилхолином [9] и ЛТБ₁ пшеницы (*Triticum aestivum*) с димиристоилфосфатидилглицерином [18] лиганды размещаются в полости белка в «прямой» ориентации, т.е. полярные головки липидов расположены вблизи большого входа в гидрофобную впадину. В то же время в комплексе ЛТБ₁ ячменя (*Hordeum vulgare*) с пальмитоил-КоА лиганд имеет «обратную» ориентацию, его алифатические цепи сильно изогнуты и полярная головка направлена в сторону меньшего входа впадины [19].

ЛТБ₁ растений могут связывать одну или две молекулы лизофосфолипида [20]. Предполагается, что ЛТБ этого подкласса взаимодействуют с лигандами согласно кооперативной модели связывания. Если в гидрофобной полости находятся две молекулы лиганда, то их ориентация и прочность связывания с белком не одинаковы. Так, в комплексе ЛТБ₁ пшеницы с лизомиристоилфосфатидилхолином две молекулы этого лиганда ориентированы в гидрофобной полости по принципу «голова к хвосту» [19, 21]. Высказывается предположение, что второй сайт связывания в ЛТБ активируется только тогда, когда первый уже занят лигандом.

Показано, что в регуляции связывания липидов растительными ЛТБ принимает участие кальций-кальмодулиновая система. Растительные ЛТБ связываются с кальмодулином вне зависимости от присутствия ионов кальция. Потенциальный сайт связывания кальмодулина с Zm-LTP кукурузы и Ase-AMP1 лука лежит в средней части полипептидной цепи ЛТБ (аминокислотные остатки

46–60) и имеет структуру, сходную с ВАА-доменом (Basic Amphiphilic α -helix) кальмодулин-связывающих белков [22]. Отличительной особенностью ВАА-подобного домена у растительных ЛТБ является отсутствие Trp, имеющего решающее значение для кальций-зависимого связывания кальмодулина. В присутствии кальмодулина у Zm-LTP кукурузы снижается способность связывать липиды, что объясняется локализацией в кальмодулин-связывающем центре этого белка остатка Arg46, участвующего в связывании липидов. В то же время сайт связывания кальмодулина у белка репы (*Brassica rapa*), названного BP-10, и ЛТБ₁ арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) находится в С-концевой области (аминокислотные остатки 69–81) и не имеет структурного сходства ни с одним из известных кальмодулин-связывающих центров [23]. Образование комплекса BP-10 с кальмодулином приводит к повышению эффективности связывания липидов. Причиной этого эффекта считается расположение в кальмодулин-связывающем центре данного ЛТБ остатка Tyr81, играющего важную роль во взаимодействии с липидным лигандом.

ЛТБ растений не только связывают липиды, но и осуществляют их перенос между мембранами в опытах *in vitro*. Они переносят фосфолипиды, например, фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилинозиты (ФИ), фосфатидилглицерины (ФГ) и их производные, а также ацил-КоА [24–26]. На примере ЛТБ пшеницы показано, что липид-транспортующая активность ЛТБ₂ в несколько раз выше, чем у ЛТБ₁ [27].

Механизм транспортировки липидов с участием ЛТБ до сих пор неизвестен. Предполагается, что растительные ЛТБ, так же как и фосфатидилхолин-специфичные ЛТБ млекопитающих, переносят липиды по челночному механизму. Комплекс ЛТБ–фосфолипид взаимодействует с мембраной, в результате чего происходит обмен фосфолипидами между комплексом и мембраной [3].

Прямые доказательства участия ЛТБ растений в связывании и переносе липидов *in vivo* до сих пор отсутствуют. Единственным комплексом ЛТБ с лигандом, обнаруженным в растительных клетках, является ковалентный аддукт LTP1 ячменя с оксипирином, образующийся при взаимодействии карбоксильной группы Asp7 с оксидом аллена в молекуле 9(*S*),10-эпокси-10,12(*Z*)-октадекадиеновой кислоты [28, 29]. В результате реакции образуется α -кетол – 9-гидрокси-10-оксо-12(*Z*)-октадеценная кислота. Необходимо отметить, что образование этого ковалентного комплекса, получившего название LTP1b, приводит к увеличению пластичности гидрофобной впадины белка и его способности переносить липиды.

Некоторые ЛТБ способны не только связывать и переносить липиды, но и разрушать модельные мембраны. В качестве примера можно привести белок подсолнечника (*Helianthus annuus*), названный Ha-AP10, который разрушает липосомы, состоящие из ФХ и ФГ [30]. Интересно отметить отсутствие корреляции между липид-связывающей и липид-переносающей активностью и способностью ЛТБ разрушать мембраны. Например, ЛТБ ячменя связывает широкий спектр липидов, однако слабо влияет на свойства модельных мембран [31]. Асе-AMP1 лука не связывает липиды, но нарушает целостность двухслойных везикул, состоящих из анионных липидов [14].

БИОСИНТЕЗ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ

Класс ЛТБ относится к большому семейству белков, связанных с патогенезом (Pathogenesis-Related Proteins, или PRP). Индукция синтеза данных белков происходит при воздействии на растение абиотических и биотических стрессорных факторов и лежит в основе одного из ключевых защитных механизмов, имеющихся в арсенале растений. PRP присутствуют во всех органах растений, накапливаются в вакуолях и апопласте, а также в первичной и вторичной клеточной стенке. Такая локализация согласуется с защитной функцией PRP, которые, наряду с антимикробными пептидами (AMP), создают своеобразный барьер на пути проникновения патогена [32].

Семейство белков, связанных с патогенезом, помимо ЛТБ (PRP-14), включает белки еще 16 классов: глюканазы (PRP-2), хитиназы (PRP-3,4,8), ингибиторы протеиназ (PRP-6), гомологи основного пыльцевого аллергена березы Bet v 1 (PRP-10), дефенсины (PRP-12), тионины (PRP-13) и др. [33]. Абиотическими индукторами синтеза PRP являются УФ-излучение, осмотический шок, дефицит влаги, низкие температуры, засоление почвы. Синтез PRP при инфицировании растения индуцируется как первичными, так и вторичными элиситорами – неспецифическими патоген-ассоциированными молекулярными структурами (Pathogen Associated Molecular Patterns, или PAMP), и структурами, ассоциированными с повреждением (Damage-Associated Molecular Patterns, или DAMP), а также специфическими эффекторными белками патогенов. Индукторами синтеза PRP являются такие фитогормоны, как этилен, ауксины, абсцизовая, жасмоновая и салициловая кислоты. На определенных стадиях онтогенеза активация синтеза и тканеспецифичная аккумуляция PRP происходят также в отсутствие факторов стресса [34].

ЛТБ обнаружены в различных органах растений – семенах, листьях, стеблях, корнях, цветках и плодах.

Чаще всего ЛТБ локализируются в покрытых кутикулой клетках эпидермиса, но обнаруживаются также в эмбриональных и сосудистых тканях. ЛТБ синтезируются в растительных клетках в виде пребелков, содержащих гидрофобную сигнальную последовательность (21–27 или 27–35 аминокислотных остатков у ЛТБ1 или ЛТБ2 соответственно), и являются секреторными белками с преимущественно внеклеточной локализацией [35, 36]. Некоторые ЛТБ имеют нехарактерную внутриклеточную локализацию. Так, ЛТБ из семян клещевины (*Ricinus communis*) обнаружен в глиоксисомах [37], ЛТБ из семян вигны (*Vigna unguiculata*) – в вакуолях [38], Са-LTP(1) из семян перца (*Capsicum annuum*) – в везикулах [39]. Особый интерес представляет вопрос о том, каким образом ЛТБ, синтезируемые в виде пребелков и не имеющие соответствующих сигнальных последовательностей, попадают в эти клеточные органеллы. Установлено, что ЛТБ подсолнечника Ha-AP10 изменяет свою локализацию. В покоящихся семенах Ha-AP10 находится в апопласте, но при набухании и прорастании семени, возможно, с помощью эндоцитоза, поступает внутрь клеток и переходит в органеллы, участвующие в метаболизме липидов [40].

В некоторых растениях обнаружены ЛТБ, названные LTPG (GPI-anchored Lipid Transfer Proteins), которые синтезируются в виде предшественников, содержащих помимо N-концевого сигнального пептида C-концевую сигнальную последовательность. Эта последовательность обеспечивает посттрансляционное присоединение к белку гликозилфосфатидилинозитного якоря (ГФИ), благодаря которому LTPG могут локализоваться на внешней стороне плазматической мембраны или секретироваться в апопласт после отщепления ГФИ-якоря [41]. Еще одну группу необычных ЛТБ, имеющих внеклеточную локализацию, составляют ксилоген из циннии (*Zinnia elegans*) и ксилоген-подобные белки других растений [42]. В структуре генов ксилоген-подобных белков, которые относятся к большому семейству арабиногалактановых белков (АГБ), присутствует сигнальный пептид, домен ЛТБ, несколько доменов АГБ и ГФИ-якорь. В процессе созревания эти белки претерпевают ряд посттрансляционных превращений, включая удаление N-концевого сигнального пептида, присоединение ГФИ-якоря, гидроксигирование остатков пролина и O-гликозилирование [42].

ЛТБ растений кодируются мультигенными семействами и в геноме растений, как правило, представлены набором генов, кодирующих различные изоформы. Экспрессия генов различных изоформ ЛТБ отличается ярко выраженной тканевой специфичностью и происходит на определенных стадиях онтогенеза [36]. Предполагается, что это связано

с тем, что разные изоформы ЛТБ выполняют различные функции [43]. Дифференциальная экспрессия генов множественных изоформ ЛТБ происходит также при воздействии на растение различных абиотических и биотических факторов окружающей среды и может рассматриваться как один из элементов защитной стратегии в условиях стресса [44]. Дифференциальная экспрессия генов изоформ показана на примерах ЛТБ кунжута (*Sesamum indicum*) [45], арабидопсиса [43, 46], перца [47], клещевины [37], винограда (*Vitis vinifera*) [48], тамарикса жестковолосистого (*Tamarix hispida*) [49] и томата (*Lycopersicon pennellii*) [50].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

ЛТБ, как уже упоминалось, составляют один из классов защитных PRP, многие из которых обладают антимикробной и ферментативной активностями или являются ингибиторами ферментов. Различные представители класса ЛТБ проявляют антибактериальную, противогрибковую, противовирусную, антипролиферативную активности, обладают способностью влиять на активность разнообразных ферментов [36].

Антимикробная активность

Многие ЛТБ обладают антимикробной активностью и ингибируют рост таких фитопатогенных бактерий и грибов, как *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas solanacearum*, *P. syringae*, *Alternaria brassicola*, *Ascochyta pisi*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* и др. ЛТБ из перца и кофе (*Coffea canephora*) активны также в отношении патогенных для человека штаммов грибов рода *Candida* [39, 51]. Антимикробное действие большинства растительных ЛТБ характеризуется специфичностью и проявляется в отношении определенного спектра микроорганизмов. Выраженной антимикробной активностью в микромолярных концентрациях обладают ЛТБ из лука [52], редиса (*Raphanus sativus*) [52] и арабидопсиса [53]. Основная же масса ЛТБ умеренно или слабо влияет на рост микроорганизмов, в некоторых случаях это влияние вообще отсутствует [54]. Антимикробная активность ЛТБ растений снижается в растворах с высокой концентрацией соли и в присутствии ионов кальция, что сближает данные белки с другими классами растительных АМР и PRP [52]. Как и растительные дефенсины, ЛТБ обладают способностью действовать в синергизме с тионинами [55], не оказывают токсического действия на растительные клетки и клетки млекопитающих, включая фибробласты и эритроциты [30, 52].

Разрушение дисульфидных связей, стабилизирующих структуру растительных ЛТБ, приводит к тому, что эти белки теряют способность ингибировать рост микроорганизмов и связывать липиды [56]. В то же время другие аминокислотные остатки, необходимые для проявления антимикробной активности, остаются неизвестными. Для LTP110 из риса показано, что для проявления антимикробной активности этого белка важны консервативные остатки Tyr17, Arg46 и Pro72, которые у большинства ЛТБ1 играют существенную роль в стабилизации структуры белка [57]. При изучении изоформ ЛТБ пшеницы показано, что отличие всего в один аминокислотный остаток (Pro3Ser в изоформах TaLt10B6 и TaLt710H24, Asn24Ser в TaLt10F9 и TaBs116G9) существенно влияет на антимикробную активность белков. Предполагается, что замена даже одного аминокислотного остатка может приводить к изменению пространственной структуры ЛТБ и влиять на распределение положительного заряда на поверхности его молекулы [56].

На сегодняшний день установлено, что антимикробная активность растительных ЛТБ не связана с их способностью взаимодействовать с липидами. Так, на примере восьми изоформ ЛТБ пшеницы показано отсутствие корреляции между способностью этих белков ингибировать рост патогенных микроорганизмов и связывать липиды [56]. На примере Ас-АМР1 лука [52] и мутантной изоформы ЛТБ риса [57] также показано, что белки данного класса могут обладать антимикробной активностью, но не связывать при этом молекулы липидов и наоборот.

Растительные ЛТБ оказывают не только фунгистатическое, но и фунгицидное действие и подобно другим АМР вызывают нарушение проницаемости модельных мембран [30] и цитоплазматических мембран фитопатогенных грибов [30, 56]. Так, ЛТБ лука [14], подсолнечника [30] и в меньшей степени ячменя [31] обладают способностью нарушать проницаемость липосом, состоящих только из анионных фосфолипидов или из смеси анионных и нейтральных фосфолипидов, вызывая утечку из них флуоресцентного красителя. Однако стоит отметить, что этот эффект выражен гораздо слабее, чем у других АМР растений, и наблюдается только в растворах с низкой ионной силой.

Механизм антимикробного действия представителей класса ЛТБ до сих пор неизвестен. Тем не менее возможной мишенью антимикробного действия ЛТБ считается цитоплазматическая мембрана. Предполагается, что растительные ЛТБ, как и другие катионные мембранотропные АМР, связываются посредством электростатических взаимодействий с цитоплазматической мембраной фитопатогена,

вызывая ее дестабилизацию и нарушение проницаемости. Ослаблением электростатического взаимодействия с клеточной мембраной фитопатогена объясняется менее выраженная антимикробная активность изоформ ЛТБ, содержащих меньше основных аминокислотных остатков [56]. Считается, что возможной причиной избирательной токсичности ЛТБ растений могут быть различия в липидном составе мембран клеток бактерий, грибов, растений и млекопитающих.

Противовирусная, антипролиферативная активность

Показано, что ЛТБ нарцисса (*Narcissus tazetta*) и капусты полевой (*Brassica campestris*), называемой также сурепицей, обладают противовирусной активностью и способностью ингибировать пролиферацию опухолевых клеток человека. ЛТБ нарцисса, обозначенный как NTP, в экспериментах *in vitro* значительно ингибировал образование бляшек респираторного синцитиального вируса (RSV) и цитопатический эффект вируса гриппа А (H1N1), а также пролиферацию линии клеток промиелоцитарного лейкоза человека (HL-60). ЛТБ капусты полевой подавлял активность обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1), а также пролиферацию клеток злокачественной гепатомы HepG2 и рака молочной железы MCF7. Механизм противоопухолевой активности ЛТБ пока не установлен [58, 59].

Ингибирование активности ферментов

Отдельные представители класса ЛТБ, как и ингибиторы протеаз (PRP-6), и некоторые дефенсины (PRP-12) [60, 61], обладают способностью подавлять активность протеолитических ферментов и α -амилаз. Так, обнаружено, что ЛТБ обоих подклассов из семян ячменя ингибируют активность цистеиновых эндопротеаз [62]. Также показано, что ЛТБ1 из семян гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba*) подавляет активность цистеиновой (папаин), аспартагной (пепсин) и сериновой (трипсин) протеаз [63]. ЛТБ1 из семян кофе и перца ингибируют активность α -амилазы человека [39, 51]. Как полагают, ЛТБ, способные ингибировать активность собственных и чужеродных ферментов, могут принимать участие как в развитии и прорастании семян, так и в защите растения от насекомых и травоядных животных.

ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ ЛТБ

Известно, что ЛТБ играют важную роль в растениях. Выключение генов, кодирующих данные белки, приводит к нарушению вегетативного и репродуктивного развития растений, снижению их устойчивости

к инфекциям [43, 64, 65]. На основании результатов исследований по подавлению экспрессии генов ЛТБ высказан ряд предположений о возможном участии представителей данного класса белков в адаптации растений к стрессу, метаболизме липидов, эмбриогенезе, росте и размножении растений, симбиозе и других процессах. Считается, что многие из этих функций обусловлены способностью ЛТБ связывать и переносить молекулы липидов (рис. 3).

Участие в метаболизме липидов

В связи с тем, что растительные ЛТБ обладают способностью связывать и переносить молекулы липидов, считается, что эти белки принимают участие в целом ряде процессов, сопровождающихся изменениями липидного состава. Для ЛТБ, имеющих внеклеточную локализацию, предполагается участие в формировании защитного слоя кутикулы, мономерные компоненты которой образуются в эпидермальных клетках и доставляются к месту биосинтеза. Активация биосинтеза кутикулы, которая играет важную роль в поддержании водного баланса и защите растений от проникновения патогенов, происходит в условиях действия разнообразных стрессорных факторов и является одним из защитных механизмов растений. Прямых доказательств причастности ЛТБ к этому процессу пока не найдено, однако показано, что растительные ЛТБ присутствуют в высоких концентрациях в эпидермальных тканях и способны связывать жирные кислоты, необходимые для синтеза кутина и суберина. Кроме того, индукция синтеза ЛТБ сопровождается утолщением слоя кутикулы [66], а выключение генов ЛТБ приводит к изменению липидного состава и плотности кутикулярного слоя [67]. Предложено два возможных механизма доставки компонентов кутикулы с участием ЛТБ. В соответствии с первым из них ЛТБ поступают в клетку посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, осуществляемого при слиянии везикул, содержащих ЛТБ и мономеры кутина. Второй механизм предполагает функционирование ЛТБ между плазматической мембраной и клеточной стенкой растения и существование молекулы-переносчика, действующего с внутренней стороны плазматической мембраны [68]. Интересен тот факт, что ЛТБ1 присутствуют в органах, покрытых слоем кутина (листья, стебли, цветки), в то время как ЛТБ2 обнаруживаются в покрытых суберином подземных органах. Это свидетельствует в пользу дифференциального участия белков первого и второго подклассов в формировании кутинового и суберинового слоев [35]. Показано также, что LTRG, имеющие ГФИ-якорь, возможно, принимают участие в биосинтезе и накоплении суберина [41].

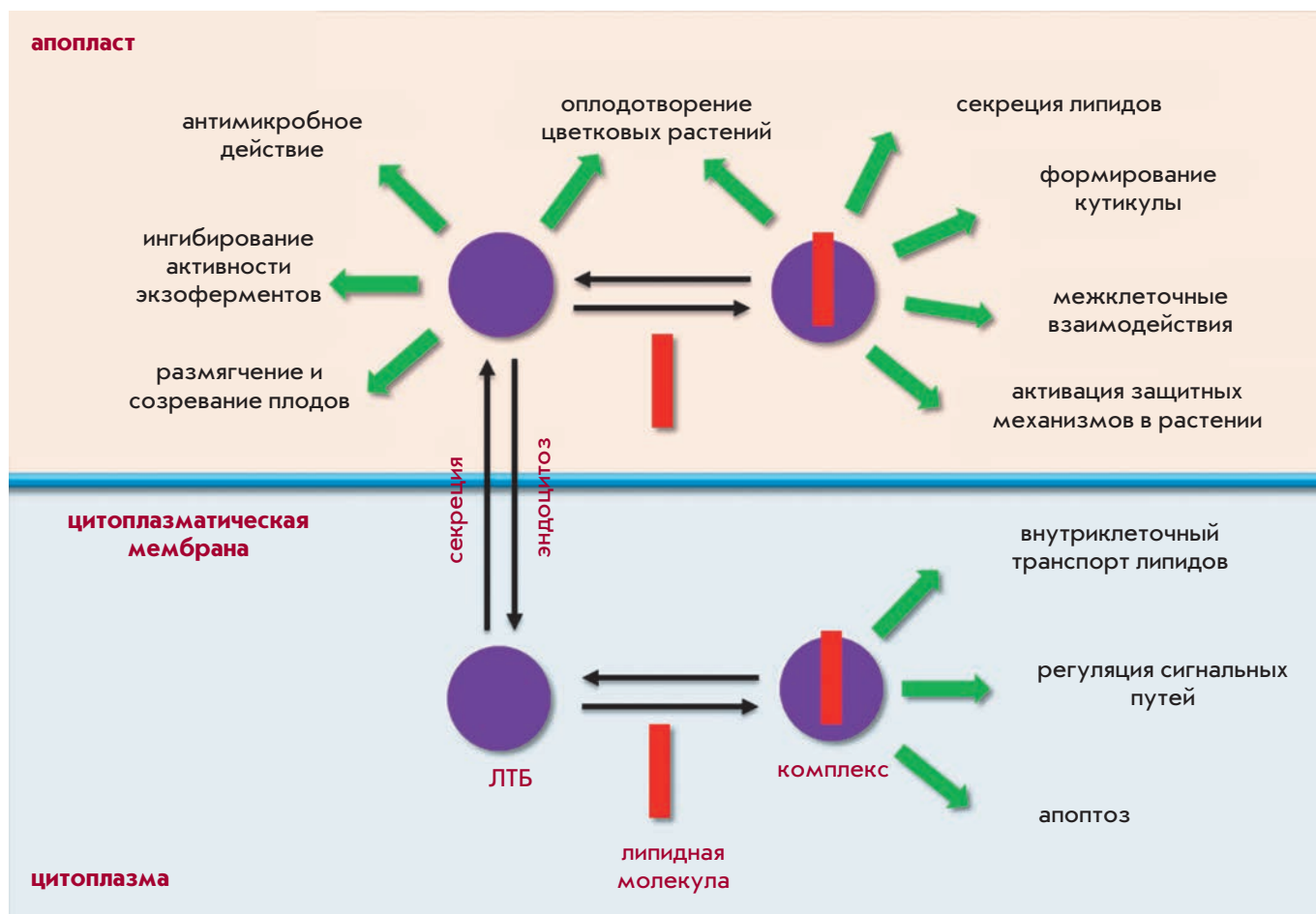


Рис. 3. Возможные функции ЛТБ в растениях

ЛТБ, обнаруженные в различных внутриклеточных органеллах, предположительно участвуют в мобилизации липидов, осуществляя их транспорт, например при прорастании семени. Так, ЛТБ клебсвиллы, обнаруженный в глиоксисомах, связывает ЖК как в свободной форме, так и в виде ацил-КоА. Этот белок увеличивает также активность ацил-КоА-оксидазы, которая участвует в реакции β-окисления ЖК [37]. Предполагается, что ЛТБ подсолнечника Na-AP10, поступающий в клетки при прорастании семян, переносит в глиоксисомы ЖК, высвободившиеся при расщеплении триацилглицеридов, для их дальнейшего β-окисления [40].

Показано, что индукция экспрессии генов, кодирующих ЛТБ моркови (*Daucus carota*), наблюдается на ранних стадиях эмбриогенеза, когда происходит разрушение одних и биосинтез других липидов, а также формирование защитного липидного слоя вокруг зародыша [69]. Роль этого белка в процессе эмбриогенеза предположительно заключается в уча-

стии в этих процессах посредством переноса соответствующих липидных молекул.

Участие в оплодотворении цветковых растений

Считается, что растительные ЛТБ играют важную роль в репродукции цветковых растений. Так, ЛТБ1 лилии (*Lilium longiflorum*) является компонентом, необходимым для адгезии пыльцы, формирования и роста пыльцевой трубки [70]. Предполагается, что ЛТБ1 может действовать непосредственно как адгезивный компонент либо как переносчик гидрофобного адгезивного компонента. Показано также, что одна из изоформ липид-транспортирующего белка арабидопсиса, ЛТР5, участвует в росте пыльцевой трубки и формировании семян [64].

Выявлена роль ЛТБ риса OsC6 в постмейотическом развитии пыльцы. Установлено, что данный белок присутствует в тканях пыльника и обладает способностью связывать ЖК. Полагают, что OsC6 участвует в формировании липидных орбикул

и пыльцевой экины, осуществляя перенос необходимых липидов из клеток тапетума к микроспорам [65].

Участие в защите и адаптации растений в условиях стресса

Утверждение, что ЛТБ участвуют в защите и адаптации растений к воздействию стрессорных факторов, основано, в основном, на повышении уровня синтеза этих белков. Так, синтез ЛТБ, как и других PRP, индуцируется при механическом повреждении, дефиците влаги, низких температурах, засолении почвы, инфицировании, а также при обработке растения химическими агентами [43, 45, 47, 50, 71, 72]. Индукция экспрессии генов ЛТБ в условиях стресса, возможно, связана с наличием в их промоторной области регуляторных элементов, характерных также для генов других PRP. В регуляции экспрессии генов ЛТБ участвуют такие фитогормоны, как абсцизовая и салициловая кислоты, этилен и метилжасмонат [36].

Считается, что одной из возможных причин индукции экспрессии генов ЛТБ в условиях стресса является вовлеченность этих белков в биосинтез кутикулярного слоя [50]. Защитная функция ЛТБ в растениях обусловлена их антимикробной активностью, криопротекторным действием и свойствами ингибиторов экзогенных ферментов, а также возможным участием в секреции других компонентов иммунной системы растений.

Железистые волоски (трихомы) растений вырабатывают эфирные масла, которые принимают участие в обмене веществ, защищают растение от вредителей, оказывают ранозаживляющее действие, служат для привлечения насекомых и предохраняют от перегревания. Обнаружено, что NtLTP1 табака (*N. tabacum*) специфически экспрессируется в длинных железистых волосках и участвует в секреции из головок трихом компонентов эфирных масел (дитерпенов, алифатических углеводов и ароматических кислот), которые являются защитными факторами растений [73]. Транскрипты генов ЛТБ обнаружены в железистых волосках и других растений, например, мяты (*Mentha piperita*), люцерны (*Medicago sativa*), полыни (*Artemisia annua*), хмеля (*Humulus lupulus*), шалфея (*Salvia fruticosa*) и томата [73].

Известно, что устойчивость растений к холоду связана со стабилизацией клеточных мембран и предотвращением снижения растворимости белков при понижении температуры. В листьях акклиматизированной к холоду капусты (*Brassica oleracea*) обнаружены белки класса WAX9, имеющие высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей с ЛТБ. Данные белки не обладают способностью связывать липиды, но подобно β -1,3-

глюканазам, осмотинам и лектинам, способны в условиях холода стабилизировать мембраны тилакоидов [72]. Предполагается, что механизм криопротекторного действия этих белков связан с уменьшением подвижности мембранных липидов и проницаемости бислоя при взаимодействии ЛТБ с мембраной тилакоидов [74].

Участие в активации и регуляции сигнальных каскадов

Предполагается, что ЛТБ, образуя комплексы с различными молекулами липидов, могут принимать участие в активации и регуляции различных сигнальных каскадов в растениях. Одним из классов сигнальных медиаторов растений являются оксипирины, которые образуются из ненасыщенных ЖК под действием активных форм кислорода (АФК) или ферментов и участвуют в регуляции роста и развития растения, а также в запуске ответных защитных реакций в условиях стресса. Помимо этого, оксипирины регулируют процессы обезвреживания токсичных компонентов, образующихся во время стресса. Как уже упоминалось, ЛТБ1 ячменя в процессе прорастания семян формирует ковалентные комплексы с оксипирином – 9(S),10-эпокси-10,12(Z)-октадекадиеновой кислотой, содержащей нестабильный алленоксид, образующийся в результате последовательного действия липоксигеназы и алленоксидсинтазы [28, 29]. Такое взаимодействие может свидетельствовать о совместном участии ЛТБ и оксипиринов в регуляции сигнальных путей, запускающих механизм предотвращения повреждения клеток растения в условиях стресса [29].

ЛТБ в комплексе с молекулами липидов действуют как эндогенные элиситоры, взаимодействующие со специфическими рецепторами на цитоплазматической мембране растительных клеток и обеспечивающие развитие иммунного ответа в условиях инфицирования (рис. 4). Так, показано, что ЛТБ риса и табака обладают способностью взаимодействовать с элиситиновыми рецепторами [21, 75, 76]. Элиситины – хорошо изученные РАМР растений, которые имеют молекулярную массу около 10 кДа и продуцируются фитопатогенными оомицетами (*Phytophthora* и *Pythium*), паразитирующими на высших растениях. Данные белки, благодаря наличию в их структуре гидрофобной впадины, обладают способностью связывать стеринны и обеспечивают фитопатогенные микроорганизмы необходимыми для их жизнедеятельности липидами, источником которых служат растения. Все элиситины имеют α -спиральную структуру, стабилизированную тремя дисульфидными связями, и в комплексе со стеринном распознаются растением посредством

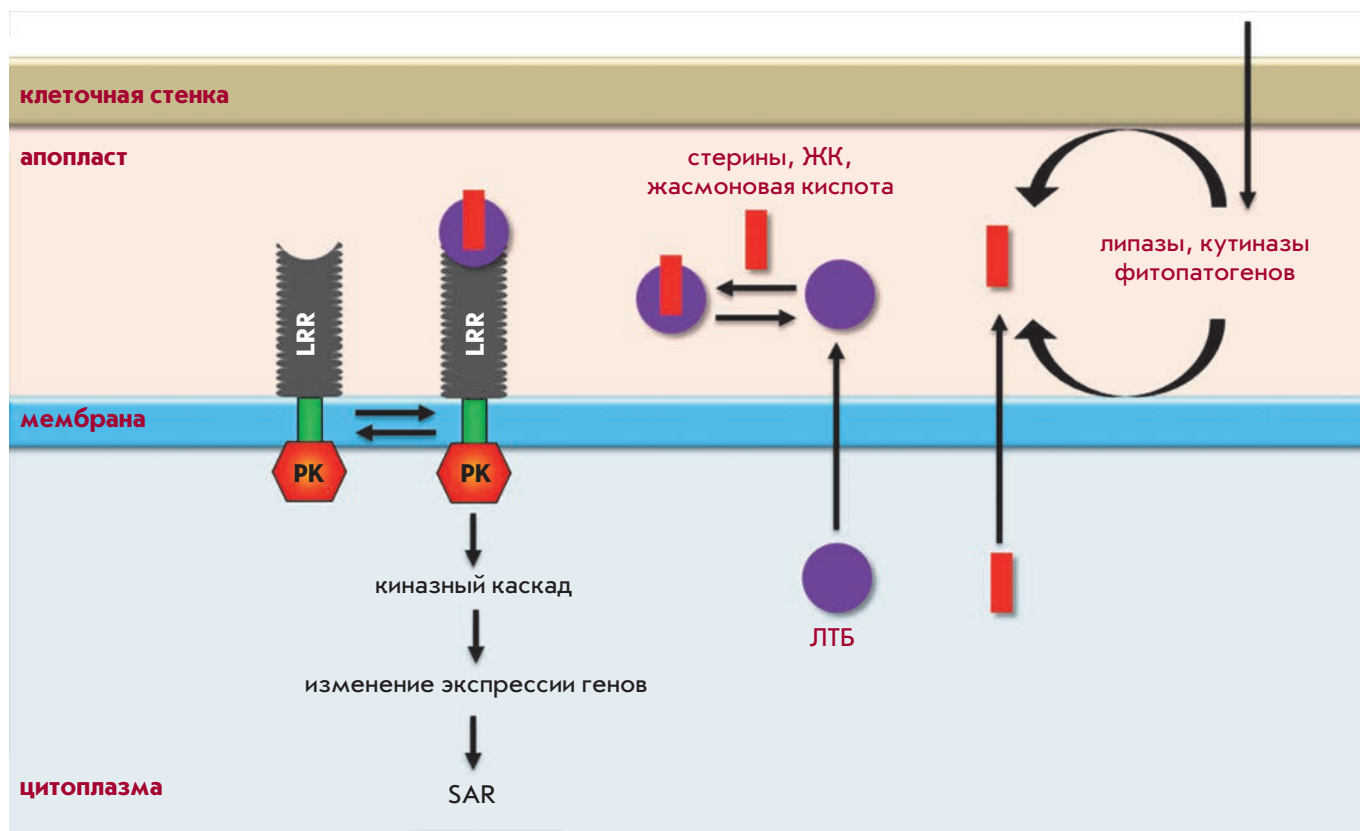


Рис. 4. Возможный механизм участия ЛТБ в активации иммунного ответа в растениях. ЛТБ секретируются в апопласт и связываются с молекулами липидов, которые так же секретируются растением, как, например, жасмоновая кислота, или образуются в результате действия ферментов, выделяемых фитопатогенными микроорганизмами. В комплексе с липидами ЛТБ взаимодействуют с расположенными на цитоплазматической мембране рецепторами, например, с рецептор-подобными серин-треониновыми протеинкиназами, которые содержат внеклеточный обогащенный лейциновыми повторами LRR-домен, а также трансмембранный и цитоплазматический протеинкиназный (ПК) домены. Результатом этого взаимодействия может быть передача сигнала, опосредованная универсальными вторичными мессенджерами и каскадом митоген-активируемых протеинкиназ, активация ряда транскрипционных факторов, индукция синтеза защитных факторов, в том числе AMP и PRP (возможно также и изоформ ЛТБ с выраженной антимикробной активностью), и, в конечном итоге, развитие SAR

рецептор-подобных киназ, расположенных на цитоплазматической мембране. В результате распознавания происходит активация в растениях защитных механизмов, таких, как образование фитоалексинов и АФК, развитие гиперчувствительного ответа (HR) и системной приобретенной резистентности (SAR) [77, 78]. Аминокислотные последовательности ЛТБ и элиситинов имеют низкую степень гомологии, тогда как пространственные структуры этих белков обладают выраженным сходством [79]. Растительные ЛТБ в комплексе с молекулой липида выступают в роли агонистов элиситинов и DAMP, связываются с рецепторами элиситинов и вызывают развитие иммунного ответа. Интересным фактом, говорящим о возможности существования различных путей ак-

тивации защитного ответа в растениях с участием представителей двух подклассов ЛТБ, является отличие в структуре гидрофобного лиганда, в роли которого для ЛТБ2 выступают молекулы стероидов [75], а для обладающих менее гибкой гидрофобной впадиной ЛТБ1 – жасмоновая кислота [21, 76].

Показано также, что необычный представитель ЛТБ2 из арабидопсиса, имеющий изоэлектрическую точку в кислой области pH и названный DIR1, играет ключевую роль в развитии SAR [80]. Предполагается, что данный белок в процессе инфицирования растения связывается с молекулами липидов (оксипинами, жирными кислотами или моноацильными фосфолипидами), которые образуются в результате работы секретируемых патогеном липаз, после чего

образованный комплекс взаимодействует с гипотетическим рецептором, запуская сигнальный каскад, приводящий к развитию SAR [81].

Установлено, что ксилоген из циннии, содержащий ГФИ-якорь и связывающий растительные стеринны, стимулирует превращение недифференцированных клеток в элементы трахеи и, возможно, участвует в межклеточных взаимодействиях и передаче сигнала. Предполагается, что ксилогено-подобные белки других растений, ЛТБ-домены которых имеют большее сходство с ЛТБ2, также могут участвовать в межклеточных взаимодействиях и передаче сигнала, функционируя в комплексе с липидной молекулой [42].

Участие в апоптозе

Предположение о возможном участии ЛТБ в апоптозе выдвинуто на основании сходства между ЛТБ кукурузы и проапоптотическим белком Bid млекопитающих, который тоже имеет в своей структуре внутреннюю впадину, связывает и переносит липиды [82]. Bid находится в цитозоле и в присутствии лизофосфолипидов, образующихся в процессе программируемой клеточной смерти, действует на митохондрии, вызывая высвобождение факторов индукции апоптоза, в том числе цитохрома с. ЛТБ кукурузы в присутствии лизофосфолипидов также вызывает высвобождение цитохрома с из митохондрий. В качестве возможного механизма дестабилизирующего действия обоих белков рассматривают перенос лизофосфолипидов на наружную мембрану митохондрий, которые изменяют ее свойства, облегчая тем самым действие других проапоптотических белков [83].

Участие в симбиозе

Известно, что симбиотические ризобактерии стимулируют рост растений и защищают их от почвенных фитопатогенов, вызывая развитие так называемой индуцированной системной резистентности, которая фенотипически и функционально сходна с SAR [84]. Показано, что ЛТБ MtN5 люцерны играет важную роль в развитии симбиотических отношений между растением и клубеньковыми бактериями, а именно, вовлечен в процессы проникновения бактерий в ткани корня и формирования клубеньков [85]. Предполагается, что функция MtN5 заключается в поддержании баланса между бактериальной инвазией и предотвращением развития инфекции [86].

Участие в созревании плодов

Показано, что ЛТБ томата способен образовывать комплексы с полигалактуроназой – ферментом, катализирующим расщепление пектина. Предполагается, что ЛТБ томата при образовании

комплекса повышает гидролитическую активность этого фермента и может участвовать в регуляции скорости размягчения и созревания плодов [87].

ЛТБ КАК АЛЛЕРГЕНЫ

ЛТБ являются антигенами, участвующими в развитии аллергических реакций различной степени тяжести на пыльцу, растительные продукты и латекс. Стабилизированная дисульфидными связями структура этих белков придает им повышенную устойчивость к расщеплению пищеварительными ферментами, позволяет достигать кишечника человека в нативной иммуногенной форме и вызывать сенсibilизацию организма [88]. Аллергизирующая способность ЛТБ в различных прошедших обработку пищевых продуктах (соках, джемах, пиве, вине и др.) объясняется их высокостабильной структурой, практически не подверженной тепловой денатурации, химической деградации и ферментативному расщеплению [89]. Необходимо отметить, что охарактеризованными аллергенами являются в основном представители первого подкласса растительных ЛТБ. Так, в настоящий момент в базе данных аллергенов IUIS зарегистрированы всего три ЛТБ2 (из томата, арахиса и сельдерея) и 42 ЛТБ1 из различных растений, не считая их изоформ. Высокая структурная гомология ЛТБ1 обуславливает развитие перекрестных аллергических реакций.

ЛТБ1, широко распространенные в царстве растений, являются основными аллергенами, выделенными из фруктов и ягод, – Pru p 3 персика (*Prunus persica*), Pru av 3 вишни (*P. avium*), Mal d 3 яблока (*Malus domestica*), Pru d 3 сливы (*P. domestica*), Cit s 3 апельсина (*Citrus sinensis*), Vit v 1 винограда, Fra a 3 клубники (*Fragaria ananassa*), орехов – Cor a 8 фундука (*Corylus avellana*), Jug r 3 грецкого ореха (*Juglans regia*), Ara h 9 арахиса (*Arachis hypogaea*), Cas s 8 каштана (*Castanea sativa*), овощей – Aspa o 1 салата-латука (*Asparagus officinalis*), Lec s 1 спаржи (*Lactuca sativa*), Bra o 3 капусты, Lyc e 3 томата (*Lycopersicon esculentum*), Api g 2 сельдерея (*Apium graveolens*), злаковых – Zea m 14 кукурузы, Ory s 14 риса, Tri a 14 пшеницы, Hor v 14 ячменя и бобовых культур Len c 3 чечевицы, Pha v 3 фасоли [90–92]. Важно отметить, что ЛТБ накапливаются в основном в коже плодов, а не в их мякоти [93], что может быть причиной развития анафилактических реакций при кожном контакте человека с плодами [94]. Существенный вклад в первичную сенсibilизацию вносят и пыльцевые аллергены класса ЛТБ (Par j 2 постенницы иудейской (*Parietaria judaica*), Ole e 7 оливкового дерева (*Olea europaea*), Pla a 3 платана (*Platanus acerifolia*), Art v 3 полыни (*Artemisia vulgaris*) и др.) [95]. Интересно, что ЛТБ из плодов растений

семейства *Rosaceae* обнаружены также и в пыльце этих деревьев [96]. Главный аллерген класса ЛТБ, который играет основную роль в сенсibilизации и распознается иммуноглобулином E (IgE) большинства индивидов с аллергией, считается Pru p 3 персика [97, 98].

В последние годы проведены многочисленные исследования, направленные на выяснение причин высокой аллергенности растительных ЛТБ1 и развития вызываемых ими перекрестных аллергических реакций. Так, определены В-клеточные эпитопы Pru p 3, которые представляют собой расположенные на поверхности молекулы белка положительно заряженные участки, соответствующие аминокислотным остаткам 11–25, 31–45 и 71–80 (рис. 1А) [99]. Выявленные антигенные детерминанты имеют высокую степень гомологии у различных аллергенных ЛТБ1. Установлено, что решающую роль во взаимодействии Pru p 3 с IgE играют характерные для большинства аллергенных ЛТБ1 остатки Arg39, Thr40 и Arg44 [100]. В роли Т-клеточного эпитопа Pru p 3 выступает участок полипептидной цепи, соответствующий аминокислотным остаткам 61–80 [101]. Также показано, что развитие Т-клеточного ответа на Pru p 3 сопровождается увеличением экспрессии интегрина $\alpha 4\beta 7$, обеспечивающего миграцию лимфоцитов в стенку кишечника, где происходит их первичная активация [102].

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОВ

Гены ЛТБ повсеместно присутствуют в геномах высших растений – от наиболее примитивных мохообразных до сосудистых, включая папоротникообразные, плауновидные, покрытосеменные и голосеменные, но не обнаружены в таких низших растениях, как водоросли. В связи с этим высказывается предположение о том, что ЛТБ, принимающие участие в защите растений от воздействия разнообразных стрессорных факторов окружающей среды, могли появиться в период выхода растений на сушу, т.е. около 400 млн лет тому назад [103].

Как упоминалось выше, ЛТБ одного растения кодируются обычно десятками родственных генов, образующих мультигенное семейство. Считается, что появление в процессе эволюции множественных изоформ ЛТБ, выполняющих различные функции в растениях, связано с рядом последовательных дубликаций гена-предшественника и последующих мутаций [104]. Известно, что большинство покрытосеменных подверглись в процессе эволюции одному или нескольким удвоениям целого генома. Филогенетический анализ множественных изоформ ЛТБ риса, арабидопсиса и пшеницы свидетельствует о том, что процесс дубликации генов и фрагментов

хромосом продолжается и в настоящее время [105]. Мутации в дублированных генах ЛТБ в процессе эволюции могли приводить к псевдогенизации гена, субфункционализации с сохранением части функций гена-предшественника или неофункционализации, т.е. приобретению геном совершенно новых функций [106]. Последние два варианта могли привести к появлению новых изоформ ЛТБ, обладающих иным спектром и степенью выраженности биологической активности, а также ЛТБ-подобных белков, значительно отличающихся от представителей класса ЛТБ по структуре и выполняющих другие функции.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ЛТБ как переносчики лекарственных средств

Способность ЛТБ связывать и переносить липиды создает предпосылки для их возможного применения в качестве лиганд-связывающих белков для создания систем доставки лекарственных и косметических средств с целью защиты от преждевременной биодеградации или снижения побочных эффектов при системном применении. Возможность создания систем доставки на основе ЛТБ определяется рядом их свойств: а) устойчивостью к тепловой денатурации и действию протеаз; б) гидрофильной поверхностью, обеспечивающей биосовместимость комплекса с лигандом и снижение риска развития побочных реакций; в) защитой лекарственного вещества, расположенного внутри гидрофобной полости ЛТБ, от преждевременной биодеградации; г) небольшим размером комплекса с лигандом, обеспечивающим его эффективное проникновение в ткани; д) увеличением аффинности и специфичности при образовании комплексов ЛТБ с лигандами, которое может быть достигнуто посредством модификации аминокислотной последовательности белка.

В ряде работ показано, что растительные ЛТБ образуют комплексы не только с ЖК и фосфолипидами, но и с другими гидрофобными и амфифильными лигандами, включая некоторые лекарственные вещества. Так, ЛТБ1 пшеницы образует комплексы с простагландином В2 (PGB2). Установлено, что при взаимодействии с ЛТБ1 PGB2 полностью погружается в гидрофобную полость белка, оказываясь при этом изолированным от окружающей среды [17]. Показано, что ЛТБ1 пшеницы связывает некоторые компоненты липидного слоя кожи (сфингозины, сфингомиелины и цереброзиды), которые входят в состав косметических средств. Таким образом, ЛТБ1 пшеницы может быть использован в косметологии как средство доставки эпидермальных липидов. С другой стороны, ЛТБ1 пшеницы способен связывать лекарственные средства, которые актив-

ны в отношении возбудителей лейшманиоза и HIV-1, а также обладают антинеопластическими свойствами, но имеют серьезные побочные эффекты при системном применении (например, эделфозин, илмофозин и их аналоги). Использование ЛТБ1 пшеницы в качестве средства доставки может значительно снизить токсичность этих препаратов. Кроме того, ЛТБ1 пшеницы способен осуществлять доставку таких противогрибковых средств, как коназол BD56 и амфотерицин В [16]. Следует отметить, что белок связывает все перечисленные соединения с низкой аффинностью, что является обязательным условием транспорта и контролируемого высвобождения лиганда.

В результате скрининга с использованием библиотеки СМС (Comprehensive Medicinal Chemistry), содержащей информацию о ~7300 биологически активных соединениях, показано, что ЛТБ1 кукурузы и ЛТБ2 риса содержат не один, а два потенциальных центра связывания лекарственных веществ – один в гидрофобной полости, второй – на гидрофильной поверхности молекулы белка. У ЛТБ2 риса вблизи гидрофобной полости располагается центр связывания стероидов, например β -ситостерина или холестерина, а на поверхности белка вблизи С-концевого участка находится область связывания трифенилметановых производных, например дифенил(пиридил-4)-метана [15].

ЛТБ в пищевой промышленности

Поверхностно-активные свойства ЛТБ растений делают возможным их применение в пищевой промышленности в качестве стабилизаторов пен и эмульсий. Пивоварение – одна из отраслей пищевой промышленности, где широко используются эти свойства ЛТБ. Известно, что образование и стабильность пены являются важными показателями качества пива. В многочисленных работах показано, что ЛТБ являются основными белковыми компонентами ячменного пива и играют ключевую роль в формировании и стабилизации пивной пены [35, 75]. В число основных белковых компонентов пива входит ЛТР1 ячменя, который связывает липиды и тем самым снижает их негативное влияние на формирование и стабильность пены. В процессе пивоварения происходит гликозилирование и ацилирование ЛТР1, что увеличивает амфифильность и поверхностно-активные свойства этого белка [75]. При ферментации происходит образование ЛТР1b – ковалентного комплекса этого белка с 9(S),10-эпокси-10,12(Z)-октадекадиеновой кислотой, о котором упоминалось выше [107]. ЛТР1 и ЛТР1b устойчивы к действию высоких температур, и в процессе нагревания при пастеризации

пива сохраняют свою структуру и способность взаимодействовать с липидами. Необходимо отметить, что ЛТР1, в отличие от ЛТР1b, обладает противогрибковой активностью, ингибирует рост дрожжей и тем самым может негативно влиять на процесс ферментации, поэтому образование ЛТР1b и установление равновесия между содержанием в пиве свободной и связанной с липидом форм ЛТР1 важны для получения ячменного пива высокого качества.

Создание жизнестойких трансгенных растений

Большой интерес представляет возможность использования ЛТБ для создания трансгенных растений, устойчивых к действию разнообразных абиотических и биотических стрессорных факторов. Трансгенные растения, несущие гены ЛТБ, обладают повышенной устойчивостью к фитопатогенным микроорганизмам [108], поражению вредителями [73], действию высоких температур [109], засолению почвы [108], засухе [110] и др.

ЛТБ в аллергологии

Еще одно перспективное направление применения природных и рекомбинантных ЛТБ растений – создание на их основе современных тест-систем для компонентной аллергодиагностики и вакцин, предназначенных для превентивной аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ).

К основным способам диагностики аллергии относятся кожные аллергопробы, провокационные и элиминационные тесты, а также иммуноферментный или иммунофлуоресцентный анализ, направленный на оценку общего уровня и выявление специфических антител классов IgE и IgG. При проведении аллергодиагностики традиционно используются неочищенные экстракты аллергенов, дающие плохо воспроизводимые, а иногда ложные результаты из-за отсутствия реальной возможности их стандартизации, а также колебаний содержания в них аллергенных белков и небелковых компонентов. Современное направление развития аллергодиагностики основано на замене суммарных экстрактов на индивидуальные белковые аллергокомпоненты, которые могут быть использованы для составления молекулярного профиля чувствительности пациента и изучения перекрестной реактивности аллергенов [111]. В современных тест-системах в формате микрочипов, предназначенных для компонент-разрешающей диагностики, на сегодняшний день уже используются несколько природных и рекомбинантных пыльцевых (Art v 3 полыни, Pla a 3 платана, Par j 2 постенницы и Ole e 7 маслины) и пищевых (Pru p 3 персика, Cor a 8 фундука, Jug r 3 грецкого ореха, Ara h 9 арахиса и Tri a 14 пшеницы) аллергенных ЛТБ.

Современный метод снижения реактивности организма – аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), при которой пациенту вводятся постепенно повышающиеся дозы аллергена [112]. Однако традиционно при АСИТ используют неочищенные экстракты или аллергоиды, которые характеризуются низкой эффективностью и высоким риском развития системных аллергических реакций. Наиболее безопасное и перспективное направление АСИТ предполагает разработку и создание вакцин на основе индивидуальных природных и рекомбинантных аллергенов, а также их гипоаллергенных аналогов. Эти аналоги должны обладать низкой аллергенностью, но достаточно высокой иммуногенностью, чтобы не вызывать побочных аллергических реакций и надолго снижать гиперчувствительность организма [113]. Гипоаллергенные формы создаются в основном с помощью методов рационального дизайна и сайт-направленного мутагенеза путем замены аминокислотных остатков, входящих в состав В-клеточных эпитопов. На сегодняшний день несколько гипоаллергенных аналогов основных пыльцевых и пищевых аллергенов различных классов проходят клинические испытания в качестве лекарственных препаратов для проведения АСИТ [114]. К настоящему времени получены гипоаллергенные формы ряда растительных ЛТБ, например, Par j 2 постенницы [115] и Pru p 3 персика [116], но среди препаратов, проходящих клинические испытания, пока отсутствуют вакцины на основе гипоаллергенных форм растительных ЛТБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЛТБ широко распространены в царстве растений, присутствуют практически во всех растительных органах и тканях, имеют внутри- или внеклеточную локализацию и играют важную физиологическую роль. ЛТБ, кодируемые мультигенным семейством, в растениях представлены набором множественных изоформ, дифференциально экспрессирующихся в различных органах и тканях в условиях воздействия различных стрессогенных факторов окружающей среды. Помимо этого, в растениях обнаружены разнообразные ЛТБ-подобные белки, которые имеют сильно отличающуюся структуру и функциональную

активность. Предполагается, что появление в ходе эволюции множественных изоформ ЛТБ и ЛТБ-подобных белков обусловлено необходимостью расширения спектра функций, выполняемых этими белками.

Биологическая роль ЛТБ в растениях изучена не до конца. Показано, что ЛТБ принимают участие во многих процессах, что, вероятно, во многом обусловлено их способностью связывать и переносить разнообразные молекулы липидов.

Достоверно установлено, что ЛТБ относятся к молекулярным факторам системы врожденного иммунитета растений. Являясь компонентами семейства PRP – белков, связанных с патогенезом, ЛТБ принадлежат к защитной системе растений, позволяющей им быстро адаптироваться и выживать в условиях стресса. Защитная функция ЛТБ обусловлена их антимикробной активностью и способностью ингибировать чужеродные ферменты, участием в переносе сигнальных медиаторов, защитных и строительных липидов, а также свойствами эндогенных элиситоров, которые в комплексе с молекулой липида распознаются специфическими рецепторами и запускают иммунный ответ.

ЛТБ играют важную роль в жизни человека. Широкое распространение и сходная пространственная организация делают эти белки одним из важнейших классов перекрестных растительных аллергенов, являющихся частой причиной развития аллергических реакций различной степени тяжести. Поверхностно-активные и аллергенные свойства, а также способность ЛТБ связывать и переносить гидрофобные лиганды делают возможным применение этих белков в фармации для конструирования систем доставки лекарственных и косметических средств, в аллергологии для создания современных диагностических тест-систем и препаратов для аллерговакцинации, в пищевой промышленности для производства высококачественных сортов пива и в сельском хозяйстве для получения растений, устойчивых к стрессу. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда
(проект № 14-50-00131).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdelkader A.B., Mazliak P. // Eur. J. Biochem. 1970. V. 15. P. 250–262.
2. Vergnolle C., Arondel V., Jolliot A., Kader J. // Methods Enzymol. 1992. V. 209. P. 522–530.
3. Kader J.-C. // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 1996. V. 47. P. 627–654.
4. Perrocheau L., Bakan B., Boivin P., Marion D. // J. Agricult. Food Chem. 2006. V. 54. № 8. P. 3108–3113.
5. Lee J.Y., Min K., Cha H., Hwang D.H.S.K.Y., Suh S.W. // J. Mol. Biol. 1998. V. 276. P. 437–448.
6. Gizatullina A.K., Finkina E.I., Mineev K.S., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Telezhinskaya I.N., Balandin S.V., Shenkarev Z.O., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013. V. 439. № 4. P. 427–432.
7. Simorre J., Caille A., Dominique M., Didier M., Ptak M. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 11600–11608.
8. Yeasts T.H., Rose J.K.C. // Protein Sci. 2007. V. 17. P. 191–198.

9. Gomar J., Petit M.-C., Sodano P., Sy D., Marion D., Kader J.-C., Vovelle F., Ptak M. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. № 4. P. 565–577.
10. Samuel D., Liu Y.J., Cheng C.S., Lyu P.C. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 35267–35273.
11. Hoh F., Pons J.L., Gautier M.F., de Lamotte F., Dumas C. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2005. V. 61. P. 397–406.
12. Pons J.L., de Lamotte F., Gautier M.F., Delsuc M.A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 14249–14256.
13. Cheng C.S., Chen M.N., Lai Y.T., Chen T., Lin K.F., Liu Y.J., Lyu P.C. // *Proteins.* 2008. V. 70. № 3. P. 695–706.
14. Tassin S., Broekaert W.F., Marion D., Acland D.P., Ptak M., Vovelle F., Sodano P. // *Biochem.* 1998. V. 37. P. 3623–3637.
15. Cheng C.S., Chen M.N., Liu Y.J., Huang L.Y., Lin K.F., Lyu P.C. // *Enzyme Microb. Technol.* 2004. V. 35. P. 532–539.
16. Pato C., Borgne M., Baut G., Papec P., Marion D., Douliez J.-P. // *Biochem. Pharmacol.* 2001. V. 62. P. 555–560.
17. Tassin-Moindrot S., Caille A., Douliez J.P., Marion D., Vovelle F. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 1117–1124.
18. Douliez J.-P., Michon T., Marion D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1467. P. 65–72.
19. Charvolin D., Douliez J.-P., Marion D., Cohen-Addad C., Pebay-Peyroula E. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 264. P. 562–568.
20. Cheng H., Cheng P., Peng P., Lyu P., Sun Y. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. P. 2304–2315.
21. Buhot N., Gomès E., Milat M.L., Ponchet M., Marion D., Lequeu J., Delrot S., Coutos-Thévenot P., Blein J.P. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. № 11. P. 5047–5052.
22. Li C., Xie W., Bai W., Li Z., Zhao Y., Liu H. // *FEBS J.* 2008. V. 275. № 21. P. 5298–5308.
23. Wang Z., Xie W., Chi F., Li C. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 7. P. 1683–1687.
24. Guerbette F., Grosbois M., Jolliot-Croquin A. // *Mol. Cell. Biochem.* 1999. V. 192. P. 157–161.
25. Guerbette F., Grosbois M., Jolliot-Croquin A., Kader J.-C., Zachowski A. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 14131–14137.
26. Ostergaard J., Vergnolle C., Schoentgen F., Kader J.-C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1170. P. 109–117.
27. Douliez J.-P., Pato C., Rabesona H., Molle D., Marion D. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 1400–1403.
28. Bakan B., Hamberg M., Larue V., Prangé T., Marion D., Lascombe M.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 390. P. 780–785.
29. Bakan B., Hamberg M., Perrocheau L., Maume D., Rogniaux H., Tranquet O., Rondeau C., Blein J.P., Ponchet M., Marion D. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 51. P. 38981–38988.
30. Regente M.C., Giudici A.M., Villalain J., de la Canal L. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2005. V. 40. P. 183–189.
31. Caaveiro J.M.M., Molina A., González-Mañas J.M., Rodríguez-Palenzuela P., García-Olmedo F., Goñi F.M. // *FEBS Lett.* 1997. V. 410. P. 338–342.
32. Hoffmann-Sommergruber K. // *Biochem. Society Transactions.* 2002. V. 30. P. 930–935.
33. van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 135–162.
34. Edreva A. // *Gen. Appl. Plant Physiol.* 2005. V. 31. P. 105–124.
35. Douliez J., Michon T., Elmorjani K., Marion D. // *J. Cereal Sci.* 2000. V. 32. P. 1–20.
36. Carvalho A.O., Gomes V.M. // *Peptides.* 2007. V. 28. P. 1144–1153.
37. Tsuboi S., Osafune T., Tsugeki R., Nishimura M., Yamada M. // *Biochem.* 1992. V. 3. P. 500–508.
38. Carvalho A.O., Teodoro C.E.S., Da Cunha M., Okorokova-Facanha A.L., Okorokov L.A., Fernandes K.V.S., Gomes V.M. // *Physiol. Plant.* 2004. V. 122. P. 328–336.
39. Diz M.S., Carvalho A.O., Ribeiro S.F., Da Cunha M., Beltrami L., Rodrigues R., Nascimento V.V., Machado O.L., Gomes V.M. // *Physiol. Plant.* 2011. V. 142. № 3. P. 233–246.
40. Pagnussat L., Burbach C., Baluska F., de la Canal L. // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. № 18. P. 6555–6563.
41. Edstam M.M., Edqvist J. // *Physiol. Plant.* 2014. V. 152. № 1. P. 32–42.
42. Kobayashi Y., Motose H., Iwamoto K., Fukuda H. // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. № 6. P. 1095–1106.
43. Chae K., Gonong B.J., Kim S.C., Kieslich C.A., Morikis D., Balasubramanian S., Lord E.M. // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. № 15. P. 4277–4290.
44. Garcia-Olmedo F., Molina A., Segura A., Moreno M. // *Trends in Microbiology.* 1995. V. 3. № 2. P. 72–74.
45. Choi A.M., Lee S.B., Cho S.H., Hwang I., Hur C.-G., Suh M.C. // *Plant Physiol. Biochem.* 2008. V. 46. P. 127–139.
46. Thoma S., Hecht U., Kippers A., Botella J., De Vries S., Somerville C. // *Plant Physiol.* 1994. V. 105. P. 35–45.
47. Jung H.W., Kim W., Hwang B.K. // *Plant Cell Environ.* 2003. V. 26. № 6. P. 915–928.
48. Gomès E., Sagot E., Gaillard C., Laquitaine L., Poinssot B., Sanejouand Y.H., Delrot S., Coutos-Thévenot P. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2003. V. 16. № 5. P. 456–464.
49. Wang C., Yang C., Gao C., Wang Y. // *Tree Physiol.* 2009. V. 29. № 12. P. 1607–1619.
50. Trevino M.B., O'Connell M.A. // *Plant Physiol.* 1998. V. 116. P. 1461–1468.
51. Zottich U., Da Cunha M., Carvalho A.O., Dias G.B., Silva N.C., Santos I.S., do Nascimento V.V., Miguel E.C., Machado O.L., Gomes V.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1810. № 4. P. 375–383.
52. Cammue B.P.A., Thevissen K., Hendriks M., Eggermont K., Goderis L.J., Proost P., Damme J.V., Osborn R.W., Guerbette F., Kader J., Broekaert W.F. // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 445–455.
53. Segura A., Moreno M., García-Olmedo F. // *FEBS Lett.* 1993. V. 332. № 3. P. 243–246.
54. Dubreil L., Gaborit T., Bouchet B., Gallant D.J., Broekaert W.F., Quillien L., Quillien L., Marion D. // *Plant Sci.* 1998. V. 138. P. 121–135.
55. Molina A., Segura A., Garcia-Olmedo F. // *FEBS.* 1993. V. 316. P. 119–122.
56. Sun J.Y., Gaudet D.A., Lu Z.X., Frick M., Puchalski B., Laroche A. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008. V. 21. № 3. P. 346–360.
57. Ge X., Chen J., Sun C., Cao K. // *Prot. Eng.* 2003. V. 16. P. 387–390.
58. Ooi L.S., Tian L., Su M., Ho W.S., Sun S.S., Chung H.Y., Wong H.N., Ooi V.E. // *Peptides.* 2008. V. 29. № 12. P. 2101–2109.
59. Lin P., Xia L., Wong J.H., Ng T.B., Ye X., Wang S., Shi X. // *J. Pept. Sci.* 2007. V. 13. № 10. P. 642–648.
60. Zhang N., Jonnes B.L., Tao H.P. // *Cereal Chem.* 1997. V. 74. № 2. P. 119–122.
61. Melo F.R., Rigden D.J., Franco O.L., Mello L.V., Ary M.B., Grossi de Sa M.F., Bloch C. // *Proteins.* 2002. V. 48. № 2. P. 311–319.
62. Jones B.L., Marinac L.A. // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. P. 257–264.
63. Sawano Y., Hatano K., Miyakawa T., Komagata H., Miyauchi Y., Yamazaki H., Tanokura M. // *Plant Physiol.* 2008. V. 146. № 4. P. 1909–1919.
64. Chae K., Kieslich C., Morikis D., Kim S., Lord E.M. // *Plant Cell.* 2009. V. 21. P. 3902–3914.
65. Zhang D., Liang W., Yin C., Zong J., Gu F., Zhang D. // *Plant Physiol.* 2010. V. 154. № 1. P. 149–162.
66. Cameron K.D., Teece M.A., Smart L.B. // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 176–183.

67. Lee S.B., Go Y.S., Bae H.J., Park J.H., Cho S.H., Cho H.J., Lee D.S., Park O.K., Hwang I., Suh M.C. // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. № 1. P. 42–54.
68. Kader J.-C. // *Trends Plant Science.* 1997. V. 2. № 2. P. 66–70.
69. Sterk P., Booij H., Schellekens G.A., van Kammen A., De Vries S.C. // *Plant Cell.* 1991. V. 3. P. 907–921.
70. Park S.Y., Jauh G.Y., Mollet J.C., Eckard K.J., Nothnagel E.A., Walling L.L., Lord E.M. // *Plant Cell.* 2000. V. 12. P. 151–163.
71. Oувard O., Cellier F., Ferrare K., Tousch D., Lamaze T., Dupuis J.M., Casse-Delbart F. // *Plant Mol. Biol.* 1996. V. 31. P. 819–829.
72. Hincha D.K. // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2002. V. 357. P. 909–916.
73. Choi Y.E., Lim S., Kim H.J., Han J.Y., Lee M.H., Yang Y., Kim J.A., Kim Y.S. // *Plant J.* 2012. V. 70. № 3. P. 480–491.
74. Srор H.A., Tischendorf G., Sieg F., Schmitt J.M., Hincha D.K. // *Cryobiology.* 2003. V. 47. № 3. P. 191–203.
75. Cheng C.S., Samuel D., Liu Y.J., Shyu J.C., Lai S.M., Lin K.F., Lyu P.C. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 13628–13636.
76. Wang X., Wang H., Cao K., Ge X. // *Mol. Biol. Rep.* 2009. V. 36. P. 745–750.
77. Osman H., Vauthrin S., Mikes V., Milat M.L., Panabières F., Marais A., Brunie S., Maume B., Ponchet M., Blein J.P. // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. P. 2825–2834.
78. Kim Y.T., Oh J., Kim K.H., Uhm J.Y., Lee B.M. // *Mol. Biol. Rep.* 2010. V. 37. № 2. P. 717–727.
79. Douliez N., Jacquemard A., Marion D., Tran V., Maume B., Milat M., Ponchet M., Mikes V., Kader J.-C., Blein J. // *FEBS Lett.* 2001. V. 509. № 1. P. 27–30.
80. Maldonado A.M., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C.J., Cameron R.K. // *Nature.* 2002. V. 419. № 6905. P. 399–403.
81. Lascombe M.B., Bakan B., Buhot N., Marion D., Blein J.P., Larue V., Lamb C., Prangé T. // *Protein Sci.* 2008. V. 17. № 9. P. 1522–1530.
82. Degli Esposti M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1553. № 3. P. 331–340.
83. Crimi M., Astegno A., Zoccatelli G., Esposti M.D. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2006. V. 445. № 1. P. 65–71.
84. Rudrappa T., Biedrzycki M.L., Kunjeti S.G., Donofrio N.M., Czymmek K.J., Paré P.W., Bais H.P. // *Commun. Integr. Biol.* 2010. V. 3. № 2. P. 130–138.
85. Pii Y., Astegno A., Peroni E., Zaccardelli M., Pandolfini T., Crimi M. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2009. V. 22. № 12. P. 1577–1587.
86. Pii Y., Molesini B., Pandolfini T. // *Plant Signal Behav.* 2013. V. 8. № 7. e24836.
87. Tomassen M.M., Barrett D.M., van der Valk H.C., Woltering E.J. // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. № 5. P. 1151–1160.
88. Palacin A., Varelaw J., Quirce S., del Pozo V. // *Clin. Exp. Allergy.* 2009. V. 39. P. 1267–1276.
89. Salcedo G., Sanchez-Monge R., Diaz-Perales A., Garcia-Casado G., Barber D. // *Clin. Exp. Allergy.* 2004. V. 34. № 9. P. 1336–1341.
90. Hauser M., Roulias A., Ferreira F., Egger M. // *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2010. V. 6. № 1. P. 1–14.
91. Borges J.P., Barre A., Culerrier R., Granier C., Didier A., Rougé P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 365. № 4. P. 685–690.
92. Akkerdaas J., Finkina E.I., Balandin S.V., Santos Magadán S., Knulst A., Fernandez-Rivas M., Asero R., van Ree R., Ovchinnikova T.V. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012. V. 157. P. 51–57.
93. Borges J.P., Jauneau A., Brule C., Culerrier R., Barre A., Didier A., Rougé P. // *Plant Physiol. Biochem.* 2006. V. 44. P. 535–542.
94. Fernandez-Rivas M., Gonzalez-Mancebo E., Rodriguez-Perez R., Benito C., Sanchez-Monge R., Salcedo G., Alonso M.D., Rosado A., Tejedor M.A., Vila C., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. V. 112. P. 789–795.
95. Egger M., Hauser M., Mari A., Ferreira F., Gadermaier G. // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2010. V. 10. № 5. P. 326–335.
96. Marzban G., Mansfeld A., Herndl A., Jäger S., Stoyanova M. E., Hemmer W., Katinger H., Laimer M. // *Aerobiologia.* 2006. V. 22. P. 237–245.
97. Fernández-Rivas M., Bolhaar S., González-Mancebo E., Asero R., van Leeuwen A., Bohle B., Ma Y., Ebner C., Rigby N., Sancho A.I., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. V. 118. P. 481–488.
98. Pacios L.F., Tordesillas L., Cuesta-Herranz J., Compes E., Sánchez-Monge R., Palacín A., Salcedo G., Díaz-Perales A. // *Mol. Immunol.* 2008. V. 45. № 8. P. 2269–2276.
99. García-Casado G., Pacios L.F., Díaz-Perales A., Sánchez-Monge R., Lombardero M., García-Selles F.J., Polo F., Barber D., Salcedo G. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. V. 112. P. 599–605.
100. Salcedo G., Sanchez-Monge R., Barber D., Diaz-Perales A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1771. P. 781–791.
101. Tordesillas L., Cuesta-Herranz J., Gonzalez-Muñoz M., Pacios L.F., Compés E., Garcia-Carrasco B., Sanchez-Monge R., Salcedo G., Diaz-Perales A. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 46. P. 722–728.
102. Schulten V., Radakovics A., Hartz C., Mari A., Vazquez-Cortes S., Fernandez-Rivas M., Lauer I., Jahn-Schmid B., Eiwegger T., Scheurer S., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009. V. 124. № 1. P. 100–107.
103. Edstam M.M., Viitanen L., Salminen T.A., Edqvist J. // *Mol. Plant.* 2011. V. 4. № 6. P. 947–964.
104. Boutrot F., Chantret N., Gautier M.-F. // *BMC Genomics.* 2008. V. 9. № 86. P. 1–19.
105. Jang C.S., Jung J.H., Yim W.C., Lee B.M., Seo Y.W., Kim W. // *Mol. Cell.* 2007. V. 24. № 2. P. 215–223.
106. Moore R.C., Purugganan M.D. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. P. 122–128.
107. Nieuwoudt M., Lombard N., Rautenbach M. // *Food Chem.* 2014. V. 157. P. 559–567.
108. Safi H., Saibi W., Alaoui M.M., Hmyene A., Masmoudi K., Hanin M., Brini F. // *Plant Physiol Biochem.* 2015. V. 89. P. 64–75.
109. Wang F., Zang X.S., Kabir M.R., Liu K.L., Liu Z.S., Ni Z.F., Yao Y.Y., Hu Z.R., Sun Q.X., Peng H.R. // *Gene.* 2014. V. 550. № 1. P. 18–26.
110. Guo C., Ge X., Ma H. // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 82. № 3. P. 239–253.
111. Van Winkle R.C., Chang C. // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2014. V. 46. № 3. P. 211–224.
112. Bidak K., Nicknam M.H., Farid R. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2011. V. 10. № 1. P. 1–9.
113. Mutschlechner S., Deifl S., Bohle B. // *Clin. Exp. Allergy.* 2009. V. 39. № 11. P. 1635–1642.
114. Cromwell O., Häfner D., Nandy A. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. V. 127. № 4. P. 865–872.
115. Bonura A., Passantino R., Costa M.A., Montana G., Melis M., Bondi M.L., Butteroni C., Barletta B., Corinti S., Di Felice G., et al. // *Clin. Exp. Allergy.* 2012. V. 42. № 3. P. 471–480.
116. Gómez-Casado C., Garrido-Arandia M., Gamboa P., Blanca-López N., Canto G., Varela J., Cuesta-Herranz J., Pacios L.F., Díaz-Perales A., Tordesillas L. // *Clin. Dev. Immunol.* 2013. V. 2013. P. 1–12.

УДК 575.1:[616.11/.14+616.16]

Моногенные аритмические синдромы: от молекулярно-генетических аспектов к постели больного

Е. З. Голухова, О. И. Громова*, Р. А. Шомахов, Н. И. Булаева, Л. А. Бокерия

Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, 121552, Москва, Рублевское шоссе, 135

*E-mail: gromova3112@gmail.com

Поступила в редакцию 17.10.2015

Принята к печати 03.12.2015

РЕФЕРАТ Резкое прекращение эффективной сердечной деятельности, как правило, аритмической природы, способное при достаточной продолжительности привести к смерти в любом возрасте, относят к синдрому внезапной сердечной смерти (ВСС). Ежегодно только в США регистрируется около 400 000 случаев ВСС, причем после реанимационных мероприятий выживает не более 5% пациентов. Частота ВСС в популяции закономерно увеличивается с возрастом пропорционально распространенности ишемической болезни сердца – наиболее частой причины внезапной остановки сердца. Однако некоторое повышение встречаемости ВСС наблюдается в возрасте до 5 лет и составляет 17 случаев на 100 000 населения. Этот пик приходится на долю врожденных моногенных аритмогенных каналопатий, и случаи эти, несмотря на их относительную редкость, безусловно, наиболее трагичны. Непосредственные причины или механизмы ВСС универсальны. Как правило, это аритмическая смерть, в основе которой лежат желудочковые тахикардии – устойчивая желудочковая тахикардия (ЖТ) или фибрилляция желудочков (ФЖ). Брадиаритмии и электромеханическая диссоциация составляют не более 40% всех регистрируемых остановок сердца и чаще являются исходом названных аритмий. Современные представления о механизмах ВСС основаны на десятилетиях фундаментальных исследований в области нормальной электрофизиологии сердца, молекулярной физиологии ионных каналов миокарда, патофизиологии аритмий на клеточном и тканевом уровне, в том числе при острой ишемии миокарда, молекулярной генетики моногенных расстройств, лежащих в основе злокачественных нарушений ритма сердца (например, при врожденном синдроме удлиненного QT). Эти работы формируют патофизиологическую основу, позволяющую при тщательном обследовании выявлять предрасположенность к развитию фатального события задолго до его возникновения. Настоящий обзор отражает современное представление о молекулярно-генетических основах ВСС. Подробно рассмотрены врожденные каналопатии: синдром удлиненного QT, синдром Бругада, синдром укороченного интервала QT, катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия, идиопатическая фибрилляция желудочков, а также аритмогенная дисплазия правого желудочка, стратификация риска и пути профилактики этого фатального осложнения с помощью современных технологий (в том числе имплантируемых кардиовертеров-дефибрилляторов).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аритмогенная дисплазия правого желудочка, внезапная сердечная смерть, имплантируемый кардиовертер-дефибриллятор, моногенные каналопатии, синдром удлиненного интервала QT, синдром Бругада.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АДПЖ – аритмогенная дисплазия правого желудочка; ВСС – внезапная сердечная смерть; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИКВД – имплантируемый кардиовертер-дефибриллятор; КПЖТ – катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия; ЛЖ – левый желудочек; МРТ – магнитно-резонансная томография; ЖТ – желудочковая тахикардия; СБ – синдром Бругада; СПР – саркоплазматический ретикулум; ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка; ФЖ – фибрилляция желудочков; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ЭКГ – электрокардиография; ЭМД – электромеханическая диссоциация; ЭФИ – электрофизиологическое исследование; HCN-каналы – hyperpolarization-activated channels – каналы, активируемые гиперполяризацией; LQTS – long QT syndrome – синдром удлиненного интервала QT; SQTs – short QT syndrome – синдром укороченного интервала QT.

ВВЕДЕНИЕ

Термин внезапная сердечная смерть (ВСС) используют для обозначения летального исхода, наступившего предположительно от кардиальных причин в течение 1 ч после начала острых симптомов [1]. Как правило, непосредственной причиной такого исхода являются нарушения ритма сердца: желудочковая тахикардия (ЖТ), фибрилляция желудочков (ФЖ), которые нарушают насосную функцию сердца, приводя к острому нарушению кровообращения и, при достаточной продолжительности, к необратимым последствиям с летальным исходом. Ежегодная частота ВСС в США по данным американских регистров составляет 50–100 на 100 тыс. населения [2] или около 350–400 тыс. случаев в год [3]. В России число регистрируемых ежегодно ВСС составляет 200–250 тыс. случаев [4].

Большая часть ВСС (75–80%) регистрируется среди взрослых людей и связана с ишемической болезнью сердца (ИБС). Острый период инфаркта миокарда наиболее уязвим в отношении развития желудочковых нарушений ритма. Согласно популяционным исследованиям, частота ВСС изменяется с возрастом пропорционально распространенности ИБС. Так, до 35 лет встречаемость ВСС минимальна (до шести случаев на 100 тыс.), постепенно увеличиваясь в средней и старшей возрастной группе и достигая максимума – 346 случаев на 100 тыс. – среди лиц в возрасте 75–84 года. Среди детей младше 5 лет наблюдается дополнительный пик встречаемости ВСС – 17 на 100 тыс. населения, что обусловлено семейными формами аритмогенных каналопатий [5].

Вторая по частоте встречаемости причина ВСС – кардиомиопатии: гипертрофическая кардиомиопатия и неишемическая дилатационная кардиомиопатия, на долю которой приходится около 10–15% всех внезапных аритмических смертей [6]. Инfiltrативные, воспалительные, клапанные заболевания сердца различной этиологии составляют большую часть оставшихся причин. Дети и молодые люди также подвержены ВСС, как правило, в рамках генетических заболеваний, так называемых каналопатий, которые составляют лишь незначительную часть причин ВСС (не более 1–2%) [6].

Несмотря на различную этиологию внезапной смерти, причины этого события весьма универсальны. Как уже сказано, наиболее часто в основе внезапной остановки сердца лежат устойчивая ЖТ или ФЖ. Первичная электромеханическая диссоциация (ЭМД) или брадиаритмии встречаются реже, составляя не более 40% всех случаев ВСС [5], гораздо чаще являясь исходом желудочковых тахиаритмий. Наибольшей потенциальной обратимостью обладают именно ЖТ и/или ФЖ – только в течение этого ко-

роткого периода, пока не произошел переход в ЭМД или асистолию, нормальный сердечный ритм может быть восстановлен при помощи электрической дефибрилляции. Именно стремление попасть в «терапевтическое окно» диктует необходимость максимально быстрой диагностики и немедленной дефибрилляции.

Широкое применение имплантируемых кардиовертеров-дефибрилляторов (ИКВД) как для первичной, так и для вторичной профилактики ВСС позволило значительно снизить летальность среди пациентов высокого риска. Тем не менее встречаемость ВСС остается высокой. Даже сейчас – в эру высоких скоростей и новейших способов передачи информации – выживаемость после реанимационных мероприятий в развитых странах не превышает 5% [6].

Настоящий обзор посвящен наиболее редким врожденным причинам внезапной смерти – моногенным аритмическим расстройствам, а также аритмогенной дисплазии правого желудочка и современным подходам к стратификации риска внезапной смерти у этой категории больных.

КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИИ

Физиологические процессы формирования и распространения электрического импульса в сердечной мышце, так же как и процесс «возбуждение–сокращение», замечательно слажены и происходят под влиянием гармоничной работы ионных каналов согласовано с множеством регуляторных биоактивных веществ. Ионные каналы представляют собой белки, обеспечивающие избирательную проницаемость клеточной мембраны для того или иного иона. Потенциал-чувствительные ионные каналы открываются и закрываются под влиянием мембранного потенциала, лиганд-чувствительным каналам для открытия ионной поры требуется связывание с внутри- или внеклеточной молекулой. Помимо ионных каналов, в поддержании внутриклеточного гомеостаза ионов принимают участие ионные насосы и обменники, которые осуществляют трансмембранный перенос строго определенного числа ионов с использованием энергии АТФ (насосы) или без него (обменники).

Потенциал действия кардиомиоцита инициируется локальным изменением мембранного потенциала, что активирует потенциал-зависимые натриевые (Na^+) каналы и запускает быстрый, но транзиторный натриевый ток (I_{Na}), формирующий типичное восходящее колено кривой потенциала действия, известное как фаза 0 деполяризации (рис. 1). Быстрая фаза 1 ранней реполяризации обусловлена несколькими ионными потоками: кратковременным выходящим током калия (K^+) – $I_{\text{to}1}$ (transient outward) и активи-

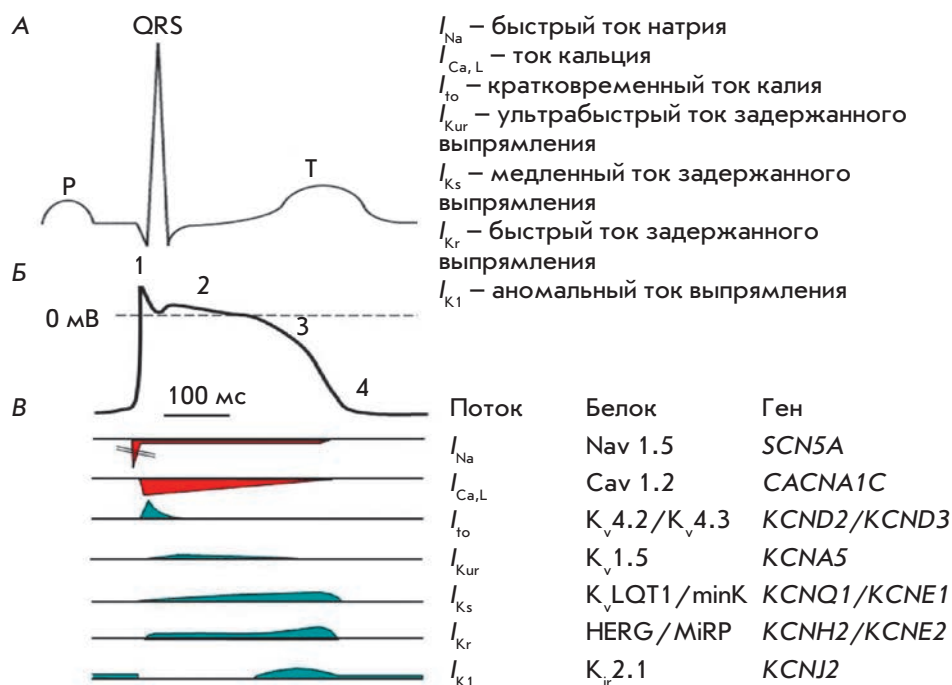


Рис. 1. Схематические временные взаимоотношения между поверхностной ЭКГ (А), типичным потенциалом действия желудочков (Б) и ионными потоками через мембрану кардиомиоцита (В). 0 – фаза деполяризации; 1 – фаза быстрой реполяризации; 2 – фаза плато; 3 – фаза реполяризации; 4 – состояние покоя (объяснение в тексте). Красным цветом обозначены ионные потоки, направленные внутрь клетки, синим – направленные из клетки

руемого кальцием током хлора (Cl⁻) – I_{to2} [7]. Во время фазы 0 и 1 Na⁺-каналы быстро инактивируются, тогда как потенциал-зависимые кальциевые (Ca²⁺) каналы (L-типа) активируются и участвуют в формировании длительного плато деполяризации мембраны. Фаза плато (фаза 2) осуществляется на фоне delicateго баланса между входящим током Ca²⁺ (I_{Ca}) через каналы L-типа, при небольшом резидуальном токе Na (I_{Na}), и появляющемся выходящем токе K⁺. Активация K⁺-каналов совместно с инактивацией Ca²⁺-каналов сдвигает этот баланс в сторону выходящих токов, инициируя тем самым фазу 3 реполяризации.

Выходящий калиевый ток (так называемый ток задержанного выпрямления) состоит как минимум из трех компонентов: ультрабыстрого (I_{Kur} – ultrarapid), быстрого (I_{Kr} – rapid) и медленного (I_{Ks} – slow), которые различаются по скорости активации и фармакологической чувствительности [7]. Эти различия обуславливают неодинаковую продолжительность потенциала действия в различных участках миокарда в зависимости от уровня экспрессии каналов [8]. Экспрессия генов, кодирующих субъединицы быстрых K⁺-каналов (ток I_{Kr}) – *KCNH2*, подвержена выраженной суточной изменчивости, играя роль своеобразных «молекулярных часов». Нарушения механизма циркадных часов могут быть связаны с повышенным риском внезапной смерти [9].

Наконец, аномальный входящий ток выпрямления (I_{K1}) завершает процесс реполяризации мембраны

кардиомиоцита. Аномальным этот ток назван потому, что формирующие его K⁺-каналы активируются только при отрицательном значении мембранного потенциала и обеспечивают в основном именно входящий ток.

Особым механизмом формирования потенциала действия обладают пейсмекерные клетки миокарда (рис. 2), способные самопроизвольно генерировать потенциал действия. Даже отграниченные от всех окружающих тканей кардиомиоциты сино-атриального узла продолжают спонтанную диастолическую деполяризацию [7]. Подобную способность обеспечивает особый ионный ток, названный funny (от англ. забавный) – I_f – из-за его необычных свойств. Ток I_f является входящим смешанным кальциево-натриевым током, который постепенно инициируется во время гиперполяризации (после завершения фазы 4 реполяризации) при трансмембранном потенциале -40/-50 мВ и полностью активируется при потенциале около -100 мВ, запуская потенциал действия. Пейсмекерный ток осуществляется через семейство ионных каналов, открытых в 1990-х годах и названных HCN-каналы (hyperpolarization-activated channels). Вегетативная модуляция работы пейсмекерного тока имеет несомненное значение для нормальной физиологии сердечной деятельности и осуществляется посредством cAMP. Выделяют четыре изоформы HCN-каналов, которые отличаются по скорости активации и инактивации, а также по чувствительности к cAMP. Экспериментально показано, что адре-

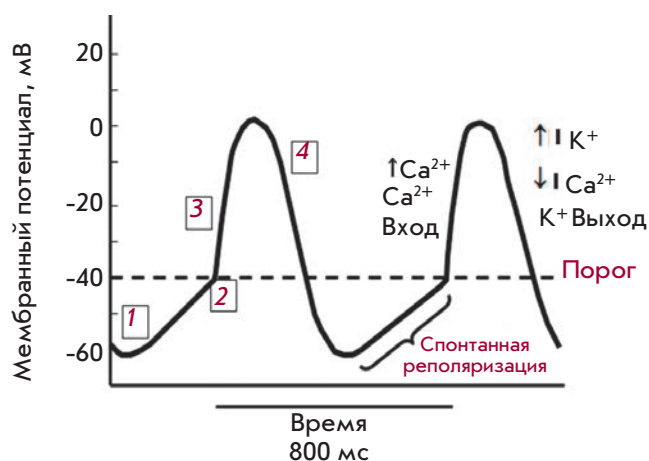


Рис. 2. Схема потенциала действия пейсмекерной клетки. 1 – фаза спонтанной деполяризации, I_f -каналы открыты; 2 – мембранный потенциал достигает порогового значения – открытие транзиторных кальциевых каналов (Т-типа); 3 – открытие кальциевых каналов медленного типа (L-типа) – деполяризация; 4 – закрытие кальциевых каналов L-типа, открытие калиевых каналов, гиперполяризация

нергические и холинергические нейротрансмиттеры вызывают повышение или снижение уровня внутриклеточного cAMP соответственно. Тогда как cAMP непосредственно связывается с HCN-каналом, усиливая или ослабляя ток I_f , приводя к ускорению или замедлению спонтанной деполяризации.

В утилизации избытка ионов, возникающего при формировании каждого потенциала действия, а также в поддержании строго определенной концентрации ионов внутри клетки решающую роль играют ионные насосы и обменники. Наиболее изучены два ионных насоса: мембранная Na^+ - K^+ -АТФ-аза и Ca^{2+} -АТФ-аза, и два ионных обменника: мембранный Na^+ - Ca^{2+} и Na^+ - H^+ .

Na^+ - K^+ -АТФ-аза – активируемый магнием (Mg^{2+}) фермент мембраны кардиомиоцита. В физиологических условиях насос поддерживает нормальный потенциал покоя, обеспечивая перенос трех ионов Na^+ из клетки в обмен на поступление двух ионов K^+ в клетку. Работа Na^+ -насоса имеет решающее значение в поддержании уровня внутриклеточного Na^+ , а следовательно, влияет на возбудимость и сократимость кардиомиоцита [7].

Мембранный Ca^{2+} -насос (АТФ-аза) совместно с Na^+ - Ca^{2+} -обменником выводит внутриклеточный Ca^{2+} . Однако роль ее в утилизации Ca^{2+} , по-видимому, невелика. Гораздо большее значение имеет Ca^{2+} -АТФ-аза саркоплазматического ретикулума. Первостепенная роль в выведении избытка внутри-

клеточного Ca^{2+} принадлежит Na^+ - Ca^{2+} -обменнику. Выключение гена, кодирующего этот белок сарколеммы, приводит к гибели эмбриона на 9–10 день после зачатия [7]. Na^+ - Ca^{2+} -обменник относится к количественным белкам-переносчикам, обеспечивая транспорт Na^+ в обмен на Ca^{2+} (3 : 1). При этом работа Na^+ - Ca^{2+} -обменника согласована с постоянно меняющимся входящим потоком Ca^{2+} – система выводит столько же Ca^{2+} , сколько вошло в клетку во время текущего кардиального цикла. Во время релаксации миокарда в выведении Ca^{2+} из цитоплазмы участвуют две системы: Na^+ - Ca^{2+} -обменник и саркоплазматический ретикулум (СПР). При этом экспериментально доказано, что каждая из систем способна полностью обеспечить миокардиальную релаксацию. Ca^{2+} -АТФ-аза саркоплазматического ретикулума может привести к быстрому расслаблению сердечной мышцы, однако не способна работать самостоятельно в течение нескольких последовательных сокращений. Работа Na^+ - Ca^{2+} -обменника, напротив, обеспечивает повторный выход Ca^{2+} от сокращения к сокращению. В зависимости от электрохимических градиентов Na^+ - Ca^{2+} -обменник способен обеспечивать не только поток выходящего Ca^{2+} , но и ток Ca^{2+} в клетку для повышения или поддержания сократимости миокарда.

Na^+ - H^+ -обменник также относится к количественным белкам-переносчикам, он заменяет один внутриклеточный протон на один внеклеточный ион натрия и играет важнейшую роль в поддержании внутриклеточного рН.

Работа ионных каналов регулируется различными интра- и экстракардиальными факторами, наиболее значимый из которых – β -адренергическая стимуляция. Так, при физиологической активации симпатической нервной системы – физической нагрузке или эмоциональном стрессе, называемой в англоязычной литературе реакцией «fight or flight», увеличение частоты сердечных сокращений требует немедленного укорочения потенциала действия кардиомиоцита, что осуществляется за счет усиления I_{Ks} посредством β -адренергической стимуляции [7]. Кроме того, симпатическая стимуляция усиливает сократимость миокарда, в основном за счет возрастания входящего тока Ca^{2+} и повышенного накопления Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом для последующего большего выброса его внутрь клетки.

Внутриклеточный гомеостаз Ca^{2+} во многом зависит от нормальной работы СПР. Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы в мембране СПР регулируются так называемыми рианодиновыми рецепторами – RyR2 , нарушение функции которых способно привести к перегрузке клетки Ca^{2+} и повышению тем самым триггерной активности миокарда.

МОНОГЕННЫЕ ПРИЧИНЫ ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТИ

Симфония работы ионных каналов нарушается при генетически детерминированных ионных каналапатиях. Такие дефекты способны спровоцировать фатальные аритмии, возникающие, как правило, в детском или молодом возрасте. Несмотря на редкую встречаемость, эти заболевания поддаются молекулярной диагностике, поэтому почти за два десятилетия были раскрыты причины наиболее частых из подобных генетических аномалий. К настоящему времени известны более 25 генов, нарушение экспрессии которых способно вызывать склонность к желудочковым тахикардиям. Клинически при этом выделяют всего несколько нозологических форм. Основные из них – синдром удлиненного интервала QT (LQTS – long QT syndrome), синдром укороченного интервала QT (SQTS – short QT syndrome), синдром Бругада (СБ), катехоламинергическая полиморфная ЖТ (КПЖТ) и идиопатическая ФЖ. В основе этих заболеваний лежат три патофизиологических механизма: нарушение реполяризации (LQTS, SQTS, синдром Бругада), замедленное желудочковое проведение (синдром Бругада) и нарушение внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} (КПЖТ).

Врожденный синдром удлиненного QT (LQTS)

Наиболее частый вариант LQTS встречается при синдроме Романо–Уорда, который наследуется по аутосомно-доминантному типу (частота около 1 на 2500 живорождений) [10]. Менее частый, аутосомно-рецессивный, сочетающийся с глухотой вариант, – синдром Джервелла–Ланге–Нильсена. LQTS генетически весьма гетерогенен – выделяют по меньшей мере 8 его вариантов. Наиболее частый генетический подтип – LQTS1 – обусловлен мутацией гена *KCNQ1*, кодирующего субъединицу потенциал-зависимого K^+ -канала, ответственного за медленный выходящий ток K^+ (I_{Ks}). Мутации гена *KCNH2*, ответственного за структуру другого варианта K^+ -канала, обеспечивающего быстрый выходящий ток K^+ (I_{Kr}), приводят к развитию второго большого подтипа – LQTS2. Гетерозиготные мутации генов *KCNQ1* и *KCNH2* вызывают потерю функции соответствующих каналов, снижая I_{Ks} или I_{Kr} соответственно, что замедляет реполяризацию и удлиняет потенциал действия желудочков. Повышение частоты сердечного ритма во время симпатической активации вызывает неспособность кардиомиоцитов таких людей к увеличению I_{Ks} . Это объясняет тот факт, что физические упражнения и эмоциональный стресс провоцируют развитие угрожающих жизни аритмий у пациентов с LQTS1. В то же время у пациентов с LQTS2 триггерным фактором служат резкие акустические

стимулы (крик, звонок будильника и т.д.) [11]. На выборке из 700 пациентов с известным генотипом LQTS показана генетическая специфичность аритмогенных триггеров. Так, 99% аритмических событий во время плавания, произошли у пациентов с LQTS1. Тогда как 80% событий, спровоцированных внезапными звуками, – у пациентов с LQTS2 [12].

Около 10% всех LQTS вызваны мутациями гена *SCN5A* (LQTS3), кодирующего α -субъединицу Na^+ -канала, обеспечивающего быстрый входящий ток Na^+ в фазу 0 деполяризации. Как правило, это мутации приобретения функции, приводящие к нарушению инактивации канала и увеличению постоянного I_{Na} [13]. Такой же фенотип обнаружен и при мутациях в других генах (в том числе *CAV3*, *SCN4B* и *SNTA1*), кодирующих белки, прямо или косвенно влияющие на натриевые каналы. Постоянно повышенный ток Na^+ нарушает физиологический баланс между входящим и выходящим потоками ионов во время фазы плато, что становится причиной отсроченной реполяризации, удлинения потенциала действия и предрасположенности к re-entry аритмии. Селективная блокада постоянного Na^+ -тока некоторыми антиаритмиками (например, мексилетином) или антиангинальным препаратом ранолазином может служить патофизиологически обоснованным способом лечения LQTS3 [14, 15]. Следует отметить, что именно гены *KCNQ1*, *KCNH2* и *SCN5A*, мутации в которых вызывают LQTS 1, 2 и 3 соответственно, относятся к так называемым «большим» генам LQTS, и идентификация мутаций в них с большой долей вероятности свидетельствует о врожденном LQTS и имеет значение при стратификации риска (см. ниже).

Приобретенные LQTS встречаются чаще, чем врожденные, и имеют весьма схожие патофизиологические механизмы. Наиболее частый вариант приобретенных LQTS – медикаментозное удлинение интервала QT – происходит при блокаде кардиальными или некардиальными препаратами K^+ -каналов, обеспечивающих I_{Kr} (HERG-каналы), что вызывает замедление реполяризации желудочков. Описаны также варианты генетической предрасположенности к медикаментозному удлинению интервала QT [16]. Такие состояния связаны с частичной потерей функции в отношении I_{Ks} , что приводит к снижению так называемого резерва реполяризации, который может проявиться при медикаментозном ингибировании I_{Kr} . Описаны также отдельные наблюдения манифестации латентного врожденного LQTS на фоне приема препаратов, блокирующих HERG-каналы (например, таких антиаритмиков, как амиодарон, соталол, дофетилид, пропafenон) [13], или других патологических состояний, например, при инфаркте миокарда [17].

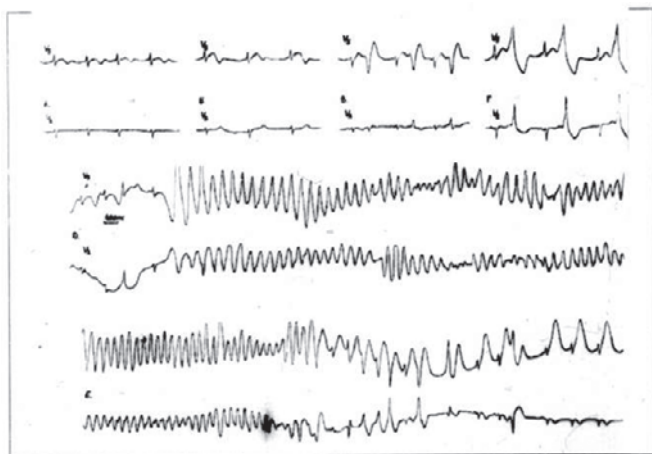


Рис. 3. Фрагмент холтеровского мониторинга ЭКГ у пациентки 13 лет с диагнозом врожденный синдром удлиненного QT. Пароксизм желудочковой тахикардии «пируэт» (собственное наблюдение)

Помимо синдрома Джервелла–Ланге–Нильсена, описано еще два типа LQTS, имеющих экстракардиальные проявления. Синдром Андерсена – аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся желудочковыми аритмиями, периодическим параличом и костными проявлениями [12]. Для синдрома Андерсена характерна фенотипическая гетерогенность, зачастую с одним или двумя клиническими признаками. Несмотря на то что желудочковые аритмии можно отнести к главным проявлениям заболевания, они редко заканчиваются внезапной смертью [13]. Синдром Андерсена ассоциирован с мутацией гена *KCNJ2*, кодирующего K^+ -канал, который обеспечивает аномальный входящий ток выпрямления – I_{K1} – важную составляющую фазы 3 реполяризации. Нарушение работы канала приводит к удлинению потенциала действия и повышенной склонности к re-entry.

Синдром Тимоти связан с мутацией гена *CACNA1C*, кодирующего субъединицу потенциал-чувствительного Ca^{2+} -канала. Симптомокомплекс при синдроме Тимоти включает нарушения ритма сердца, синдактилию и аутизм [13]. Мутация вызывает выраженное нарушение инактивации Ca^{2+} -канала, избыточный ток Ca^{2+} во время фазы плато.

Для LQTS характерна особая электрокардиографическая картина непосредственно перед началом желудочковой тахикардии – так называемая последовательность short–long–short (SLS), или феномен «каскада», включающая чередование укорочения интервала RR вследствие наджелудочковой экстрасистолы (short), затем следует постэкстрасистолическая пауза (long) и повторная желудочковая экстрасистола (short), после чего запускается тахикардия «пируэт» (рис. 3) [12, 18].

Таблица 1. Диагностические критерии синдрома удлиненного QT. Шкала P. Schwartz (2011) [19]

Критерии	Баллы
QTc > 480 мс	3
QTc = 460–470 мс	2
QTc = 450 мс (у мужчин)	1
QTc через 4 мин после теста с нагрузкой ≥ 480 мс	1
ЖТ типа «пируэт»	2
Альтернация Т-волны	1
Зазубрина Т-волны в трех отведениях	1
Брадикардия, не соответствующая возрасту	0.5
Стресс-индуцированные синкопе	2
Спонтанные синкопе	1
Врожденная глухота	0.5
Члены семьи с LQTS	1
ВСС по неизвестной причине у членов семьи в возрасте до 30 лет	0.5

В 2011 году P. Schwartz представил обновленные диагностические критерии LQTS (табл. 1). При сумме баллов ≥ 3.5 правомочен диагноз LQTS (при отсутствии вторичных причин) [19–21]. Кроме того, диагноз LQTS может быть установлен при обнаружении характерной генетической мутации, вне зависимости от продолжительности QT на ЭКГ [21].

Для стратификации риска аритмических событий у пациентов с LQTS важен как генетический статус, так и клинические данные. Исследователи из клиники Mayo Giudicessi J.R. и соавт. [22] разработали схему стратификации риска первичных или повторных кардиальных событий, в том числе синкопе, внезапной остановки сердца или внезапной сердечной смерти в возрасте до 40 лет, на основании последних исследований, изучавших неблагоприятные события у пациентов LQTS (рис. 4).

В настоящее время единственный класс медикаментозных препаратов, рекомендованный пациентам с LQTS, – бета-блокаторы [22, 23]. Они особенно эффективны у больных LQTS1, у которых триггерными факторами выступают физические нагрузки, а тонус симпатической нервной системы значительно повышен. Протективный эффект бета-блокаторов ниже при LQTS2 и LQTS3.

Помимо медикаментозного лечения, для снижения частоты аритмических событий у пациентов LQTS применяют экстраплевральную или торакоскопическую левостороннюю сердечную симпатэктомию, включающую удаление нижней половины звездчатого ганглия (T1) и грудных ганглиев (T2–T4). Schwartz

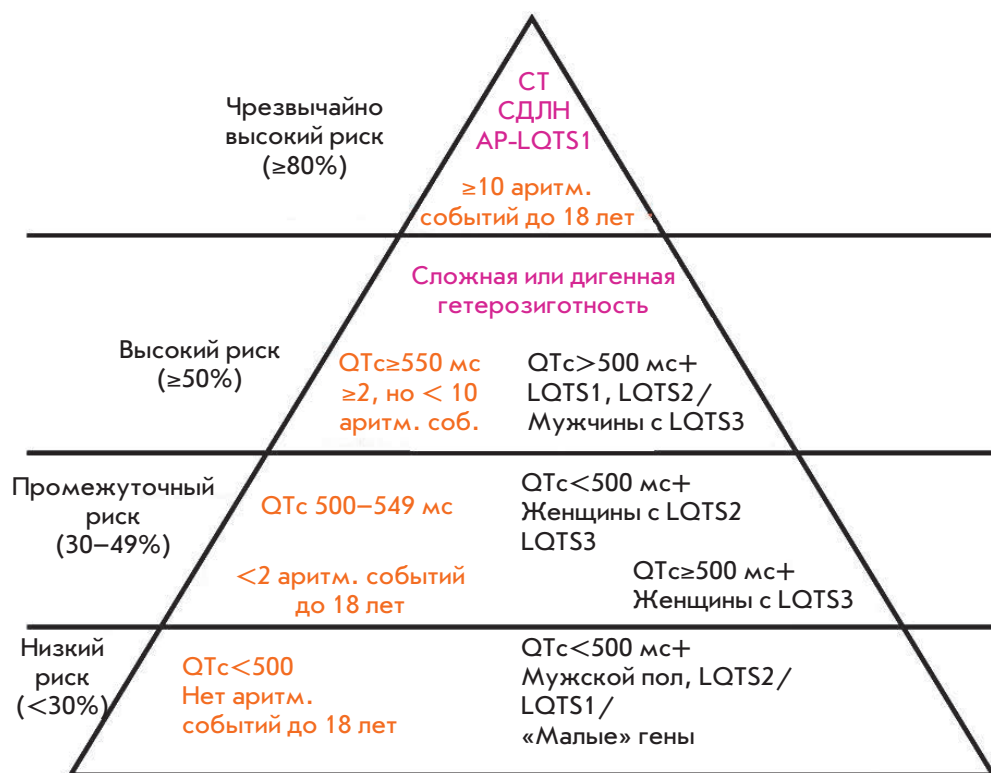


Рис. 4. Классификация риска у пациентов с синдромом удлиненного QT в зависимости от генотипа и фенотипа (Giudicessi J.R. и соавт.) [22]. Оранжевым цветом обозначены рекомендации, основанные на фенотипе; черным – рекомендации, основанные на фенотипе и генотипе; фиолетовым – рекомендации, основанные на генотипе. LQTS – long QT syndrome – синдром удлиненного QT; Аритм. соб. – аритмические события; AP-LQTS1 – аутосомно-рецессивный синдром удлиненного QT; СДЛН – синдром Джервелла–Ланге–Нильсена; СТ – синдром Тимоти

и соавт. показали снижение частоты аритмических событий более чем на 90% в течение 8 лет после хирургической денервации в группе из 147 пациентов LQTS высокого риска (средний QTc 563 ± 65 мс; 99% – симптоматичные) [24]. Согласно современным представлениям, выполнение левосторонней кардинальной симпатэктомии следует рассматривать у пациентов с непереносимостью или неэффективностью β-блокаторов [22].

Решение об имплантации кардиовертера-дефибриллятора (ИКВД) следует принимать индивидуально. Согласно наблюдению 233 пациентов LQTS в течение <5 лет после имплантации ИКВД 28% всех больных перенесли эффективную электротерапию. В то же время, по крайней мере, у 31% пациентов отмечено хотя бы одно осложнение после имплантации [25]. В 2012 году Schwartz и соавт. разработали клиническую шкалу M-FACT для идентификации больных, нуждающихся в ИКВД (табл. 2). По мнению авторов, имплантация КВД оправдана при наличии ≥ 1 балла.

Синдром укороченного интервала QT (SQTS)

Синдром укороченного интервала QT (SQTS) впервые был описан не так давно – в 2000 году. Это расстройство реполяризации характеризуется укорочением QT до 320 мс и менее, высокими зубцами T и относительным увеличением интервала между

Таблица 2. Шкала риска M-FACT для решения об имплантации кардиовертера-дефибриллятора у пациентов с синдромом удлиненного QT (Schwartz и соавт., 2012) [26]

Критерий	- 1 балл	0 баллов	1 балл	2 балла
Отсутствие событий на терапии > 10 лет	Да			
QTc, мс		≤ 500	> 500 ≤ 550	> 550
Остановка сердца в анамнезе		Нет	Да	
Аритмические события на терапии		Нет	Да	
Возраст на момент имплантации, годы		> 20	≤ 20	

Примечание. M-FACT означает: M – Minus – минус 1 балл за отсутствие событий в течение 10 лет; F – Five hundred and fifty – 550 мс QTc; A – Age – возраст менее 20 лет на момент имплантации; C – Cardiac arrest – остановка сердца; T – Therapy – аритмические события на фоне терапии.

пиком и окончанием Т-волны [27]. Однако, согласно популяционным исследованиям, не всегда укорочение интервала QT свидетельствует об истинном врожденном SQTS и сопровождается склонностью к жизнеугрожающим аритмиям [28]. Помимо стойкого укорочения QT, для пациентов с врожденным SQTS характерно укорочение сегмента ST вплоть до полного отсутствия с началом Т-волны непосредственно из S-зубца.

Укорочение интервала QT, как и его удлинение, ассоциированы с жизнеугрожающими аритмиями и ВСС, часто в детском возрасте. Описаны мутации шести различных генов, кодирующих субъединицы K^+ (*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNJ2*) или Ca^{2+} (*CACNA1C*, *CACNB2*, *CACNA2D1*) каналов, ответственные за этот фенотип. Многие из этих генов те же, что и при LQTS, однако функциональный исход мутации противоположный. Мутации приобретения функции генов K^+ -каналов приводят к усилению реполяризации и укорочению потенциала действия. Мутации генов Ca^{2+} -каналов, напротив, приводят к потере функции.

Диагноз SQTS может быть установлен при QTc \leq 340 мс. Если QTc \leq 360 мс, диагноз правомочен при наличии характерной генетической мутации, семейного анамнеза SQTS, семейных случаев внезапной смерти в возрасте $<$ 40 лет или эпизодов ЖТ/ФЖ без кардиальной патологии [21].

Имплантация кардиовертера-дефибриллятора, согласно последним Европейским рекомендациям, показана только в качестве вторичной профилактики. В качестве антиаритмической терапии возможно применение соталола или хинидина (класс рекомендаций IIb) [21].

Синдром Бругада (СБ)

Пациенты с синдромом Бругада склонны к развитию фатальных аритмий преимущественно во сне, при отсутствии ишемии миокарда, электролитных нарушений и структурных заболеваний сердца [13]. Хорошо известны характерные для СБ изменения ЭКГ покоя: подъем сегмента ST в правых грудных отведениях, признаки блокады правой ножки пучка Гиса при нормальной продолжительности интервала QT (рис. 5). Назначение блокаторов Na^+ -каналов (прокаиамида, флекаида, аймалина), а также лихорадка могут выявить скрытые ЭКГ-нарушения. Типичны случаи необъяснимой внезапной смерти в семейном анамнезе. Распространенность синдрома Бругада в Европе и Америке составляет примерно 1 : 10 000 населения [13].

На сегодняшний день описано около 350 различных вариантов генных мутаций, лежащих в основе СБ [29], [30]: в 30% случаев это мутации гена *SCN5A*, кодирую-

щего α -субъединицу быстрых Na^+ -каналов, в 5% – мутации остальных генов, в том числе, кодирующих белки Ca^{2+} - и K^+ -каналов, в 65% генетический субстрат не выявляется [31, 32]. Мутации гена *SCN5A* приводят к снижению числа Na^+ -каналов и ускорению их инактивации в клетках эпикарда правого желудочка, что снижает I_{Na} локально в эпикарде. Возникающая при этом дисперсия реполяризации стенки желудочка приводит к трансмуральному градиенту напряжения, который проявляется на ЭКГ элевацией сегмента ST и служит субстратом для формирования re-entry в миокарде желудочков [33].

По мнению других исследователей, угнетение входящего натриевого тока замедляет проведение импульса в правом желудочке, вызывая отсроченную активацию миокарда выводного отдела правого желудочка. Это приводит к асинхронной реполяризации и электрической нестабильности в этом отделе сердца с возможным развитием желудочковых аритмий по механизму re-entry [13, 34]. Пока неясно, являются ли эти две гипотезы взаимоисключающими, или все варианты СБ подчинены единому патофизиологическому механизму.

Генетический анализ с целью выявления мутаций типичных генов при СБ полезен для верификации диагноза, однако не имеет самостоятельного значения в стратификации риска. Кроме того, отсутствие мутаций не исключает диагноза.

Стратификация риска у бессимптомных пациентов с синдромом Бругада представляет наиболее важную и вместе с тем противоречивую проблему. Ежегодная частота остановки сердца или синкопальных состояний у пациентов СБ, перенесших в анамнезе устойчивую ЖТ или ФЖ, составляет от 1.9 [35] до 8.8 [36], 7.7 [37] и 13.8% [38] соответственно. Имплантация ИКВД таким больным является единственным по настоящему эффективным способом лечения [37]. Однако большинство пациентов (64% по данным крупного исследования FINGER) [35] не имеют клинических проявлений заболевания на момент верификации диагноза. Частота же аритмических событий у таких больных значительно ниже и составляет от 0 до 0.8% (0.5% по данным FINGER) [37]. С другой стороны, молодой возраст этих пациентов и отсутствие структурных заболеваний сердца позволяют предположить, что низкий ежегодный риск кардиальных событий лишь временное явление и в течение нескольких последующих десятилетий будет расти.

Роль программируемой желудочковой стимуляции при инвазивном ЭФИ для стратификации риска у бессимптомных пациентов СБ оживленно обсуждается с момента первых описаний СБ. Последние исследования, в том числе наиболее крупные – FINGER и PRELUDE – не обнаружили независимого влияния

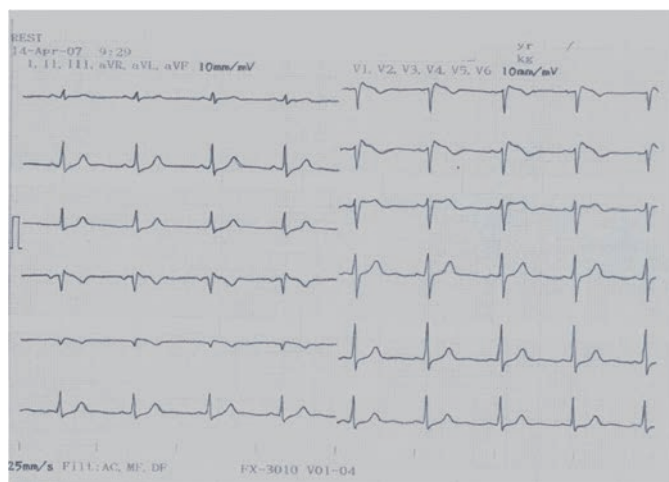


Рис. 5. Электрокардиограмма пациента с синдромом Бругада (собственное наблюдение)

инвазивного ЭФИ на аритмические события в течение в среднем 32 и 18 месяцев [35, 38]. Тем не менее, согласно недавно опубликованному метаанализу 14 исследований, включившему 3536 бессимптомных пациентов с фенотипом синдрома Бругада, спонтанный типичный паттерн ЭКГ типа 1 (т.е. элевация ST в правых грудных отведениях более 2 мм с инверсией зубца Т и J-волной) (рис. 5), а также индукция желудочковых тахикардий при программированной желудочковой стимуляции повышали риск аритмических событий в будущем. Срок наблюдения составил от 20 до 77 месяцев [39]. Таким образом, в настоящее время имплантация ИКВД на основании данных ЭФИ относится к классу рекомендаций IIb, т.е. «может быть рассмотрена» при индукции ФЖ во время программируемой желудочковой стимуляции двумя-тремя экстрастимулами в двух точках (Клинические рекомендации по диагностике и лечению желудочковых аритмий, Европейское общество кардиологов, 2015) [21].

В других случаях имплантация ИКВД пациентам с СБ рекомендована в качестве вторичной профилактики (класс рекомендаций I), а также должна быть рассмотрена при спонтанной картине типа I на ЭКГ и синкопе неясного генеза в анамнезе (класс рекомендаций IIa) [21]. В качестве профилактической антиаритмической терапии рекомендованы хинидин и изопротеренол, в том числе для лечения «электрического шторма» (класс рекомендаций IIa). Кроме того, пациентам с СБ рекомендуется соблюдать ряд правил, позволяющих минимизировать известные факторы, провоцирующие аритмию, такие, как исключать прием препаратов, способных усугубить элевацию ST в правых грудных отведениях; избегать

чрезмерного употребления алкоголя и обильной еды; как можно раньше использовать жаропонижающие при лихорадке любого генеза [21].

Катехоламинергическая полиморфная ЖТ (КПЖТ)

Нарушение внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} приводит к серьезным аритмогенным эффектам. Мутации гена *RyR2*, кодирующего рианодиновые рецепторы, ответственные за высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулула кардиомиоцита, вызывают развитие аутосомно-доминантного варианта катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии. Аутосомно-рецессивные типы расстройства обусловлены нарушениями функции гена *CASQ2*, кодирующего белок кальсеквестрин, связывающий Ca^{2+} саркоплазматического ретикулула, или мутациями гена *TRDN*, кодирующего триадин, который соединяет кальсеквестрин и *RyR2*-рецепторы [13]. Эти три белка располагаются в терминальной цистерне СПР, где внутриклеточная мембрана находится в непосредственной близости к области поперечных трубочек (Т-трубочек) плазматической мембраны. В норме электрические импульсы поступают в систему Т-трубочек и активируют Ca^{2+} -каналы L-типа, вызывая колебание концентрации Ca^{2+} , достаточное для того, чтобы вызвать Ca^{2+} -индуцированный выход Ca^{2+} посредством рианодиновых рецепторов. Выход Ca^{2+} из СПР вызывает сокращение миоцита, которое завершается удалением Ca^{2+} из цитозоля, в основном при помощи Ca^{2+} -АТФ-азного и Na^{+}/Ca^{2+} -насосов. Нарушение функции этих рецепторов приводит к перегрузке кардиомиоцита Ca^{2+} , электрической нестабильности клеток и формированию потенциалов постдеполяризации. Катехоламины, попадающие в кровь в момент стресса и/или физической нагрузки, вызывают сокращение сердечной мышцы за счет фосфорилирования протеинкиназы рианодинового рецептора [40–42].

Выделены также другие гены, ассоциированные с полиморфной ЖТ. Считается, что мутация в гене *KNJ2*, связанная с развитием синдрома Андерсена, может быть причиной семейной катехоламинергической ЖТ. Описаны мутации в гене анкирина В, которые также находят при LQTS4. В последнее время высказываются предположения, что идиопатическая фибрилляция желудочков может быть одной из форм семейной полиморфной ЖТ [43].

Диагноз катехоламинергической полиморфной ЖТ фактически является диагнозом исключения, при котором двунаправленная ЖТ или ФЖ в ответ на физическую или эмоциональную нагрузку возникает у лиц без структурных заболеваний сердца и изменений на ЭКГ покоя.

Медикаментозная терапия заключается в назначении β -блокаторов. Имеется ряд сообщений об эффективности антагонистов кальция (верапамил) при семейной полиморфной ЖТ. В целом, всем пациентам показано изменение образа жизни – отмена физических нагрузок и занятий спортом.

Идиопатическая фибрилляция желудочков

Идиопатическая фибрилляция желудочков – редкое заболевание неизвестной этиологии, манифестирующее синкопальными состояниями и ВСС в отсутствие данных за органическое заболевание сердца или каналопатии. Для идиопатической ФЖ характерно спонтанное развитие фатальной аритмии вне связи с нагрузками, часто во сне. Запуск ФЖ осуществляется желудочковой экстрасистолией с очень коротким интервалом сцепления. На сегодня доказано участие волокон Пуркинье в индукции и поддержании аритмии, протекающей по механизму re-entry [44].

Аритмогенная дисплазия правого желудочка (АДПЖ)

Аритмогенная дисплазия (или кардиомиопатия) правого желудочка (АДПЖ) относится к редким наследственным заболеваниям, характеризуется желудочковыми аритмиями, внезапной сердечной смертью и дисфункцией правого желудочка. С момента первого подробного описания АДПЖ в 1982 году прошло более 30 лет. За это время опубликовано множество клинических и экспериментальных исследований, посвященных этому заболеванию. В том числе установлено, что наиболее частой генетической причиной АДПЖ являются мутации белков десмосом – основных элементов межклеточных структур адгезии, присутствующих в многослойном эпителии и в миокарде. Так, результаты недавно опубликованного исследования, включившего 577 пациентов из американского (Johns Hopkins registry) и Датского регистров АДПЖ, показали, что 80% больных имели мутацию в гене *PKP2*, кодирующего плакофилин – один из белков десмосом. У остальных участников исследования найдены мутации других генов десмосомных белков: *DSG2* (десмоглеин), *PLN* (плакофилин), *DSP* (десмоплакин), *DSC2* (десмоколлин), *JUP* (соединительный плакоглобин), *TMEM43* (трансмембранный белок 43) [45].

Эту дисплазию миокарда можно назвать «кардиомиопатией межклеточных контактов» [11]. Дефект десмосомных белков вызывает нарушение механического соединения соседних миоцитов, что приводит к их разъединению, особенно в условиях растяжения миокарда. Наблюдающиеся при этом воспаление, фиброз и адипоцитоз могут быть неспецифическим ответом на повреждение, аналогичном тому,

что происходит при любом повреждении миокарда [46]. Такая патогенетическая модель объясняет тот факт, что длительное чрезмерное напряжение, сопровождающееся растяжением миокарда, значительно увеличивает риск ранней клинической манифестации заболевания и повышает риск ВСС. Кроме того, это объясняет, почему в патологический процесс при АДПЖ чаще вовлечен более растяжимый и тонкостенный правый желудочек, особенно на ранних стадиях заболевания. Безусловно, механическое разъединение приводит и к электрической неоднородности, формируя идеальный субстрат для развития желудочковых re-entry тахикардий [11].

Для диагностики АДПЖ в 1994 году были выдвинуты критерии Рабочей группы – Task Force Criteria (TFC), в 2010 году TFC были подвергнуты пересмотру [47]. Диагностические критерии АДПЖ включают характерные изменения деполяризации/реполяризации на электрокардиограмме, данные эхокардиографии и магнитно-резонансной томографии (МРТ) (рис. 6) в отношении нарушений морфологии и функции правого желудочка, характерные

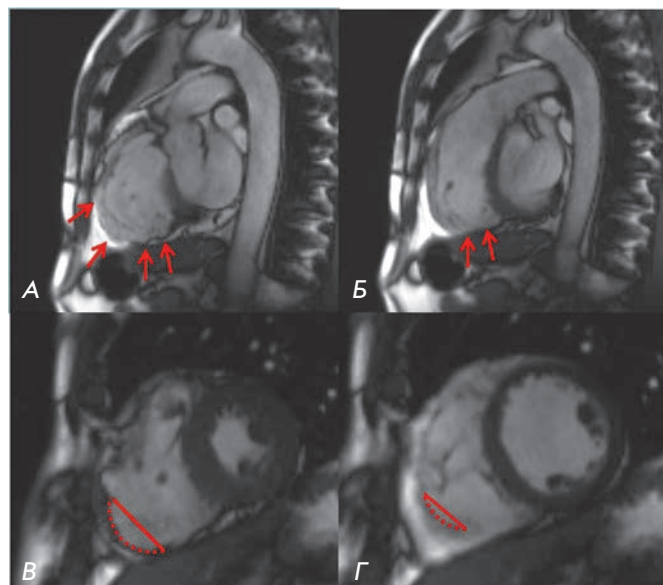


Рис. 6. Магнитно-резонансная томография сердца у пациента с АДПЖ (собственное наблюдение). На изображениях в проекции выводного отдела правого желудочка (ВОПЖ) в конечно-систолической (А) и конечно-диастолической (Б) фазах сердечного цикла видны микроаневризмы свободной стенки правого желудочка (обозначены стрелками), некоторые видны в обе фазы. Изображения по короткой оси, полученные в конечно-систолическую (В) и конечно-диастолическую (Г) фазы, показывают дискинез верхушки правого желудочка

изменения ткани миокарда при эндомиокардиальной биопсии, а также наличие желудочковых аритмий, данные семейного анамнеза и генетического тестирования (табл. 3). Диагноз АДПЖ считается правомочным при наличии четырех баллов, при этом один большой критерий соответствует двум баллам, один малый – одному баллу. При наличии трех баллов диагноз АДПЖ считается вероятным, тогда как при числе баллов от одного до двух следует считать, что у пациента АДПЖ нет [47].

Правильное лечение пациентов с АДПЖ в небольшой степени зависит от адекватной диагностики. Лечение же определяется следующими стратегиями: стратификация риска ВСС и решение вопроса об имплантации кардиовертера-дефибриллятора (ИКВД), минимизация частоты разрядов ИКВД и профилактика прогрессирования заболевания. Согласно общим рекомендациям по профилактике ВСС, имплантация ИКВД показана пациентам АДПЖ, перенесшим фибрилляцию желудочков, устойчивую желудочковую тахикардию или синкопальные состояния. В исследовании Bhonsale A. и соавт. вошли 84 пациента с АДПЖ, наблюдавшихся в течение 4.7 ± 3.4 лет после имплантации ИКВД с целью первичной профилактики. Предикторами эффективной электротерапии послужили: симптомы заболевания (т.е. статус обследуемого, а не члена семьи), индукция ЖТ при электрофизиологическом исследовании, наличие неустойчивой ЖТ, число желудочковых экстрасистол (ЖЭС) более 1000 в сутки. Индукция желудочковых тахикардий при ЭФИ была независимым фактором риска эффективных разрядов ИКВД [48].

Таким образом, в настоящее время имплантация ИКВД показана пациентам, отвечающим критериям ТФС, особенно если в анамнезе у них имеется ВСС, устойчивая ЖТ или аритмогенное синкопе, большое число ЖЭС и/или неустойчивая ЖТ [46]. Клиницистам следует быть особенно внимательными относительно стратификации риска ВСС у лиц, у которых АДПЖ выявлена в результате семейного скрининга. Как правило, такие пациенты находятся на более ранней стадии заболевания. Ограничение физической нагрузки и применение β -блокаторов, вероятно, позволяют снизить риск ВСС у таких лиц. Однако, если принимается решение о неимплантации ИКВД, требуется тщательный мониторинг состояния больного.

Всем пациентам с АДПЖ показаны β -блокаторы. В качестве дополнительной антиаритмической терапии рекомендованы амиодарон или соталол. В редких случаях применяют и другие антиаритмические средства. При неэффективности антиаритмиков, повторяющихся разрядах ИКВД рекомендовано

выполнение радиочастотной аблации аритмогенных очагов. Следует отметить, что роль катетерной аблации у пациентов с АДПЖ сводится к возможному снижению числа разрядов дефибриллятора и повышению качества жизни. Согласно нескольким исследованиям, посвященным эффективности катетерной аблации у пациентов с АДЖП, свобода от ЖТ составляет от 25 до 47% в течение первого года наблюдения, 21 и 15% за 5 и 10 лет после операции [46]. Эффективность эпикардиальной аблации несколько выше и составляет 64% в течение первого года и 45% в течение 5 лет [46]. Согласно данным Philips V. и соавт., свобода от эффективных разрядов ИКВД после эпикардиальной радиочастотной аблации у 30 пациентов с АДПЖ составила 83, 76 и 70% в течение 6, 12 и 24 месяцев соответственно [49].

Единственным эффективным способом замедления прогрессирования заболевания в настоящее время является ограничение физических нагрузок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение нам хотелось бы привести опубликованные в 2014 году данные опроса Европейской ассоциации сердечного ритма (European Heart Rhythm Association), проведенного среди кардиологов 50 клиник в 23 странах [50]. Опрос был посвящен диагностике и лечению пациентов с врожденными аритмическими синдромами. Согласно результатам этого исследования, большинство пациентов с каналопатиями проходят генетическое тестирование: от 70% при LQTS до 36% – среди пациентов с идиопатической ФЖ. Хотя лишь треть клиницистов обсуждают результаты тестирования с пациентами и генетиками, для диагностики врожденных каналопатий относительно часто применяют фармакологические пробы. Так, для диагностики синдрома Бругада 89% опрошенных используют блокаторы натриевых каналов, а для подтверждения катехоламинергической желудочковой тахикардии 36% пользуются изопроterenолом. Для диагностики остальных каналопатий 80–92% врачей фармакологическую провокацию не используют. В большинстве клиник (82–98%) не прибегают к внутрисердечному ЭФИ для индукции желудочковых аритмий, за исключением случаев СБ (39% клиник используют ЭФИ). От 27 до 54% участников исследования включают МРТ в диагностический протокол пациентов с СБ и идиопатическими желудочковыми аритмиями, реже у пациентов с LQTS и SQTS (11–17% участников). Коронарография выполняется в 62% случаев идиопатических ФЖ/ЖТ. Эндомиокардиальная биопсия включается в протокол исследования у 8% больных идиопатической ФЖ. В большинстве опрошенных клинических центров среди пациентов с врожден-

Таблица 3. Диагностические критерии аритмогенной дисплазии правого желудочка (АДПЖ) (F. Marcus и соавт., 2010) [47]

Группа	Большие критерии	Малые критерии
Глобальная и/или региональная дисфункция и структурные нарушения	<p>По данным 2D ЭхоКГ: локальная акинезия, дискинезия или аневризма ПЖ И один из следующих параметров, измеренных в конце диастолы: ППДО ВОПЖ ≥ 32 мм ППКО ВОПЖ ≥ 36 мм ИЛИ относительное изменение площади $\leq 33\%$;</p> <p>По данным МРТ: локальная акинезия, дискинезия или аневризма ПЖ либо диссинхрония ПЖ И один из следующих параметров: отношение КДО ПЖ к BSA ≥ 110 мл/м² (мужчины) или ≥ 100 мл/м² (женщины) ФВ ПЖ $\leq 40\%$</p> <p>По данным правой вентрикулографии: локальная акинезия, дискинезия или аневризма ПЖ</p>	<p>По данным 2D ЭхоКГ: локальная акинезия, дискинезия, диссинхрония ПЖ И один из следующих параметров, измеренных в конце диастолы: ППДО ВОПЖ ≥ 29 и < 32 мм; ППКО ВОПЖ ≥ 32 и < 36 мм ИЛИ относительное изменение площади > 33 и $\leq 40\%$;</p> <p>По данным МРТ: локальная акинезия, дискинезия или диссинхрония ПЖ И один из следующих параметров: отношение КДО ПЖ к BSA и ≥ 110 мл/м² (мужчины) или ≥ 100 мл/м² (женщины); ФВ ПЖ $> 40 \leq 45\%$</p>
Особенности строения ткани стенки желудочков сердца	Менее 60% резидуальных миоцитов при морфометрическом анализе (или менее 50%, если определяется) с фиброзным замещением ткани свободной стенки ПЖ (с или без замещения жировой тканью) в одном и более образцах, полученных при ЭМБ	От 60 до 75% резидуальных миоцитов при морфометрическом анализе (или менее 50–65%, если определяется) с фиброзным замещением ткани свободной стенки ПЖ (с или без замещения жировой тканью) в одном и более образцах, полученных при ЭМБ
Аномалии реполяризации	Инверсия Т-волны в правых прекардиальных отведениях (V1–V3) или более у лиц старше 14 лет при отсутствии полной БПНПГ	Инверсия Т-волны в отведениях V1–V2 у лиц старше 14 лет (без полной БПНПГ) или в отведениях V4–V6. Инверсия Т-волны в отведениях V1–V4 у лиц старше 14 лет при наличии полной БПНПГ
Аномалии деполяризации/нарушения проведения	Эпсилон-волна в отведениях V1–V3 (воспроизводимые низкоамплитудные сигналы между окончанием QRS и началом Т-волны)	Поздние потенциалы при ЭКГ высокого разрешения (≥ 1 из 3 параметров при отсутствии QRSd ≥ 110 мс при стандартной ЭКГ: fQRS ≥ 114 мс Продолжительность низкоамплитудных (< 40 мВ) сигналов ≥ 38 мс Среднеквадратичная амплитуда последних 40 мс комплекса QRS ≤ 20 мс Продолжительность поздней активации ≥ 55 мс, измеренной от самой нижней точки окончания QRS, в том числе R' в V1–V3 при отсутствии полной БПНПГ
Аритмии	Неустойчивая или устойчивая ЖТ с морфологией блокады ЛНПГ с «северной» осью	Неустойчивая или устойчивая ЖТ из ВОПЖ с морфологией блокады ЛНПГ с «южной» или неизвестной осью > 500 ЖЭС за 24 ч ХМ
Семейный анамнез	АДПЖ-критерии у родственников первой линии АДПЖ у родственников первой линии, подтвержденная данными аутопсии или во время хирургического вмешательства Выявление генетических мутаций, ассоциированных или возможно ассоциированных с АДПЖ	Семейный анамнез АДПЖ при невозможности определения соответствия представленным критериям Случаи ВСС (в возрасте до 35 лет), вероятно обусловленные АДПЖ у родственников первой линии Диагноз АДПЖ подтвержден гистологически или согласно представленным критериям у родственников второй линии

BSA (body surface area) – площадь поверхности тела; БПНПГ – блокада правой ножки пучка Гиса; ВОПЖ – выводной отдел правого желудочка; ЖЭС – желудочковая экстрасистолия; КДО ПЖ – конечно-диастолический объем правого желудочка; ЛНПГ – левая ножка пучка Гиса; ПЖ – правый желудочек; ППДО – парастернальная позиция по длинной оси; ППКО – парастернальная позиция по короткой оси; ФВ ПЖ – фракция выброса правого желудочка; ХМ – холтеровское мониторирование ЭКГ; ЭхоКГ – эхокардиография; ЭМБ – эндомикардиальная биопсия.

ными каналопатиями имплантация ИКВД для первичной профилактики выполняется лишь в 0–5% случаев, тогда как для вторичной профилактики частота использования ИКВД возрастает до 90–100%. Лечение повторных желудочковых аритмий, приводящих к множественным разрядам ИКВД, проводят при помощи усиления проводимой терапии, применения β -блокаторов, различных антиаритмиков (инфузия изопроterenолола, хинидин при SQTS), кардинальной симпатической денервации. Радиочастотная абляция (РЧА) считается предпочтительным методом при идиопатической фибрилляции желудочков (20%), тогда как при остальных каналопатиях частота применения РЧА не превышает 8%.

Авторы опроса делают вывод об общей приверженности участников исследования к настоящим ре-

комендациям, однако подчеркивают, что более 50% всех центров, участвовавших в опросе, не участвуют в каких-либо регистрах (местных институтских, национальных или международных), что, безусловно, усложняет задачу изучения течения, эффективности терапии, стратификации риска и прогноза среди пациентов с первичными аритмогенными синдромами. ●

Работа поддержана грантом Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских научных учреждениях и государственных научных центрах Российской Федерации «Молекулярные механизмы фибрилляции предсердий» (№ 14.Z50.31.0026).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zipes D.P., Rubart M. // Heart Rhythm. 2006. V. 3. P. 108–113.
- Fishman G.I., Chugh S.S., Dimarco J.P., Albert C.M., Anderson M.E., Bonow R.O., Buxton A.E., Chen P.S., Estes M., Jouven X., et al. // Circulation. 2010. V. 122. P. 2335–2348.
- Ревишвили А.Ш., Ардашев А.В., Бойцов С.А., Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Давтян К.В., Зенин С.А., Кузнецов В.А., Купцов В.В., Лебедев Д.С. и др. Клинические рекомендации по проведению электрофизиологических исследований, катетерной абляции и применению имплантируемых антиаритмических устройств. М.: МАКС Пресс, 2013. 596 с.
- Бокерия Л.А., Ревишвили А.Ш., Неминуший И.М. Внезапная сердечная смерть. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 272 с.
- Chugh S.S., Reinier K., Teodorescu C., Evanado A., Kehr E., Al Samara M., Mariani R., Gunson K., Jui J. // Prog. Cardiovasc Dis. 2008. V. 51(3). P. 213–228. doi: 10.1016/j.pcad.2008.06.003.
- Nichol G., Thomas E., Callaway C.W., Hedges J., Powell J.L., Aufderheide T.P., Rea T., Lowe R., Brown T., Dreyer J., et al. // JAMA. 2008. V. 300. P. 1423–1431.
- Zipes D.P., Jalife J. Cardiac electrophysiology: from cell to bedside. 4-th ed. Philadelphia. WB Saunders, 2004. 1155 p.
- Бокерия О.Л., Ахобеков А.А. // Анналы аритмологии. 2014. № 3. С. 176–184. doi: 10.15275/annaritm.2014.3.6.
- Schroder E.A., Burgess D.E., Zhang X., Lefta M., Smith J.L., Patwardhan A., Bartos D.C., Elayi C.S., Esser K.A., Delisle B.P. // Heart Rhythm. 2015. pii: S1547-5271(15)00198-8. doi: 10.1016/j.hrthm.2015.02.019.
- Schwartz P.J., Stramba-Badiale M., Crotti L., Pedrazzini M., Besana A., Bosi G., Gabbarini F., Goulene K., Insolia R., Mannarino S., et al. // Circulation. 2009. V. 120. № 18. P. 1761–1767.
- Бокерия Л.А., Голухова Е.З. Клиническая кардиология: диагностика и лечение. Т. 3. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2011. 598 с.
- Schwartz P.J., Ackerman M.J., George Jr. A.L., Wilde A. // J. Am. Coll. Cardiol. 2013. V. 62. № 3. P. 169–180. doi: 10.1016/j.jacc.2013.04.044.
- Alfred L. George Jr. // J. Clin. Invest. 2013. V. 123. № 1. P. 75–83. doi: 10.1172/JCI62928.
- Moss A.J., Zareba W., Schwarz K.Q., Rosero S., McNitt S., Robinson J.L. // J. Cardiovasc. Electrophysiol. 2008. V. 19. № 12. P. 1289–1293.
- Kannankeril P., Roden D.M., Darbar D. // Pharmacol. Rev. 2010. V. 62. № 4. P. 760–781.
- Roden D.M. // J. Intern. Med. 2006. V. 259. № 1. P. 59–69.
- Crotti L., Hu D., Barajas-Martinez H., De Ferrari G.M., Oliva A., Insolia R., Pollevick G.D., Dagradi F., Guerchicoff A., Greco F., et al. // Heart Rhythm. 2012. V. 9. № 7. P. 1104–1112.
- Бокерия Л.А., Ревишвили А.Ш., Проницева И.В. // Анналы аритмологии. 2005. № 4. С. 7–17.
- Schwartz P.J., Crotti L. // Circulation. 2011. V. 124. P. 2181–2184.
- Mizusawa Y., Horie M., Wilde A. // Circulation J. 2014. V. 78. P. 2827–2833.
- Priori S., Blomstrom-Lunqvist C., Mazzanti A., Blom N., Borggrefe M., Camm J., Elliott P.M., Fitzsimons D., Hatala R., Hindricks G., et al. // Eur. Heart J. 2015. V. 36. № 41. P. 2793–2867. doi: 10.1093/eurheartj/ehv316.
- Giudicessi J.R., Ackerman M.J. // Curr. Probl. Cardiol. 2013. V. 38. № 10. P. 417–455. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2013.08.001.
- Priori S.G., Wilde A.A., Horie M., Cho Y., Behr E.R., Berul C., Blom N., Brugada J., Chiang C.E., Huikuri H., Kannankeril P., Krahn A., Leenhardt A., et al. // Europace. 2013. V. 15. P. 1389–1406.
- Schwartz P.J., Priori S.G., Cerrone M., Spazzolini C., Odero A., Napolitano C., Bloise R., De Ferrari G.M., Klersy C., Moss A.J., et al. // Circulation. 2004. V. 109. P. 1826–1833.
- Schwartz P.J., Spazzolini C., Priori S.G., Crotti L., Vicentini A., Landolina M., Gasparini M., Wilde A.A., Knops R.E., Denjoy I., et al. // Circulation. 2010. V. 122. P. 1272–1282.
- Schwartz P.J., Crotti L., Insolia R. // Circ. Arrhythm. Electrophysiol. 2012. V. 5. P. 868–877.
- Adeniran I., Hancox J.C., Zhang H. // Front. Physiol. 2013. V. 4. Art. 166. P. 1–16. doi: 10.3389/fphys.2013.00166.
- Crotti L., Taravelli E., Girardengo G., Schwartz P. // Indian Pacing Electrophysiol. J. 2010. V. 10. № 2. P. 86–95.
- Nielsen M.W., Holst A.G., Olesen S.P., Olesen M.S. // Front. Physiol. 2013. V. 15. № 4. Art. 179. P. 1–11.
- Brugada R., Campuzano O., Sarquella-Brugada G., Brugada J., Brugada P. // Methodist Debaquey Cardiovasc. J. 2014. V. 10. № 1. P. 25–28.
- Kaplinger J.D., Tester D.J., Alders M., Benito B., Berthet M., Brugada J., Brugada P., Fressart V., Guerchicoff A., Harris-Kerr C., et al. // Heart Rhythm. 2010. V. 7. № 1. P. 33–46.

32. Baroudi G., Pouliot V., Denjoy I., Guicheney P., Shrier A., Chahine M. // *Circ. Res.* 2001. V. 88. P. E78–E83.
33. Бокерия Л.А., Бокерия О.Л., Киртбая Л.Н. // *Анналы аритмологии.* 2010. № 3. С. 16–30.
34. Laitinen P.J., Brown K.M., Piippo K., Swan H., Devaney J.M., Brahmbhatt B., Donarum E.A., Marino M., Tiso N., et al. // *Circulation.* 2001. V. 103. P. 485–490.
35. Probst V., Veltmann C., Eckardt L., Meregalli P.G., Gaita F., Tan H.L., Babuty D., Sacher F., Giustetto C., Schulze-Bahr E., et al. // *Circulation.* 2010. V. 121. № 5. P. 635–643.
36. Brugada J., Brugada R., Antzelevitch C., Towbin J., Nademanee K., Brugada P. // *Circulation.* 2002. V. 105. № 1. P. 73–78.
37. Naseef A., Behr E.R., Batchvarov V.N. // *J. Saudi Heart Assoc.* 2015. V. 27. P. 96–108.
38. Priori S.G., Gasparini M., Napolitano C., Della Bella P., Ottone A.G., Sassone B., Giordano U., Pappone C., Mascioli G., Rossetti G., et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012. V. 59. № 1. P. 37–45.
39. Letsas K.P., Liu T., Shao Q., Korantzopoulos P., Giannopoulos G., Vlachos K., Georgopoulos S., Trikas A., Efremidis M., Deftereos S., et al. // *Am. J. Cardiol.* 2015. V. 116. № 1. P. 98–103. doi: 10.1016/j.amjcard.2015.03.044.
40. Priori S.G., Napolitano C., Memmi M. // *Circulation.* 2002. V. 106. P. 69–74.
41. Liu N., Colombi B., Memmi M., Zissimopoulos S., Rizzi N., Negri S., Imbriani M., Napolitano C., Lai F.A., Priori S.G. // *Circ. Res.* 2006. V. 99. № 3. P. 292–298.
42. Бокерия Е.Л. // *Анналы аритмологии.* 2005. № 4. С. 30–35.
43. Бокерия Л.А., Бокерия О.Л., Заварина А.Ю., Кудзоева З.Ф. // *Анналы аритмологии.* 2010. № 4. С. 5–16.
44. Бокерия Л.А., Бокерия О.Л., Киртбая Л.Н. // *Анналы аритмологии.* 2009. № 4. С. 7–20.
45. Bhonsale A., Groeneweg J.A., James C.A., Dooijes D., Tichnell C., Jongbloed J.D., Murray B., te Riele A.S., van den Berg M.P., Bikker H., et al. // *Eur. Heart J.* 2015. V. 36. № 14. P. 847–855. doi: 10.1093/eurheartj/ehu509.
46. Calkins H. // *Circ. J.* 2015. V. 79. № 5. P. 901–913. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0288.
47. Marcus F.I., McKenna W.J., Sherrill D., Basso C., Bauce B., Bluemke D.A., Calkins H., Corrado D., Cox M.G., Daubert J.P., et al. // *Circulation.* 2010. V. 121. P. 1533–1541.
48. Bhonsale A., James C.A., Tichnell C., Murray B., Gagarin D., Philips B., et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011. V. 58. P. 1485–1496.
49. Philips B., Te Riele A.S., Sawant A., Karedy V., James C.A., Murray B., et al. // *Heart Rhythm.* 2015. V. 12. P. 716–725.
50. Hocini M., Pison L., Proclemer A., Larsen T.B., Madrid A. // *Europace.* 2014. V. 16. P. 600–603. doi: 10.1093/europace/euu074.

УДК 577.21

Повреждения ДНК при тепловом стрессе

О. Л. Кантидзе^{1*}, А. К. Величко¹, А. В. Лужин¹, С. В. Разин^{1,2*}

¹Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

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

*E-mail: kantidze@gmail.com; sergey.v.razin@usa.net

Поступила в редакцию 17.12.2015

Принята к печати 17.02.2016

РЕФЕРАТ Хотя механизмы клеточного ответа на тепловой стресс изучаются уже несколько десятилетий, многое остается неясным. Это связано с тем, что основное внимание было сконцентрировано на изучении белков и факторов теплового шока, их участии в регуляции транскрипции, поддержании белкового гомеостаза и т.д. В последнее время достигнут определенный прогресс в исследовании влияния теплового стресса на целостность ДНК. В обзоре охарактеризованы и обсуждены известные и потенциальные механизмы образования различных повреждений ДНК при тепловом стрессе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ДНК-топоизомеразы, повреждение ДНК, репарация ДНК, репликация ДНК, тепловой шок.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОЦР – одноцепочечные разрывы ДНК; ДЦР – двухцепочечные разрывы ДНК; top1 – ДНК-топоизомераза I; top2 – ДНК-топоизомераза II.

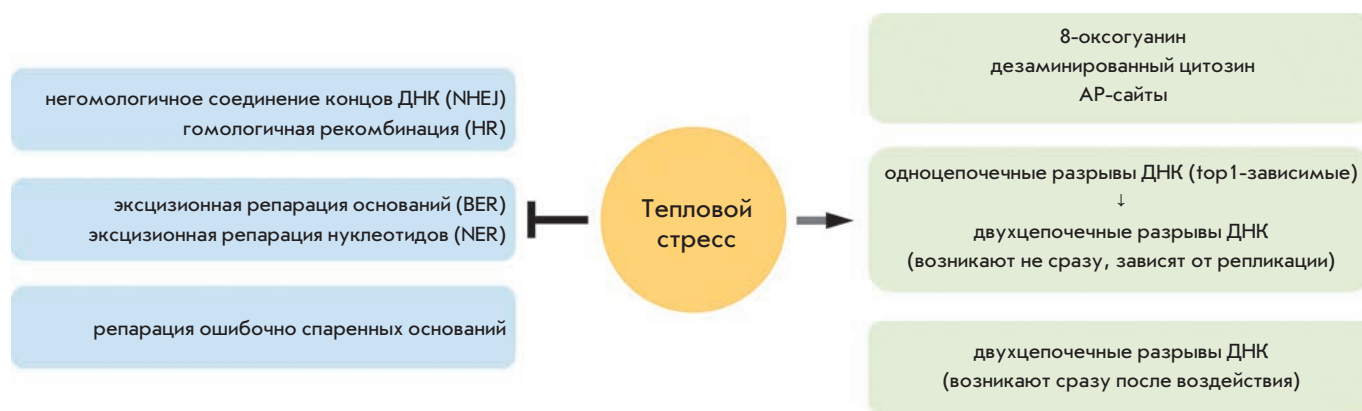
ВВЕДЕНИЕ

Тепловой стресс (тепловой шок, гипертермия) – один из наиболее хорошо изученных комплексных стресс-факторов. В реакции клетки на тепловой стресс участвует большинство субклеточных компартментов и метаболических процессов [1–3]. Давно известно, что клетки, подвергнутые тепловому стрессу, обладают повышенной чувствительностью к агентам, индуцирующим двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР), в частности к ионизирующей радиации [4, 5]. Это явление получило название «температурная радиочувствительность». Предполагалось, что причина этого эффекта заключается в способности теплового стресса ингибировать системы репарации ДНК [5]. Действительно, за несколько десятилетий обнаружено, что тепловой стресс способен ингибировать ключевые компоненты практически всех систем репарации (*рисунк*). Тепловой стресс подавляет активность систем эксцизионной репарации оснований (BER, base excision repair) [6–9] и нуклеотидов (NER, nucleotide excision repair) [10, 11]. Наиболее изучено действие теплового стресса на эксцизионную репарацию оснований: тепловой стресс может непосредственно инактивировать ДНК-полимеразу β и некоторые ДНК-гликозилазы [6, 9]. Недавно получили свидетельства того, что тепловой стресс может также ингибировать систему репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair) [12].

Наибольший вклад в температурную радиочувствительность вносит подавление систем репарации ДЦР, которое происходит при тепловом стрессе. Известно, что тепловой стресс подавляет работу систем как не-гомологичного соединения концов ДНК (NHEJ, non-homologous end joining), так и гомологичной рекомбинации (HR, homologous recombination). В случае NHEJ влияние теплового стресса ограничивается комплексом ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK): показано, что гипертермия может приводить к агрегации гетеродимера Ku70/80 (и соответственно к уменьшению его ДНК-связывающей активности), подавлению экспрессии Ku80 и/или к ингибированию каталитической субъединицы DNA-PK [13–15]. Иначе обстоит дело с HR – тепловой стресс способен ингибировать эту систему репарации на нескольких ключевых этапах [16]. Вопросам влияния гипертермии на системы репарации высших эукариот посвящен недавно опубликованный обзор П.М. Кравчик и соавт. [17], к которому мы и адресуем читателей. Основным же предметом нашего мини-обзора будет вопрос о прямых повреждениях ДНК, которые способен индуцировать тепловой стресс (*рисунк*).

ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК ПРИ ТЕПЛОМ СТРЕССЕ

Тепловой стресс может не только ингибировать систему репарации ДНК, но и выступать в качестве по-



Влияние теплового стресса на целостность ДНК и системы репарации (подробнее см. текст)

вреждающего ДНК агента. Так, известно, что тепловой стресс может приводить к накоплению в клетке 8-оксогуанина, дезаминированного цитозина и апуриновых участков ДНК (AP-сайтов) [18–20]. Можно представить, что подобные повреждения ДНК, как и одноцепочечные разрывы ДНК (ОЦР), пассивно накапливаются в клетке в результате ингибирования тепловым стрессом систем эксцизионной репарации. Более интересным и дискуссионным является вопрос о природе индуцированных тепловым стрессом ДЦР в ДНК, а также о возможности активной индукции тепловым стрессом ОЦР. Долгое время считалось, что тепловой стресс не индуцирует ДЦР, а приводит только к возникновению ОЦР, которые образуются в результате ингибирования гипертермией процесса репликации ДНК [21–23]. С помощью нескольких комплементарных подходов (метод ДНК-комет, флуоресцентное мечение разрывов с помощью ДНК-полимеразы I) мы показали, что тепловой стресс действительно индуцирует ОЦР в клетках, находящихся в S-фазе клеточного цикла [24]. В той же работе показано, что гипертермия способна ингибировать репликацию ДНК: в зависимости от температуры и клеточной линии тепловой стресс приводит либо к замедлению, либо к аресту репликативных вилок [24]. Стоит, однако, отметить, что возникновение ОЦР в S-фазных клетках не связано с ингибированием тепловым стрессом репликации ДНК [25]. Недавно мы идентифицировали механизм возникновения ОЦР при тепловом стрессе. Оказалось, что тепловой стресс индуцирует ОЦР путем ингибирования ДНК-топоизомеразы I (top1), фермента, релаксирующего супервитки в молекуле ДНК, внося временный ОЦР [25]. В ходе каталитического цикла top1 происходит разрезание одной цепи ДНК и образование промежуточного ковалентно связанного комплекса фермента

с ДНК. Стабилизация такого комплекса является основным механизмом генотоксического действия ядов top1 (например, камптотецина и его производных) [26, 27]. Тепловой стресс (45°C) не только способен подавлять каталитическую активность фермента, он приводит к накоплению в клетке ковалентно связанных комплексов top1 и ДНК. Можно заключить, что действие гипертермии на top1 схоже с действием ядов, с той лишь разницей, что тепловой стресс, вероятно, подавляет активность top1 на всех стадиях каталитического цикла. Хотя известно, что top1 может связываться с уже существующими в клетке ОЦР [28, 29], в случае теплового стресса именно она является причиной их возникновения. Наиболее убедительные доказательства этого получены в опытах по подавлению экспрессии фермента с помощью РНК-интерференции [25]. Показано, что в условиях сниженной экспрессии top1 не активируется программа клеточного старения, зависящего от индукции ОЦР и их конвертации в персистирующие ДЦР [25]. Это свидетельствует о том, что в клетках, не экспрессирующих top1, не происходит образования ОЦР при тепловом стрессе. Таким образом, роль top1 в образовании индуцированных тепловым стрессом ОЦР кажется нам вполне очевидной. Интересно также и то, что в клетках HeLa ковалентно связанные комплексы top1 с ДНК эффективно образуются только при температурах выше 44°C. Таким образом, при клинически релевантных температурах – 41–43°C – не должно происходить образования ОЦР. Тот факт, что возникновение ОЦР при тепловом стрессе в основном наблюдается в клетках, находящихся в S-фазе клеточного цикла, обусловлен тем, что основная функция top1 – разрешение топологических проблем, возникающих в ходе репликации ДНК. Можно утверждать, что чувствительность неделя-

щихся клеток (терминально дифференцированных, арестованных на стадии G0 и т.д.) в смысле возникновения ОЦР должна быть существенно снижена. Она не может полностью отсутствовать, так как функции top1 в клетке не ограничены процессом репликации ДНК. В связи с этим стоит отметить, что индукция тепловым стрессом ОЦР, вероятно, происходит не только в S-фазе клеточного цикла – ОЦР возникают и в G1- и G2-фазах, однако с крайне малой частотой. Согласно нашим неопубликованным данным, количество возникающих ОЦР при тепловом стрессе в разных клеточных линиях напрямую коррелирует с уровнем экспрессии top1. Суммируя полученные данные, можно утверждать, что тепловой стресс ингибирует активность top1 *in vivo* и приводит к формированию ковалентно связанных комплексов между ферментом и ДНК и, как следствие, к образованию ОЦР.

ДВУХЦЕПОЧНЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК ПРИ ТЕПЛОМ СТРЕССЕ

Возникающие при тепловом стрессе ОЦР служат источником образования ДЦР. Такие ДЦР обладают несколькими интересными характеристиками – они специфичны для S-фазы клеточного цикла и возникают в клетке не сразу после воздействия теплового стресса, а спустя 3–6 ч [25]. Эти отсроченные ДЦР возникают вследствие столкновения репликативных вилок, возобновивших движение после индуцированного тепловым стрессом ареста, с ОЦР, которые образуются в результате ингибирования top1 [25]. Замедленная кинетика образования таких ДЦР, с одной стороны, связана с ингибированием при тепловом стрессе репликации ДНК, а с другой, с подавлением процесса транскрипции [25]. Процесс активной транскрипции необходим для детекции и последующего снятия комплекса top1, ковалентно связанного с ДНК, что приводит к демаскированию ОЦР и создает возможность для столкновения с ними репликативных вилок [30, 31]. Судя по всему, отсроченные ДЦР эффективно распознаются клеточными системами, о чем свидетельствуют АТМ/АТР-зависимое фосфорилирование H2AX (маркер ДЦР) и последующее привлечение других факторов репарации к сайту разрыва (53BP1, Rad51 и др.). Тем не менее репарация таких повреждений не происходит, что приводит к существованию в клетке постоянного сигнала о повреждении ДНК и, как следствие, к запуску программы преждевременного клеточного старения [25, 32].

Таким образом, нами впервые установлен механизм формирования отсроченных ДЦР в результате действия теплового стресса. Однако вопрос о том, может ли тепловой стресс немедленно индуциро-

вать ДЦР, долгое время оставался дискуссионным. В течение последних лет в разных лабораториях показано, что тепловой стресс может индуцировать фосфорилирование гистона H2AX [33–37], являющееся одним из первых событий в процессах узнавания и репарации ДЦР [38, 39]. Тем не менее интерпретация этих результатов достаточно противоречива: некоторые утверждают, что фокусы γ H2AX маркируют ДЦР, индуцированные температурой [34, 37]; другие склонны считать, что тепловой шок сам по себе не приводит к повреждению ДНК, а γ H2AX в этом случае является побочным продуктом клеточного ответа на стресс [33, 35, 36]. Недавно нами доказана способность гипертермии провоцировать образование ДЦР [24, 40]. Это подтверждено с использованием двух независимых подходов: метода ДНК-комет и техники мечения концов ДНК терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой. Однако эффект температурной индукции ДЦР характерен только для клеток, находящихся в G1- и G2-фазах клеточного цикла. Эти ДЦР маркируются АТМ-зависимым фосфорилированием H2AX [24]. Интересно, что сразу после воздействия гипертермии не наблюдается привлечения к фокусам γ H2AX других факторов репарации, в частности белка 53BP1 [24, 41]. В то же время такие ДЦР достаточно эффективно репарируются в течение первых 3–6 ч после теплового стресса. Вероятно, это означает, что активная репарация индуцированных тепловым стрессом ДЦР начинается не сразу после воздействия, а спустя некоторое время после функционального восстановления ингибированных тепловым стрессом систем репарации. До сих пор, однако, не ясно, каков механизм (медиатор) немедленного формирования ДЦР в условиях теплового стресса. В качестве возможных кандидатов на эту роль можно рассматривать такие процессы, как активация ретроэлементов [42, 43], генерация активных форм кислорода [18], остановка транскрипции [44, 45]. Выше перечислены процессы, которые, как известно, могут приводить к образованию ДЦР и, при определенных условиях, происходить при тепловом стрессе. Тем не менее ни одна из этих гипотез не может убедительно объяснить индукцию тепловым стрессом ДЦР в не-S-фазных клетках. На наш взгляд, наиболее вероятный механизм формирования индуцированных тепловым стрессом ДЦР состоит в подавлении активности ДНК-топоизомеразы II (top2), фермента, изменяющего топологию ДНК путем внесения временных ДЦР [46]. Такие разрывы сопровождаются образованием ковалентной связи между молекулой белка и одним из концов цепи ДНК. Ингибирование top2 на стадии ковалентно связанного комплекса приводит к обра-

зованию ДЦР [46]. Достаточно давно получены данные о том, что тепловой стресс может ингибировать активность *top2 in vitro* [47]. Тот факт, что тепловой стресс может снижать генотоксический потенциал ядов *top2*, также свидетельствует о влиянии гипертермии на этот фермент [48]. Существуют две изоформы *top2*, причем экспрессия одной из них зависит от стадии клеточного цикла [49, 50]. Такая динамика экспрессии могла бы легко объяснить зависимость индукции ДЦР от фазы клеточного цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно утверждать, что, помимо комплексного подавления почти всех систем репарации в клетках высших эукариот, тепловой стресс напрямую приводит к образованию различных поврежденных ДНК. Интересно, что тип и судьба индуцируемых тепловым стрессом повреждений зависят от стадии

клеточного цикла, на которой клетка подверглась действию высоких температур. Так, в S-фазе клеточного цикла гипертермия приводит к *top1*-зависимому образованию ОЦР, часть из которых спустя несколько часов может конвертироваться в сложно репарируемые ДЦР. В то же время тепловой стресс немедленно индуцирует ДЦР в клетках, находящихся на стадии G1 или G2 клеточного цикла. Несмотря на то что в общем виде описываемая схема действия теплового стресса характерна для всех проанализированных нами клеточных линий, стоит все же иметь в виду, что количество разрывов и степень репарационного ответа клетки могут очень сильно варьировать в зависимости от силы теплового стресса и типа (линии) клеток. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-24-00022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Richter K., Haslbeck M., Buchner J. // *Mol. Cell*. 2010. V. 40. P. 253–266.
- Velichko A.K., Markova E.N., Petrova N.V., Razin S.V., Kantidze O.L. // *Cell Mol. Life Sci*. 2013. V. 70. P. 4229–4241.
- Кантидзе О.Л., Величко А.К., Разин С.В. // *Биохимия*. 2015. V. 80. P. 1181–1185.
- Dewey W.C., Sapareto S.A., Betten D.A. // *Radiat. Res*. 1978. V. 76. P. 48–59.
- Iliakis G., Wu W., Wang M. // *Int. J. Hyperthermia*. 2008. V. 24. P. 17–29.
- Dikomey E., Becker W., Wielckens K. // *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med*. 1987. V. 52. P. 775–785.
- Raaphorst G.P., Feeley M.M., Chu G.L., Dewey W.C. // *Radiat. Res*. 1993. V. 134. P. 331–336.
- Batuello C.N., Kelley M.R., Dynlacht J.R. // *Anticancer Res*. 2009. V. 29. P. 1319–1325.
- Fantini D., Moritz E., Auvre F., Amouroux R., Campalans A., Epe B., Bravard A., Radicella J.P. // *DNA Repair (Amst.)*. 2013. V. 12. P. 227–237.
- Hettinga J.V., Konings A.W., Kampinga H.H. // *Int. J. Hyperthermia*. 1997. V. 13. P. 439–457.
- Muenyi C.S., States V.A., Masters J.H., Fan T.W., Helm C.W., States J.C. // *J. Ovarian Res*. 2011. V. 4. P. 9.
- Nadin S.B., Cuello-Carrion F.D., Sottile M.L., Ciocca D.R., Vargas-Roig L.M. // *Int. J. Hyperthermia*. 2012. V. 28. P. 191–201.
- Burgman P., Ouyang H., Peterson S., Chen D.J., Li G.C. // *Cancer Res*. 1997. V. 57. P. 2847–2850.
- Qi D., Hu Y., Li J., Peng T., Su J., He Y., Ji W. // *PLoS One*. 2015. V. 10. P. e0122977.
- Ihara M., Takeshita S., Okaichi K., Okumura Y., Ohnishi T. // *Int. J. Hyperthermia*. 2014. V. 30. P. 102–109.
- Eppink B., Krawczyk P.M., Stap J., Kanaar R. // *Int. J. Hyperthermia*. 2012. V. 28. P. 509–517.
- Oei A.L., Vriend L.E., Crezee J., Franken N.A., Krawczyk P.M. // *Radiat. Oncol*. 2015. V. 10. P. 165.
- Bruskov V.I., Malakhova L.V., Masalimov Z.K., Chernikov A.V. // *Nucleic Acids Res*. 2002. V. 30. P. 1354–1363.
- Lindahl T., Nyberg B. // *Biochemistry*. 1974. V. 13. P. 3405–3410.
- Warters R.L., Brizgys L.M. // *J. Cell Physiol*. 1987. V. 133. P. 144–150.
- Corry P.M., Robinson S., Getz S. // *Radiology*. 1977. V. 123. P. 475–482.
- Jorritsma J.B., Konings A.W. // *Radiat. Res*. 1984. V. 98. P. 198–208.
- Warters R.L., Brizgys L.M., Axtell-Bartlett J. // *J. Cell Physiol*. 1985. V. 124. P. 481–486.
- Velichko A.K., Petrova N.V., Kantidze O.L., Razin S.V. // *Mol. Biol. Cell*. 2012. V. 23. P. 3450–3460.
- Velichko A.K., Petrova N.V., Razin S.V., Kantidze O.L. // *Nucleic Acids Res*. 2015. V. 43. P. 6309–6320.
- Pommier Y. // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6. P. 789–802.
- Ashour M.E., Atteya R., El-Khamisy S.F. // *Nat. Rev. Cancer*. 2015. V. 15. P. 137–151.
- Lebedeva N., Rechkunova N., Boiteux S., Lavrik O. // *IUBMB Life*. 2008. V. 60. P. 130–134.
- Lebedeva N., Auffret Vander Kemp P., Bjornsti M.A., Lavrik O., Boiteux S. // *DNA Repair (Amst.)*. 2006. V. 5. P. 799–809.
- Lin C.P., Ban Y., Lyu Y.L., Desai S.D., Liu L.F. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. P. 21074–21083.
- Lin C.P., Ban Y., Lyu Y.L., Liu L.F. // *J. Biol. Chem*. 2009. V. 284. P. 28084–28092.
- Petrova N.V., Velichko A.K., Razin S.V., Kantidze O.L. // *Cell Cycle*. 2016. V. 15. P. 337–344.
- Hunt C.R., Pandita R.K., Laszlo A., Higashikubo R., Agarwal M., Kitamura T., Gupta A., Rief N., Horikoshi N., Baskaran R., et al. // *Cancer Res*. 2007. V. 67. P. 3010–3017.
- Kaneko H., Igarashi K., Kataoka K., Miura M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005. V. 328. P. 1101–1106.
- Laszlo A., Fleischer I. // *Int. J. Hyperthermia*. 2009. V. 25. P. 199–209.
- Laszlo A., Fleischer I. // *Cancer Res*. 2009. V. 69. P. 2042–2049.
- Takahashi A., Mori E., Somakos G.I., Ohnishi K., Ohnishi T. // *Mutat. Res*. 2008. V. 656. P. 88–92.
- Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. // *J. Cell. Biol*. 1999. V. 146. P. 905–916.

39. Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 5858–5868.
40. Величко А.К., Разин С.В., Кантидзе О.Л. // *ДАН.* 2013. V. 450. P. 224–227.
41. Petrova N.V., Velichko A.K., Kantidze O.L., Razin S.V. // *Cell Biol. Int.* 2014. V. 38. P. 675–681.
42. Belgnaoui S.M., Gosden R.G., Semmes O.J., Haoudi A. // *Cancer Cell Int.* 2006. V. 6. P. 13.
43. Gasior S.L., Wakeman T.P., Xu B., Deininger P.L. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 357. P. 1383–1393.
44. Sordet O., Nakamura A.J., Redon C.E., Pommier Y. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. P. 274–278.
45. Sordet O., Redon C.E., Guirouilh-Barbat J., Smith S., Solier S., Douarre C., Conti C., Nakamura A.J., Das B.B., Nicolas E., et al. // *EMBO Rep.* 2009. V. 10. P. 887–893.
46. Nitiss J.L. // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. V. 9. P. 338–350.
47. Osheroff N., Shelton E.R., Brutlag D.L. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 9536–9543.
48. Kampinga H.H. // *Br. J. Cancer.* 1995. V. 72. P. 333–338.
49. Goswami P.C., Roti Roti J.L., Hunt C.R. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 1500–1508.
50. Kimura K., Saijo M., Ui M., Enomoto T. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 1173–1176.

УДК 577.214.6

Роль проходящей транскрипции в активности PRE у *Drosophila melanogaster*

П. В. Елизарьев, Д. В. Ломаев, Д. А. Четверина, П. Г. Георгиев, М. М. Ерохин*

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

*E-mail: yermahbio@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.02.2016

Принята к печати 08.04.2016

РЕФЕРАТ Поддержание индивидуальных профилей экспрессии генов в клетках разного типа необходимо для дифференцировки и развития многоклеточных организмов. Экспрессия многих генов контролируется белками групп Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG), которые действуют посредством ассоциации с хроматином. Мишенями PcG/TrxG-факторов являются ДНК-элементы, названные PRE (Polycomb Response Elements), активность которых можно модулировать, переключая их с репрессии на активацию. В данной работе проанализировано влияние проходящей транскрипции на переключение активности PRE, опосредованное дрожжевым активатором транскрипции GAL4. Показано, что терминатор транскрипции, встроенный между промотором и PRE-элементом, не препятствует переключению PRE с репрессии на активацию. Вне зависимости от ориентации PRE сильная транскрипция в отсутствие терминатора не приводит к удалению белков PcG/TrxG с PRE. Таким образом, транскрипция не имеет определяющего значения в переключении активности PRE.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Polycomb, Trithorax, PRE, *Drosophila*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PcG – белки группы Polycomb; TrxG – белки группы Trithorax; *bxd* – *bithoraxoid*.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе развития многоклеточных организмов паттерн экспрессии генов в клетках разного типа устанавливается на ранних стадиях развития и затем поддерживается на протяжении многих клеточных делений. За стабильное наследование правильного паттерна отвечают белки групп Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG). Белки PcG обуславливают репрессию, а TrxG – активацию транскрипции [1–4]. У дрозофилы эти факторы связываются с ДНК-элементами, называемыми PRE (Polycomb Response Elements). Элементы PRE содержат сайты различных ДНК-связывающих факторов, привлечение которых приводит к ассоциации комплексов PcG/TrxG с PRE [5, 6]. Белки группы Polycomb представлены тремя основными комплексами: PRC1, PRC2 и PhoRC [2, 3]. Коровыми субъединицами комплекса PRC1 являются факторы PC, PH, dRing и Psc [7–9]. Комплекс PRC2 содержит коровые компоненты E(z), Esc, Su(z)12 и Caf1 [10–13]. В состав комплекса PhoRC входят dSfmbt и ДНК-связывающий фактор Pho [14]. Комплекс PRC2 триметирует лизин 27 в составе гистона H3 (H3K27me3) за счет SET-домена каталитической субъединицы E(z) [10–13]. Модификация

H3K27me3 маркирует участки хроматина, репрессированного PcG [15, 16]. Факторы группы TrxG представляют собой гетерогенную группу, в которую входят белки Trx, Trr, dCBP, Ash1, UTX и ДНК-связывающий фактор GAF, известный также как Trl (Trithorax-like) [17].

PRE – это модулируемые элементы, репрессорную активность которых в трансгенных системах можно выключить либо энхансерами, либо экзогенным активатором GAL4 дрожжей [18–24]. Ранее было выдвинуто предположение, что инактивация репрессии обеспечивается за счет индукции активатором GAL4 транскрипции через PRE, что, в свою очередь, приводит к «сбрасыванию» PRE-ассоциированных репрессорных факторов с ДНК за счет прохождения РНК-полимеразы II и факторов транскрипции [24].

Однако недавно нами было показано, что даже сильная проходящая транскрипция не приводит к полной элиминации белков с PRE-элемента *bxd* размером 660 п.н. в трансгенных конструкциях *Drosophila* [21]. Установлено, что проходящая транскрипция начиналась с минимального промотора гена *hsp70*, находящегося под контролем пяти сайтов связывания белка GAL4. При этом инактивация

опосредованной PRE репрессии не зависела от того, направлена ли индуцируемая GAL4 транскрипция в сторону *bxdPRE* или нет.

В представленной работе показано, что блокирование проходящей через *bxdPRE* транскрипции терминатором SV40 не препятствует инактивации PRE. Также протестировано значение ориентации *bxdPRE* при проходящей транскрипции. Установлено, что и в обратной ориентации *bxdPRE* проходящая через него транскрипция не приводит к элиминации факторов PcG/TrxG.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание плазмидных конструкций

Все конструкции созданы на основе вектора CaSpeR, содержащего ген *white* с неполной делецией первого интрона (кодирует полноценный продукт гена *white*) [25]. Эхансер гена *white* (Ee), находящийся в геноме в положении -1180...-1849 п.н. относительно старта транскрипции гена *white* [26], был вырезан из плазмиды Ee-pBluescript SK+ [27] и встроен в прямой ориентации в вектор CaSpeR4 по NotI-сайту [En-*white*].

Фрагмент SmaI-SalI длиной 4324 п.н. плазмидного вектора CaSpeR-hs43-lacZ, содержащий ген *lacZ* с лидерной областью *adh* и терминатор транскрипции SV40 на 3'-конце (GenBank: X81643.1), был встроен в вектор pBluescript SK+ по SmaI- и SalI-сайтам [LacZ-SV40-pSK].

Промотор гена *hsp26* длиной 472 п.н. амплифицировали с помощью ПЦП (праймеры 5'-ctagaacttcg-gctctctca-3' и 5'-gttgaatgaactgtttgactgt-3') и встроили в вектор pBluescript SK+ по сайту эндонуклеазы рестрикции EcoRV [hsp26-pSK]. Фрагмент HindIII-PstI вектора hsp26-pSK встраивали в вектор LacZ-SV40-pSK по SmaI-сайту [hsp26-LacZ-SV40-pSK]. Фрагмент NotI-SalI вектора hsp26-LacZ-SV40-pSK встраивали в вектор En-*white* по BamHI-сайту [hsp26-LacZ-SV40-En-*white*].

Фрагмент HindIII-EcoRI, содержащий минимальный промотор гена *hsp70* и пять сайтов GAL4 с 5'-стороны, вырезали из вектора pUAST [28] и встраивали в вектор pBluescript SK+-sce2 по EcoRV-сайту [sce(UAS)]. Кодировочную область гена *eGFP* длиной 717 п.н. амплифицировали с помощью ПЦП (праймеры 5'-atggtgagcaagggcgaggagct-3' и 5'-ctgttacagctc-gtccatgccga-3') и клонировали в вектор pBluescript SK+ по EcoRV-сайту [eGFP-pSK].

Фрагмент HindIII-EcoRI вектора eGFP-pSK встраивали в прямой ориентации в вектор sce(UAS) по HincII-сайту [(UAS)sce-eGFP].

Фрагмент XbaI-BamHI длиной 702 п.н. вектора pUAST, содержащего терминатор транскрипции,

был встроен в вектор pBluescript SK+-lox2 по сайту эндонуклеазы рестрикции EcoRV [lox(SV40)]. Фрагмент XbaI-XbaI вектора lox(SV40) встроен в вектор (UAS)sce-eGFP по XhoI-сайту [(UAS)sce-eGFP-lox(SV40)].

Фрагмент HincII-HincII длиной 1828 п.н. вектора LacZ-SV40-pSK был встроен в вектор pBluescript SK+ по сайту эндонуклеазы рестрикции EcoRV [linker1828bp-pSK]. Фрагмент XbaI-BamHI длиной 222 п.н. вектора pGL3basic, содержащего терминатор транскрипции SV40, встраивали в вектор linker1828bp-pSK по SmaI-сайту [linker1828-SV40s-pSK].

Фрагмент NotI-BamHI вектора (UAS)sce-eGFP-lox(SV40) был встроен в вектор linker1828-SV40s-pSK по EcoRV-сайту [(UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker1828-SV40s-pSK].

Фрагмент HincII-XbaI, содержащий *bxdPRE* длиной 656 п.н. (3R:16764122..16764777), был вырезан из вектора frt(PRE) [29] и встроен в вектор (UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker1828-SV40s-pSK по AorI-сайту в прямой [(UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker785frt(PREdir)linker1043-SV40s-pSK] или обратной [(UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker785frt(PRErev)linker1043-SV40s-pSK] ориентации.

Конструкция UDTPD. Фрагмент XbaI-XbaI вектора (UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker785frt(PREdir)-linker1043-SV40s-pSK был встроен в вектор hsp26-LacZ-SV40-En-*white* по BamHI-сайту.

Конструкция UDTPR. Фрагмент XbaI-XbaI вектора (UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker785frt(PRErev)-linker1043-SV40s-pSK встраивали в вектор hsp26-LacZ-SV40-En-*white* по BamHI-сайту.

Все детали создания конструкций могут быть предоставлены по запросу.

Трансформация эмбрионов *Drosophila melanogaster* и фенотипический анализ экспрессии генов *yellow* и *white* в трансгенных линиях

ДНК-конструкции и P-элемент с дефектными инвертированными повторами *P25.7ws*, использованный как источник транспозазы [30], инъецировали в линию *y^{1w118}* на стадии пребластодермального эмбриона согласно [31, 32]. Выживших мух скрещивали с линией *y^{1w118}*. Трансгенных мух отбирали по фенотипическому проявлению экспрессии гена *white*. Количество копий определяли методом Саузерн-блот-гибридизации с фрагментом гена *white*. Отбирали линии, содержащие одну копию конструкции на геном.

Для *in vivo* делеции фрагмента ДНК мух, содержащих конструкцию, скрещивали с трансгенными

мухами, экспрессирующими Flp (*w¹¹¹⁸*; *S2CyO*, *hs-FLP*, *ISA/Sco*; +) или рекомбиназу Cre (*y^{1w¹}*; *Cyo*, *P[w⁺, cre]/Sco*; +) [33, 34]. Правильность удаления фрагмента подтверждали с помощью ПЦР.

Для экспрессии *GAL4* под контролем тубулинового промотора использовали линию *yw¹¹¹⁸*; *P[w⁻, tub-GAL4]117/TM3,Sb*, производную Bloomington Stock Center #5138, из которой удален маркерный ген *mini-white* [35].

Экспрессию гена *white* определяли путем визуальной оценки пигментации глаз по стандартной шкале: красная окраска – пигментация глаз мух дикого типа (экспрессия гена *white* при полной стимуляции тканеспецифичным энхансером), белая окраска глаз наблюдается в отсутствие пигментации (полная инактивация гена *white*). Разная степень мозаичности проявляется при репрессии.

Для анализа фенотипов трансгенных мух использовали самцов в возрасте 3–5 дней после вылупления, развившихся при температуре 25°C. Все детали скрещиваний, использованных для генетического анализа и вырезаний функциональных элементов, могут быть предоставлены по запросу.

Иммунопреципитация хроматина (X-ChIP)

Для каждого эксперимента было отобрано 150–200 мг взрослых мух. Иммунопреципитацию хроматина проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [21].

Антитела

Антитела к белкам PH [к фрагменту 86–520 а.о., ph-p-PA]; dSfmbt [1–348 а.о., Sfmbt-PB] [27]; PC [к фрагменту 191–354 а.о., Pc-PA]; TRX-N [к фрагменту 8–351 а.о., trx-PA]; GAF [к фрагменту 1–519 а.о., Trl-PB] [21] получены в кроликах. Антитела к H3K27me3: Abcam (ab6002, ChIP Grade).

ПЦР в реальном времени с использованием Hot-Start Taq-ДНК-полимеразы

ПЦР в реальном времени проводили на приборе C1000tm ThermalCycler (Bio-Rad) в объеме 25 мкл по следующему протоколу (на одну реакцию): 2.5 мкл 10 × буфера (0.5 М Tris-HCl pH 8.8, 0.5 М KCl, 15 mM MgCl₂, 1% Tween 20), 2 мкл 25 mM MgCl₂, 0.5 мкл 10 mM dNTP, 1.5 мкл каждого праймера (в концентрации 5 пмоль/мкл), 0.25 мкл SYBR Green100× (Sigma), 0.3 мкл Hot-Start Taq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим»), 11.45 мкл mQ, 5 мкл пробы. Данные обсчитывали с использованием программы в приложении к прибору Bio-Rad CFX Manager и Microsoft Excel. В качестве известных стандартов использовали десятикратные разведения геномной ДНК дрозофилы в концентрации от 0.1 до 100 нг. Праймеры, ис-

пользованные для анализа материала, полученного при иммунопреципитации хроматина, методом ПЦР в реальном времени

1-ChIP forward	5'-gagaactctgaataggggaattgg-3'
1-ChIP reverse	5'-agctcctgcacctgctcaccat-3'
2-ChIP forward	5'-ccgaccactaccagcagaac-3'
2-ChIP reverse	5'-gtccatgccgagagtgatcc-3'
3-ChIP forward	5'-tctcgcacggtatcgataagcttg-3'
3-ChIP reverse	5'-ccataatggctgcccgtaaaag-3'
4-ChIP forward	5'-ggtgaaattatcgatgagcgtgg-3'
4-ChIP reverse	5'-cagttcaaccaccgcacgataga-3'
5-ChIP forward	5'-aaaactttctacgcctcagttc-3'
5-ChIP reverse	5'-gcttattagccctgcaattga-3'
6-ChIP forward	5'-gcaactggatattcattgaaacttatctg-3'
6-ChIP reverse	5'-tggacagagaaggaggcaaac-3'
<i>Ras64B</i> forward	5'-gagggattcctgctcgtcttcg-3'
<i>Ras64B</i> reverse	5'-gtcgcactgttaccaccatc-3'
<i>bxdPRE</i> adjacent forward (точка рядом с <i>bxdPRE</i> в геноме)	5'-aagagcaaggcgaagagagc-3'
<i>bxdPRE</i> adjacent reverse (точка рядом с <i>bxdPRE</i> в геноме)	5'-cgttttaagtgcgactgagatgg-3'

пользованные для анализа материала, полученного при иммунопреципитации хроматина, методом ПЦР в реальном времени, указаны в таблице.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Модельная система для изучения влияния транскрипции на рекрутирование белков групп Polycomb и Trithorax на PRE

Влияние проходящей транскрипции на активность PRE изучали в составе трансгенных конструкций, интегрированных в геном *D. melanogaster* путем микроинъекции плазмидной ДНК в эмбрионы, за счет фланкирующих трансген 5'- и 3'-концов Р-элемента. Использовали элемент *bxdPRE* размером 660 п.н. из регуляторной области гена *Ubx* [36, 37]. Этот PRE-элемент хорошо изучен и имеет четкие сайты связывания различных белков группы Polycomb/Trithorax (PcG/TrxG) [15, 21, 36, 37].

Созданы две конструкции, в которых *bxdPRE* встроен между UAS-промотором и репортерными генами: *lacZ* под контролем промотора гена *hsp26* и ген *white*. Маркерный ген *white* отвечает за пигментацию глаз. Транскрипцию данного гена усиливали, встраивая непосредственно перед ним тканеспецифичный энхансер, обеспечивающий повышенный уровень

экспрессии гена *white* в глазах мух. Для блокирования внутренних транскриптов трансгена использовали два терминатора: перед геном *hsp26-lacZ* и перед энхансером гена *white*. Для того чтобы заблокировать возможную транскрипцию в месте интеграции конструкции в геноме до индукции UAS, с 5'-стороны от *bxDPRE* встраивали дополнительный терминатор транскрипции SV40. В обеих конструкциях UAS-промотор направлен в сторону *bxDPRE*, однако в первой конструкции (UDTPD) *bxDPRE* находится в прямой ориентации, а во второй (UDTPR) – в обратной ориентации по отношению к UAS-промотору (рис. 1). UAS-промотор, применяемый для направленной транскрипции через *bxDPRE*, представляет собой минимальный промотор гена *hsp70*, перед которым расположены пять сайтов связывания дрожжевого активатора GAL4. Этот промотор является индуцибельным. При индукции UAS-промотора (путем скрещивания трансгенных линий с линией, несущей ген *GAL4* под контролем тубулинового промотора) достигается высокий уровень транскрипции.

Ключевые элементы – терминатор SV40 и *bxDPRE* – в обеих конструкциях фланкированы сайтом LOX или FRT для сайт-специфических рекомбиназ Cre или Flp соответственно. Такой подход позволяет *in vivo* удалять выбранные фрагменты ДНК и сравнивать экспрессию маркерного гена и функциональные изменения системы в присутствии и в отсутствие ключевых элементов в одном и том же месте инсерции трансгена в геном.

В результате трансформации конструкций получены четыре независимые трансгенные линии с *bxDPRE* в статусе репрессии для UDTPD (рис. 1А) и три – для UDTPR (рис. 1Б). Репрессия гена *white* усиливалась в гомозиготе. Этот эффект характерен для PRE-элементов и называется PSS (Pairing Sensitive Silencing) [38]. Фенотипы трансгенов UDTPD и UDTPR не отличались, т.е. эффекты не зависели от ориентации *bxDPRE*. Делеция терминатора транскрипции, находящегося между UAS-промотором и PRE, не привела к изменению фенотипов. Вместе с тем, индукция UAS-промотора с помощью GAL4 привела к дерепрессии гена *white* как и при делеции терминатора, так и в исходных линиях. Таким образом, в исследуемой системе GAL4 инактивирует *bxDPRE* вне зависимости от ориентации и присутствия терминатора между UAS-промотором и *bxDPRE*.

Транскрипция, проходящая через *bxDPRE*, не приводит к элиминированию факторов групп *Polycomb* и *Trithorax* с *bxDPRE*

Ранее мы показали, что даже сильная транскрипция не приводит к полной элиминации комплексов

PcG/TrxG с *bxDPRE*, если в трансгене он находится в прямой ориентации. Нами протестировано влияние проходящей транскрипции при противоположной ориентации *bxDPRE*. С этой целью применили метод иммунопреципитации хроматина, выделенного из взрослых мух, гомозиготных по конструкции, в присутствии и в отсутствие GAL4 (рис. 2). В ПЦР-анализе использовали шесть участков конструкции: 1 – UAS-промотор, 2 – кодирующая область гена *eGFP*, 3 – *bxDPRE*, 4 – кодирующая область гена *LacZ*, 5 – энхансер гена *white*, 6 – промотор гена *white*. В качестве положительного контроля взяли геномную область *bxDPRE*, расположенную рядом с элементом, использованным в трансгенных конструкциях, а в качестве отрицательного – кодирующую область гена *Ras64B*. Иммунопреципитацию проводили с материала, полученного из трансгенной линии UDTPR (№ 2), в которой делегирован терминатор транскрипции SV40 (рис. 2).

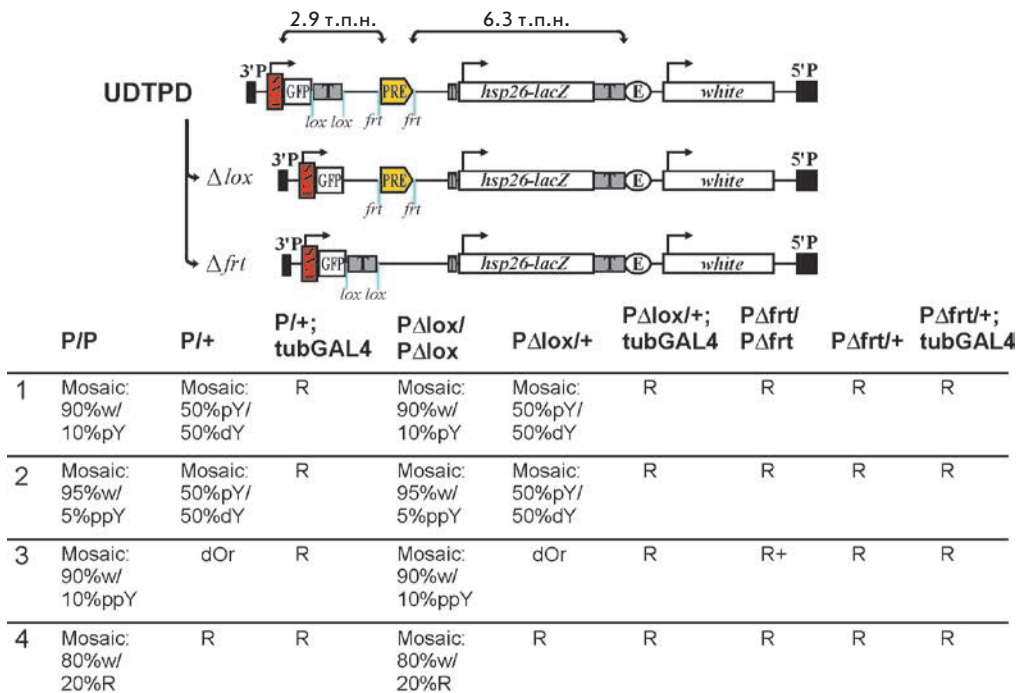
Показано, что пик связывания факторов PH (PRC1-комплекс, рис. 2А) и dSfmbt (PhoRC-комплекс, рис. 2Б) приходится на *bxDPRE* в составе трансгена. Локализация данных факторов согласуется с данными, согласно которым PH и dSfmbt обнаруживаются преимущественно на PRE-элементах, но не в других районах домена, подверженного репрессии [14, 15, 21, 39, 40].

При индукции транскрипции через *bxDPRE* уровень связывания данных факторов падает, однако не исчезает полностью. Аналогичный результат получен при анализе влияния транскрипции на рекрутирование факторов PH и dSfmbt на *bxDPRE*, расположенный в трансгене в прямой ориентации относительно UAS-промотора [21].

Фактор PC комплекса PRC1 специфически взаимодействует с гистоном 3, триметилированным по лизину в позиции 27 (H3K27me3) [41, 42]: модификацией, характерной для хроматина, репресслируемого белками PcG [16, 40]. Связывание фактора PC, так же как и H3K27me3, в отличие от остальных коровых компонентов PcG не ограничивается PRE и покрывает более широкую область, подверженную репрессии [16, 21, 40, 43]. В согласии, в производной трансгена UDTPR выявлен более широкий профиль распределения фактора PC (рис. 2В) и модификации H3K27me3 (рис. 2Г). Введение активатора GAL4 не привело к полному элиминированию PC и H3K27me3, однако наблюдалось значимое снижение уровня их рекрутирования на *bxDPRE* и окружающие области трансгена.

Дополнительно проанализировано связывание TrxG-факторов Trx (рис. 2Д) и GAF (рис. 2Е). Установлено, что индукция транскрипции через *bxDPRE* приводит к усилению связывания обоих факторов с *bxDPRE* примерно в 2 раза.

А



Б

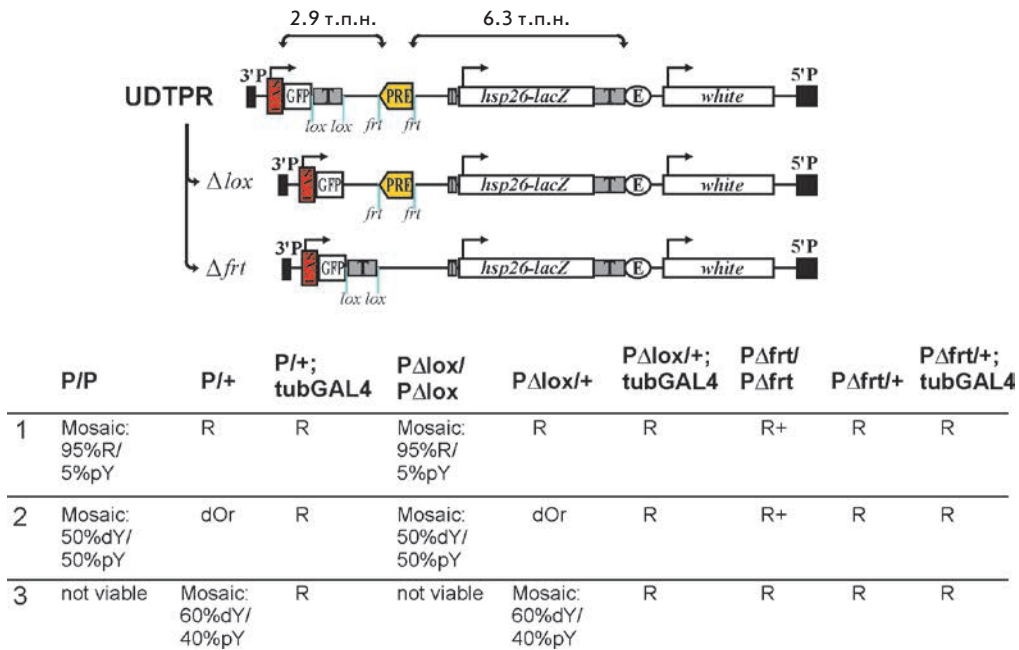


Рис. 1. Схема трансгенных конструкций и фенотипический анализ линий. А – конструкция UDTDP. Минимальный промотор гена *hsp70* под контролем сайтов связывания белка активатора GAL4 (UAS) запускает транскрипцию в направлении *eGFP* и *bxdPRE*. Т – терминатор транскрипции, *hsp26-lacZ* и *white* – репортерные гены, E – энхансер гена *white*. Снизу указаны фенотипы полученных линий. P/P – гомозиготы по конструкции; P/+ – гетерозиготы по конструкции; P/+; tubGAL4 – гетерозиготы, экспрессирующие белок GAL4; PΔlox/PΔlox – гомозиготы с делецией терминатора транскрипции; PΔlox/+ – гетерозиготы с делецией терминатора транскрипции; PΔlox/+; tubGAL4 – гетерозиготы с делецией терминатора транскрипции, экспрессирующие белок GAL4; PΔfrit/PΔfrit – гомозиготы с делецией *bxdPRE*; PΔfrit/+ – гетерозиготы с делецией PRE; PΔfrit/+; tubGAL4 – гетерозиготы с делецией *bxdPRE*, экспрессирующие белок GAL4. Градация пигментации глаз, зависящая от уровня экспрессии гена *white*: R+ – ярко-красный (дикий тип); R – красный; BrR – темно-коричневый; Br – коричневый; dOr – темно-оранжевый; Or – оранжевый; dY – темно-желтый; Y – желтый; pY – светло-желтый; w – белый. Мозаичная окраска фасеток отмечена как mosaic. Б – конструкция UDTPR

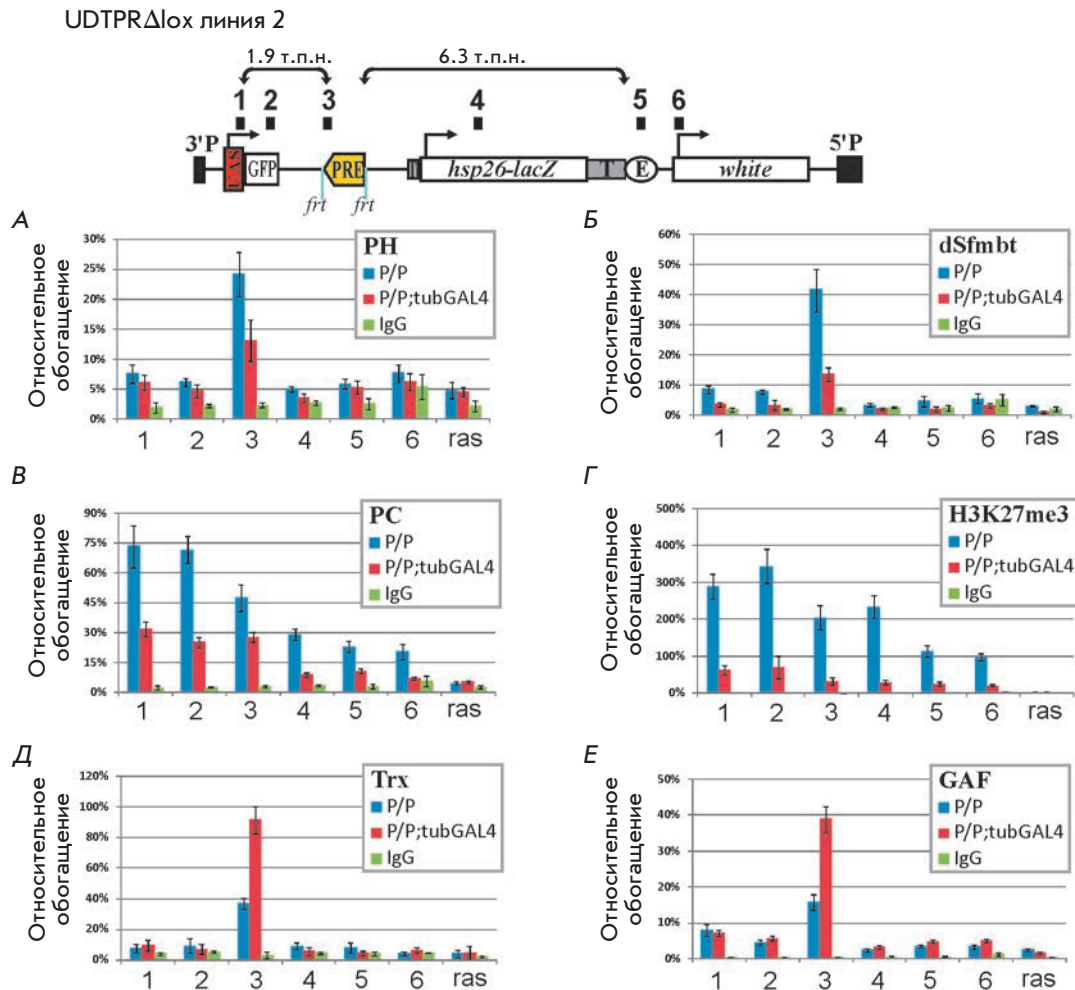


Рис. 2. Анализ связывания PcG/TrxG-факторов при проходящей транскрипции. Представлен результат иммунопреципитации хроматина, выделенного из взрослых мух. Цифры над схемами конструкций (1, 2, 3, 4, 5 и 6) обозначают пары праймеров, использованных в количественной ПЦР. Обогащения при иммунопреципитации хроматина показаны в виде доли от образца Input, с нормированием на эндогенный позитивный контроль – область рядом с *bxd*PRE 660 п.н. в геноме. Кодировочная область гена *Ras64B* – отрицательный контроль (*ras*). На диаграммах синие столбцы обозначают обогащение для линий, гомозиготных по конструкции (P/P); красные столбцы – гомозиготные линии, экспрессирующие GAL4 (P/P; tubGAL4); зеленые столбцы – обогащение, полученное при использовании неспецифических антител. На диаграммах показаны стандартные отклонения. Используются антитела против PH (А), dSfmbt (Б), PC (В), H3K27me3 (Г), Trx (Д), GAF (Е)

Таким образом, прохождение транскрипции через PRE приводит к изменению соотношения в связывании PcG/TrxG-факторов, но не к полному «сбрасыванию» этих белков с ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За репрессию/активацию множества генов *Drosophila* отвечают белки группы PcG/TrxG [1–4], которые связываются с так называемыми PRE-элементами ДНК [5, 6]. В ряде работ показано, что отсутствие PRE-опосредованной репрессии

коррелирует с присутствием некодирующих транскриптов, проходящих через PRE [24, 44]. На основании этого предложена модель, согласно которой проходящая транскрипция физически «сбрасывает» PRE-ассоциированные факторы и замещает репрессивные модификации гистонов на активные [24]. Несмотря на кажущуюся ясность, данная гипотеза не подвергалась прямой проверке.

Однако согласно другим данным, некодирующие РНК локуса *Ubx* (lncRNA-*bxd* и lncRNA *iab-8*) связаны с доменом, подверженным репрессии [45, 46].

Более того, несмотря на тщательные исследования, некодирующие РНК не обнаружены в районах PRE-элементов некоторых локусов (*invected*, *engrailed*), что свидетельствует об отсутствии ключевой роли транскрипции, по крайней мере, в функционирующей некоторых PRE [47].

Ранее мы проверили эффект транскрипции в опосредованном GAL4 переключении PRE-элемента [21]. В результате выяснилось, что даже сильная проходящая через *bxd*PRE транскрипция не приводит к полной элиминации PcG/TrxG-факторов, но изменяет соотношение связывания данных белков – связывание PcG уменьшается, а TrxG – растет. Эффект транскрипции подробно проанализирован для *bxd*PRE, встроенного в трансген в прямой ориентации [21]. В то же время активное и неактивное состояния PRE из локуса *vg* коррелируют с проходящей некодирующей транскрипцией с разных цепей ДНК [48]. Таким образом, направление транскрипции, проходящей через PRE, потенциально может быть решающим для активности этого элемента. Мы проверили эту возможность и выяснили, что изменение ориентации *bxd*PRE не приводит к изменению эффекта проходящей транскрипции. Связывание факторов PcG/TrxG при транскрипции не исчезает, однако привлечение TrxG-белков Trx и GAF растет, а PcG-белков (PH, dSfmbt, Pc) снижается.

Присутствие сильного терминатора SV40 между UAS-промотором и *bxd*PRE также не препятствует блокированию репрессии. Вероятно, сайты связывания GAL4 сами по себе способны нейтрализовать PRE-зависимый сайленсинг, и проходящая через PRE транскрипция не играет определяющей роли в данном процессе.

PRE-элементы регулируют гены, экспрессия которых должна меняться в ходе развития орга-

низма. Так, определенный ген должен экспрессироваться в определенных клетках на определенной стадии развития, а затем его экспрессия должна быть заблокирована. По всей видимости, связывание репрессорных факторов с PRE в его неактивном состоянии необходимо для того, чтобы в определенный момент времени PRE мог быстро перейти в активное состояние и прекратить экспрессию гена-мишени. Похожий по логике механизм описан для многих промоторов эукариот – это задержка РНК-полимеразы II. В этом случае с транскрипционно неактивным промотором связывается РНК-полимераза II и при необходимости быстро запускает транскрипцию.

Механизм связывания белков с PRE-элементом при активной проходящей транскрипции также не ясен. Известно, что с PRE ассоциирован ряд ДНК-связывающих факторов с мотивом «цинковые пальцы». Возможно, транскрипция не препятствует прямым ДНК-белковым контактам. С другой стороны, существует возможность того, что сохранение комплексов на PRE при проходящей транскрипции обусловлено контактами между PcG/TrxG-факторами и гистоновыми белками. Так, в составе белков PcG имеются домены, способные прямо взаимодействовать с нуклеосомами (например, MBT-домены dSfmbt и Scm) [14, 49, 50], а транскрипция не приводит к полной диссоциации нуклеосом [51]. Однако детали этих процессов в настоящее время не ясны и требуют дополнительных исследований. ●

В работе использовано оборудование ЦКП ИБГ РАН. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00166).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beisel C., Paro R. // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. № 2. P. 123–135.
2. Muller J., Verrijzer P. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2009. V. 19. № 2. P. 150–158.
3. Schwartz Y.B., Pirrotta V. // *Nat. Rev. Genet.* 2013. V. 14. № 12. P. 853–864.
4. Steffen P.A., Ringrose L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 15. № 5. P. 340–356.
5. Kassis J.A., Brown J.L. // *Adv. Genet.* 2013. V. 81. P. 83–118.
6. McElroy K.A., Kang H., Kuroda M.I. // *Open. Biol.* 2014. V. 4. P. 140006.
7. Francis N.J., Saurin A.J., Shao Z., Kingston R.E. // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. № 3. P. 545–556.
8. Saurin A.J., Shao Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Kingston R.E. // *Nature.* 2001. V. 412. № 6847. P. 655–660.
9. Shao Z., Raible F., Mollaaghababa R., Guyon J.R., Wu C.T., Bender W., Kingston R.E. // *Cell.* 1999. V. 98. № 1. P. 37–46.
10. Cao R., Wang L., Wang H., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R.S., Zhang Y. // *Science.* 2002. V. 298. № 5595. P. 1039–1043.
11. Czermin B., Melfi R., McCabe D., Seitz V., Imhof A., Pirrotta V. // *Cell.* 2002. V. 111. № 2. P. 185–196.
12. Kuzmichev A., Nishioka K., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 22. P. 2893–2905.
13. Muller J., Hart C.M., Francis N.J., Vargas M.L., Sengupta A., Wild B., Miller E.L., O'Connor M.B., Kingston R.E., Simon J.A. // *Cell.* 2002. V. 111. № 2. P. 197–208.
14. Klymenko T., Papp B., Fischle W., Kocher T., Schelder M., Fritsch C., Wild B., Wilm M., Muller J. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 9. P. 1110–1122.
15. Papp B., Muller J. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 15. P. 2041–2054.
16. Schwartz Y.B., Kahn T.G., Nix D.A., Li X.Y., Bourgon R., Biggin M., Pirrotta V. // *Nature Genetics.* 2006. V. 38. № 6. P. 700–705.
17. Schuettengruber B., Martinez A.M., Iovino N., Cavalli G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011. V. 12. № 12. P. 799–814.
18. Cavalli G., Paro R. // *Cell.* 1998. V. 93. № 4. P. 505–518.
19. Cavalli G., Paro R. // *Science.* 1999. V. 286. № 5441. P. 955–958.

20. Dejardin J., Cavalli G. // *EMBO J.* 2004. V. 23. № 4. P. 857–868.
21. Erokhin M., Elizav'ev P., Parshikov A., Schedl P., Georgiev P., Chetverina D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 48. P. 14930–14935.
22. Maurange C., Paro R. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 20. P. 2672–2683.
23. Perez L., Barrio L., Cano D., Fiuza U.M., Muzzopappa M., Milan M. // *Development.* 2011. V. 138. № 15. P. 3125–3134.
24. Rank G., Prestel M., Paro R. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 22. P. 8026–8034.
25. Pirrotta V. // *Biotechnology.* 1988. V. 10. P. 437–456.
26. Qian S., Varjavand B., Pirrotta V. // *Genetics.* 1992. V. 131. № 1. P. 79–90.
27. Erokhin M., Davydova A., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P., Chetverina D. // *Epigenet. Chromatin.* 2013. V. 6. № 1. P. 31.
28. Brand A.H., Perrimon N. // *Development.* 1993. V. 118. № 2. P. 401–415.
29. Erokhin M., Parshikov A., Georgiev P., Chetverina D. // *Chromosoma.* 2010. V. 119. № 3. P. 243–253.
30. Karess R.E., Rubin G.M. // *Cell.* 1984. V. 38. № 1. P. 135–146.
31. Rubin G.M., Spradling A.C. // *Science.* 1982. V. 218. № 4570. P. 348–353.
32. Spradling A.C., Rubin G.M. // *Science.* 1982. V. 218. № 4570. P. 341–347.
33. Golic K.G., Lindquist S. // *Cell.* 1989. V. 59. № 3. P. 499–509.
34. Siegal M.L., Hartl D.L. // *Meth. Mol. Biol.* 2000. V. 136. P. 487–495.
35. Kyrchanova O., Toshchakov S., Parshikov A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. № 8. P. 3035–3043.
36. Comet I., Savitskaya E., Schuettengruber B., Negre N., Lavrov S., Parshikov A., Juge F., Gracheva E., Georgiev P., Cavalli G. // *Dev. Cell.* 2006. V. 11. № 1. P. 117–124.
37. Orlando V., Jane E.P., Chinwalla V., Harte P.J., Paro R. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 17. P. 5141–5150.
38. Kassis J.A. // *Genetics.* 1994. V. 136. № 3. P. 1025–1038.
39. Beisel C., Bunes A., Roustan-Espinosa I.M., Koch B., Schmitt S., Haas S.A., Hild M., Katsuyama T., Paro R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 42. P. 16615–16620.
40. Schuettengruber B., Ganapathi M., Leblanc B., Portoso M., Jaschek R., Tolhuis B., van Lohuizen M., Tanay A., Cavalli G. // *PLoS Biol.* 2009. V. 7. № 1. P. e13.
41. Fischle W., Wang Y., Jacobs S.A., Kim Y., Allis C.D., Khorasanizadeh S. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 15. P. 1870–1881.
42. Min J., Zhang Y., Xu R.M. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 15. P. 1823–1828.
43. Bowman S.K., Deaton A.M., Domingues H., Wang P.I., Sadreyev R.I., Kingston R.E., Bender W. // *Elife.* 2014. V. 3. P. e02833.
44. Bae E., Calhoun V.C., Levine M., Lewis E.B., Drewell R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 26. P. 16847–16852.
45. Petruk S., Sedkov Y., Riley K.M., Hodgson J., Schweisguth F., Hirose S., Jaynes J.B., Brock H.W., Mazo A. // *Cell.* 2006. V. 127. № 6. P. 1209–1221.
46. Gummalla M., Maeda R.K., Castro Alvarez J.J., Gyurkovics H., Singari S., Edwards K.A., Karch F., Bender W. // *PLoS Genetics.* 2012. V. 8. № 5. P. e1002720.
47. Langlais K.K., Brown J.L., Kassis J.A. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. P. e48765.
48. Herzog V.A., Lempradl A., Trupke J., Okulski H., Altmutter C., Ruge F., Boidol B., Kubicek S., Schmauss G., Aumayr K., et al. // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. № 9. P. 973–981.
49. Grimm C., de Ayala Alonso A.G., Rybin V., Steuerwald U., Ly-Hartig N., Fischle W., Muller J., Muller C.W. // *EMBO Repts.* 2007. V. 8. № 11. P. 1031–1037.
50. Grimm C., Matos R., Ly-Hartig N., Steuerwald U., Lindner D., Rybin V., Muller J., Muller C.W. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 13. P. 1965–1977.
51. Kulaeva O.I., Hsieh F.K., Chang H.W., Luse D.S., Studitsky V.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1829. № 1. P. 76–83.

УДК 53.06; 57.088; 577.1

Подход к диагностике точечных мутаций в нативной ДНК с применением оксида графена

А. А. Кузнецов*, Н. Р. Максимова, В. С. Каймонов, Г. Н. Александров, С. А. Смагулова
Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, 677000, Республика Саха (Якутия), Якутск, ул. Белинского, 58

*E-mail: kuznecov.artem@mail.ru

Поступила в редакцию 19.11.2015

Принята к печати 02.02.2016

РЕФЕРАТ С целью диагностики точечных мутаций в нативной ДНК разработан новый подход к созданию тест-систем с применением оксида графена. Принцип нового подхода заключается в использовании оксида графена для сорбции и тушения флуоресцентно меченных праймеров в постаmplификационной ПЦР-смеси с последующей регистрацией флуоресцентно меченного продукта ПЦР. Благодаря различной аффинности одно- и двухцепочечных молекул ДНК к оксиду графена, а также способности оксида графена выступать в роли тушителя флуоресценции адсорбированных на его поверхности флуорофоров, существует возможность выявления флуоресцентно меченных ампликонов в присутствии избытка флуоресцентно меченных праймеров в продуктах ПЦР. Подход апробирован при создании тест-системы для ДНК-диагностики точечной мутации в гене *CUL7* (4582insT), ассоциированной с формированием ЗМ-синдрома у якутов. Разработанный подход позволяет создавать тест-системы с применением оксида графена, предназначенные для диагностики любых точечных мутаций в нативной ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА диагностика, оксид графена, точечные мутации, тест-система.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТМ – точечная мутация; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПДРФ-анализ – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; FAM – 6-карбоксихлорофлуоресцеин; ROX – карбокси-X-родамин.

ВВЕДЕНИЕ

Диагностика точечных мутаций (замен, инсерций, делеций, далее – ТМ) чрезвычайно важна для современной медицины, так как позволяет судить о предрасположенности к различным заболеваниям, осуществлять правильный подбор лекарств и открывает путь к изучению функций генов. В современной медицинской генетике используют несколько основных методов диагностики ТМ в нативной ДНК [1]: ПЦР-ПДРФ-анализ, флуоресцентные методы детекции (ПЦР в реальном времени, ПЦР с регистрацией сигнала по конечной точке), технологии с применением биочипов и секвенирование. Однако все эти методы имеют определенные недостатки, поэтому актуальным остается поиск новых более быстрых, экономичных и эффективных подходов к диагностике ТМ в нативной ДНК [2].

В последние годы при поиске подходов к диагностике ТМ активно используется оксид графена, который обладает двумя уникальными свойствами – способностью к тушению флуоресценции находящихся вблизи него флуорофоров [3] и различной аффинно-

стью по отношению к одно- и двухцепочечным молекулам ДНК [4] при низкой стоимости и простоте синтеза. С применением этих свойств за последние 5 лет разработано большое число различных подходов к диагностике ТМ с применением оксида графена, например, [5–9]. Однако эти подходы эффективны в случае диагностики ТМ в небольших по длине одноцепочечных олигонуклеотидах, и ни один из них не позволяет диагностировать ТМ в нативной ДНК [10]. Целью данного исследования стала разработка подхода к диагностике ТМ в нативной ДНК с применением оксида графена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Оксид графена синтезировали из натурального порошка графита согласно модифицированному методу Hummers и соавт. [11]. Использовали реактивы для синтеза оксида графена компании «Востокреактив» (Россия), диализные мешки MFPI MF-1230-45 «Русбиолинк» (Россия), реактивы

Структуры использованных праймеров

Обозначение	Тип праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'
R	Обратный	GATGAGGCAGTTCAGAAGATTCC
F-FAM	FAM-меченый прямой	FAM-CAGGGGTCCCTCAAGATTTCCG
F-ROX	ROX-меченый прямой	ROX-CAGGGGTCCCTCAAGATTTCCG

для проведения ПЦР (буфер для ПЦР, MgCl₂, dNTP, ДНК-полимераза) приобретены в компании «Евроген» (Россия). Использовали аллель-специфичную SNPdetect ДНК-полимеразу («Евроген»). Структура праймеров для ПЦР приведена в таблице.

Продукты ПЦР инкубировали с оксидом графена с использованием разведенного деионизованной водой натрий-фосфатного буфера (10×, Gibco, США). Деионизованную воду (18.2 МΩ×см) получали с помощью системы очистки Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Германия).

Характеристики тест-системы определяли на трех группах образцов ДНК (по 16 в каждой группе – больные ЗМ-синдромом с подтвержденной мутацией 4582insT в гомозиготном состоянии, гетерозиготные носители мутации 4582insT, здоровые), выделенных из периферической крови пациентов, от которых получено информированное согласие. Также были использованы 16 отрицательных контролей. Все образцы ДНК генотипировали с помощью тест-системы компании «ТестГен» на основе метода ПЦР в реальном времени (рис. 1). Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом.

Оборудование

Для синтеза оксида графена использовали магнитную мешалку Intelli-Stirrer MSH-300i (Biosan, Латвия), а также ультразвуковой диспергатор ИЛ100-6/3 («ИНЛАБ», Россия) и центрифугу MiniSpin Plus (Eppendorf, Германия). ПЦР проводили с использованием термоциклера С1000 (Bio-Rad, США), интенсивность флуоресценции регистрировали с помощью флуориметра Джин-4 («ДНК-технология», Россия).

Синтез оксида графена

Порошок графита (0.1 г, Sigma Aldrich, США) и нитрата натрия (0.05 г, «х. ч.») добавляли в концентрированную серную кислоту («ос. ч.») объемом 14 мл. Далее мелкими порциями постепенно добавляли 0.4 г перманганата калия («ч.д.а.»). Полученную реакционную смесь перемешивали в химическом стакане в течение 3 недель на магнитной мешалке при температуре 75°C. После перемешивания смесь разбав-

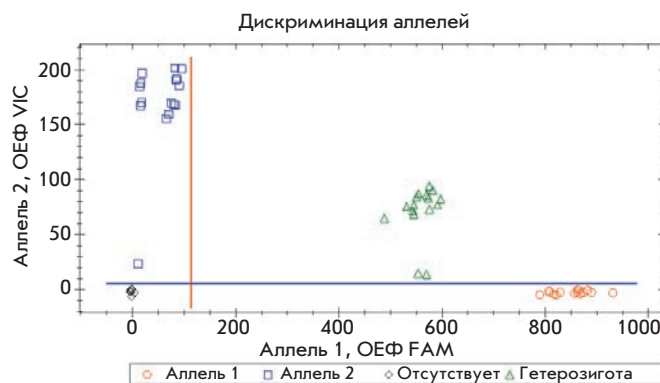


Рис. 1. Результаты генотипирования образцов ДНК с помощью тест-системы на основе метода ПЦР в реальном времени (канал FAM – мутация 4582insT, канал VIC – дикий тип)

ляли деионизованной водой в 2 раза по объему. Далее в смесь добавляли 5% раствор пероксида водорода (7 мл) до появления бриллиантово-желтой окраски. Бриллиантово-желтую смесь фильтровали на воронке Бюхнера с использованием обеззоленного фильтра (желтая лента) диаметром 70 мм и промывали 300 мл деионизованной воды до установления нейтральной среды в фильтрате. При этом получали коричневую гелеобразную массу, которую переносили с фильтра в химический стакан и разбавляли 50 мл воды с последующей ультразвуковой обработкой с объемной мощностью 750 Вт в течение 5 мин на диспергаторе ИЛ100-6/3. После диспергирования суспензию центрифугировали при 14500 об/мин (14.1 г) в течение 5 мин, частицы оксида графита, не расслоившиеся в результате УЗ-обработки, удаляли путем декантации раствора оксида графена над осадком. На последнем этапе проводили диализ раствора в диализных мешках (MWCO: 12000–14000) в течение 3 дней с трехкратной сменой деионизованной воды в стакане объемом 1 л с диализным пакетом. В результате получали однородную суспензию оксида графена темно-коричневого цвета, объемом ~ 50 мл. В высушенной суспензии оксида графена методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии определяли атомное содержание углерода и кисло-

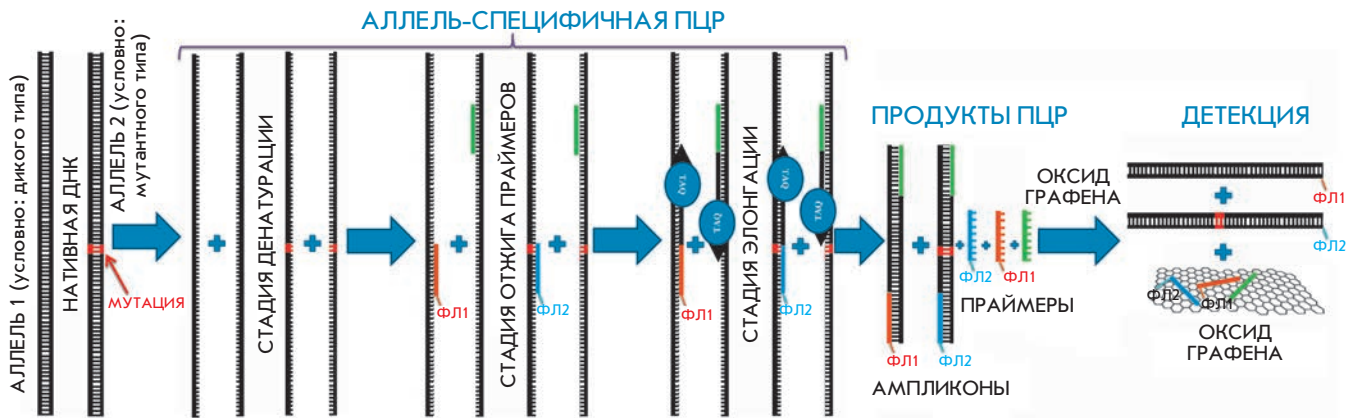


Рис. 2. Схема диагностики точечных мутаций в нативной ДНК с использованием разработанного подхода

рода, которое составило ~58 и ~42% соответственно. Концентрацию оксида графена в суспензии определяли весовым методом, взвешивая сухой остаток от 1 мл суспензии, высушенной при температуре 170°C в течение 5 мин.

Аллель-специфичная ПЦР

Для каждого образца ДНК готовили 25 мкл смеси, содержащей 1× ПЦР-буфер, 3 мМ MgCl₂, 0,28 мМ dNTP, 0,2 мкМ праймера R, 0,6 мкМ праймера F-FAM, 66,4 нМ праймера F-ROX, 2,5 ед. акт. SNPdetect ДНК-полимеразы и 1,2 нг/мкл ДНК. Температурный профиль ПЦР состоял из денатурации при 95°C в течение 3 мин, 38 циклов амплификации (30 с – денатурация при 95°C, 30 с – отжиг при 60°C, 1 мин – элонгация при 72°C), завершающей элонгации при 72°C в течение 5 мин. Верификацию прохождения амплификации осуществляли методом гель-электрофореза продуктов ПЦР в 3% агарозном геле без добавления бромистого этидия. Длина продукта амплификации составляла 149 п.н. (150 п.н. при амплификации с мутантного аллеля), GC-состав – 55,7%.

Добавление оксида графена к продуктам ПЦР и регистрация флуоресценции

Из каждой пробирки отбирали 15 мкл постамплификационной ПЦР-смеси и помещали в 0,6 мл прозрачную микроцентрифужную пробирку. Далее добавляли 3,6 мкл 5× натрий-фосфатного буфера (Gibco, США) и 4 мкл суспензии оксида графена (0,5 мг/мл) в 1× натрий-фосфатном буфере (Gibco, США), инкубировали при комнатной температуре на орбитальном шейкере в течение 20 мин (450 об/мин). Измеряли интенсивность флуоресценции по FAM- и ROX-каналам в каждой

пробирке с помощью флуориметра Джин-4 («ДНК-технология», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Описание разработанного подхода

На рис. 2 изображена схема разработанного подхода.

На первом этапе диагностики проводят аллель-специфичную ПЦР, которая отличается от обычной использованием аллель-специфичной ДНК-полимеразы и трех праймеров. Один из праймеров (обратный, выделен на рис. 2 зеленым цветом) способен комплементарно отжигаться на ДНК аллелей обоих типов (дикого и мутантного). Два других праймера (прямые, выделены синим и оранжевым цветом на рис. 2) содержат на 5'-конце разные флуорофоры – ФЛ1 и ФЛ2 с неперекрывающимися спектрами возбуждения/эмиссии. Каждый из прямых праймеров способен связываться с аллелем только одного типа, поскольку они комплементарны ДНК разных аллелей в области сайта мутации.

В зависимости от генотипа донора ДНК возможно образование трех типов постамплификационной смеси: с ампликонами, мечеными флуорофором ФЛ1 (гомозиготный дикий тип); мечеными флуорофором ФЛ2 (гомозиготный мутантный тип), и с ампликонами, мечеными обоими флуорофорами (гетерозиготный тип). В любом случае продукты ПЦР будут содержать избыток флуоресцентно меченных праймеров.

При добавлении водной суспензии оксида графена к постамплификационной ПЦР-смеси на поверхности наноллистов оксида графена будет происходить адсорбция одноцепочечных молекул ДНК – флуоресцентно меченных праймеров, вследствие чего флуоресценция от них будет потушена. Двухцепочечные

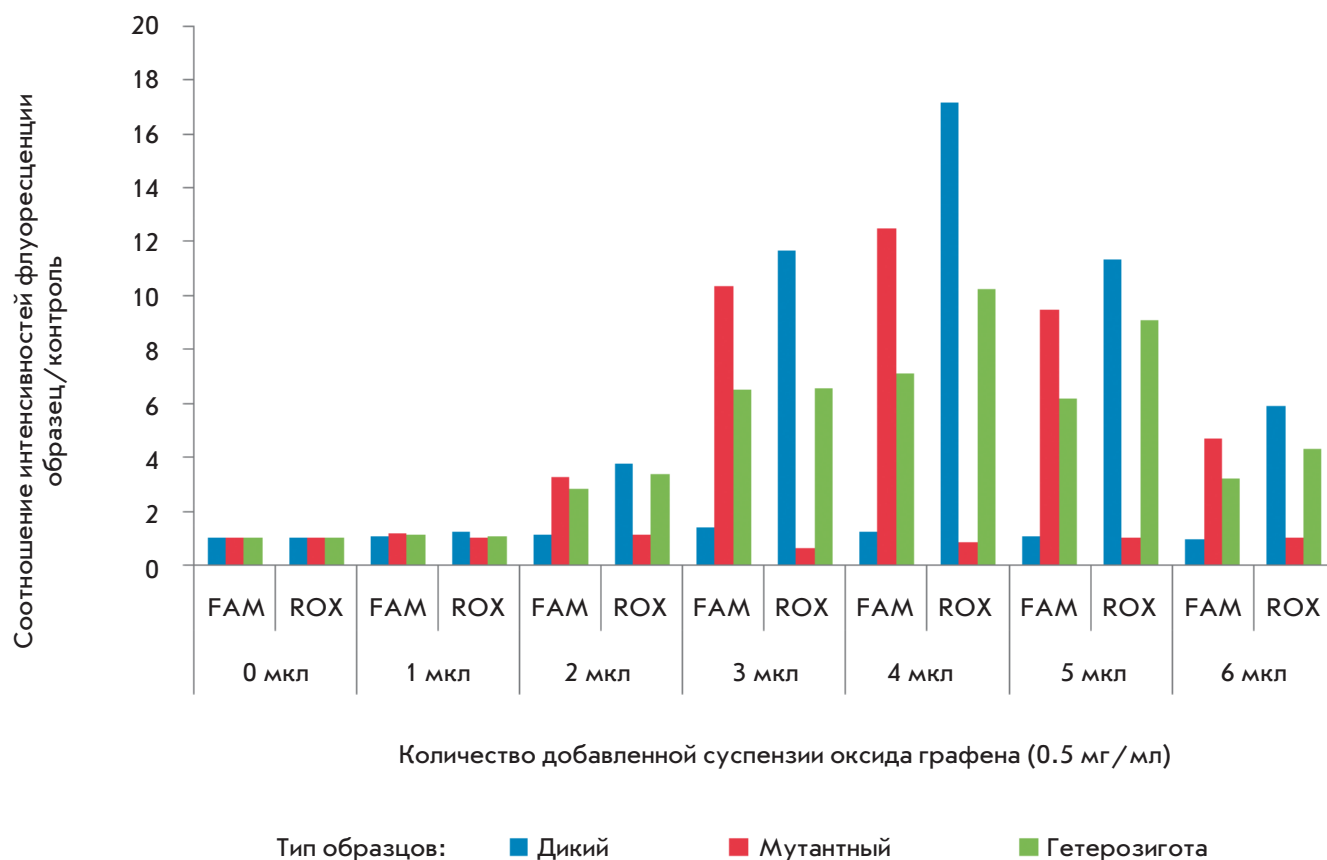


Рис. 3. Соотношение интенсивностей флуоресценции **N** образец/контроль в каждой клинической группе образцов по FAM- и ROX-каналам при добавлении разных объемов суспензии оксида графена к постаmplификационной смеси

молекулы ДНК (ампликоны) будут оставаться в растворе из-за их низкой аффинности к оксиду графена и могут генерировать флуоресцентный сигнал.

Если после добавления избытка оксида графена сравнить интенсивность флуоресценции каждого из флуорофоров в конечном растворе (для анализируемого образца ДНК) и интенсивность флуоресценции в отрицательном контроле, то можно установить генотип донора ДНК.

Апробация разработанного подхода

С применением этого подхода нами разработана тест-система, предназначенная для ДНК-диагностики мутации, ассоциированной с формированием ЗМ-синдрома у якутов. ЗМ-синдром – частое ауто-сомно-рецессивное наследственное заболевание, обусловленное мутацией 4582insT в экзоне 25 гена *CUL7* (K1AA0076, Куллин 7) [12]. Ввиду высокой частоты гетерозиготного носительства мутации, ассоциированной с формированием ЗМ-синдрома у якутов

(около 30 человек на 1000), это заболевание было выбрано для разработки тест-системы с применением оксида графена.

С помощью сервиса Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) к разным аллелям были подобраны FAM- и ROX-меченые праймеры, по 3'-концу комплементарные последовательности ДНК в области мутации (таблица).

На стадии добавления оксида графена к продуктам ПЦР использовали раствор оксида графена (0.5 мг/мл) в 1× натрий-фосфатном буфере, а также сам буфер, чтобы нивелировать влияние pH на интенсивности флуоресценции. После добавления оксида графена измеряли интенсивность флуоресценции каждого образца (в том числе отрицательных контролей) по FAM- и ROX-каналам, после чего рассчитывали средние интенсивности флуоресценции и соотношения интенсивностей образец/контроль в каждой клинической группе образцов по каждому каналу флуоресценции в отдельности. Условия проведения

аллель-специфичной ПЦР, состав ПЦР-смеси, длину амплифицируемого участка, количество оксида графена варьировали для достижения максимального соотношения интенсивностей флуоресценции образец/контроль по каждому каналу флуоресценции.

В ходе оптимизации тест-системы на выборке из шести образцов ДНК носителей мутации 4582insT и здоровых доноров (по два образца каждого типа) и двух отрицательных контролей в семи эквивалентных опытах с разными объемами добавляемой суспензии оксида графена определено количество оксида графена, позволяющее максимально эффективно интерпретировать результаты ДНК-диагностики – 4 мкл с концентрацией 0.5 мг/мл в 1× натрий-фосфатном буфере (рис. 3).

Испытание разработанной тест-системы при генотипировании контрольной выборки из 48 образцов ДНК носителей мутации 4582insT и здоровых людей (по 16 образцов каждого типа) дало хорошие результаты (рис. 4).

Доверительные интервалы на рис. 4 построены с применением стандартных отклонений, рассчитанных как сумма относительных стандартных отклонений для интенсивностей флуоресценции контрольных и известных образцов по каждому каналу.

Согласно приведенным на рис. 4 данным, разработанная тест-система позволяет достоверно диагностировать все три комбинации аллельных вариантов в гене *CUL7*. Использование оксида графена в качестве наноструктурного тушителя флуоресценции флуоресцентно меченных праймеров в постаmplификационной ПЦР-смеси позволило добиться практически полного тушения их флуоресценции. При этом флуоресценция от меченого продукта ПЦР в значительной степени сохранялась, что позволило статистически значимо анализировать постаmplификационную смесь по флуоресцентным свойствам. На протестированной выборке клинических образцов специфичность тест-системы составила 100% (так как все образцы можно однозначно отнести к клиническим группам), а чувствительность – не менее 1.2 нг ДНК, что позволяет говорить о пригодности предложенного подхода для генотипирования точечных мутаций в условиях классической генетической лаборатории. Несомненными достоинствами разработанного метода являются его простота (три стадии) и скорость (2 ч). При этом, теоретически, разработанный подход не ограничен типом детектируемых точечных мутаций (инсерций, делеций, замен), так как он основан на применении аллель-специфичной ПЦР, что позволяет адаптировать данный метод к диагностике любых точечных мутаций, если подобрать оптимальные структуры праймеров и условия

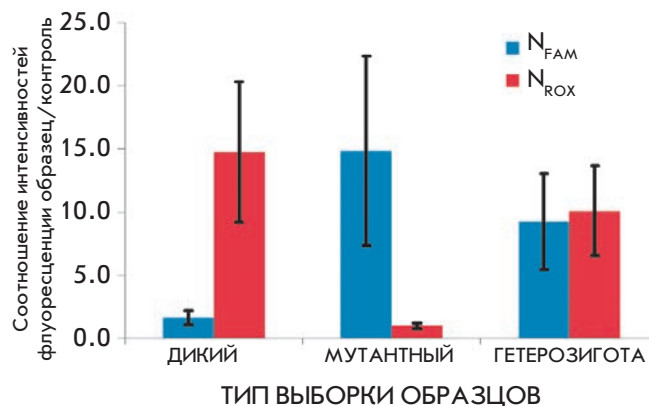


Рис. 4. Соотношение интенсивностей флуоресценции N образец/контроль в каждой клинической группе образцов по FAM- и ROX-каналам

диагностики. С учетом простоты метода, низкой стоимости коммерческого оксида графена, доступности используемого для ДНК-диагностики оборудования метод может быть интересен генетическим лабораториям, занимающимся фармакогенетическими исследованиями, а также диагностикой наследственных заболеваний, обусловленных точечными мутациями в ДНК.

ВЫВОДЫ

Нами разработан подход, который предполагает использование оксида графена в качестве наноструктурного тушителя флуоресценции для проведения диагностики ТМ с применением аллель-специфичной ПЦР. Метод может быть интересен диагностическим лабораториям, в которых для диагностики точечных мутаций (замен, инсерций, делеций) в нативной ДНК используется недорогое оборудование типа ПЦР-флуориметров. Достоверность, специфичность и хорошая чувствительность подхода подтверждены при разработке тест-системы для ДНК-диагностики носительства мутации, ассоциированной с формированием ЗМ-синдрома у якутов. Разработанный подход позволяет создавать тест-системы для диагностики любых точечных мутаций. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (уникальный идентификатор проекта: RFMEFI57514X0015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mamotte C.D.S. // *Clin. Biochem. Rev.* 2006. V. 27. № 1. P. 63–75.
2. Ye S., Dhillon S., Ke X., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 17. P. e88.
3. Li F., Pei H., Wang L., Lu J., Gao J., Jiang B., Zhao X., Fan C. // *Adv. Funct. Mater.* 2013. V. 23. № 33. P. 4140–4148.
4. Huang P.-J., Liu J. // *Nanomaterials.* 2013. V. 3. № 2. P. 221–228.
5. Lu C.H., Yang H.H., Zhu C.L., Chen X., Chen G.N. // *Angew. Chemie. Int. Ed.* 2009. V. 48. № 26. P. 4785–4787.
6. He S., Song B., Li D., Zhu C., Qi W., Wen Y., Wang L., Song S., Fang H., Fan C. // *Adv. Funct. Mater.* 2010. V. 20. № 3. P. 453–459.
7. Li J., Huang Y., Wang D., Song B., Li Z., Song S., Wang L., Jiang B., Zhao X., Yan J., et al. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2013. V. 49. № 30. P. 3125–3127.
8. Li Z., Zhu W., Zhang J., Jiang J., Shen G., Yu R. // *Analyst.* 2013. V. 138. № 13. P. 3616–3620.
9. Xiang D., Zheng A.H., Luo M., Ji X.H., He Z.K. // *Sci. China Chem.* 2013. V. 56. № 3. P. 380–386.
10. Kuznetsov A.A., Maksimova N.R., Alexandrov G.N., Smagulova S.A. // *Yakut Med. J.* 2014. V. 4. № 48. P. 142–149.
11. Hummers W.S., Offeman R.E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. V. 80. № 6. P. 1339–1339.
12. Maksimova N., Hara K., Miyashia A., Nikolaeva I., Shiga A., Nogovicina A., Sukhomyasova A., Argunov V., Shvedova A., Ikeuchi T., et al. // *J. Med. Genet.* 2007. V. 44. № 12. P. 772–778.

УДК 573.6.086.83:577.21:630

Испытания трансгенных растений осины с геном *bar* на устойчивость к гербицидам в полунатуральных условиях

В. Г. Лебедев^{1*}, В. Н. Фасхиев¹, Н. П. Коваленко¹, К. А. Шестибратов¹, А. И. Мирошников^{1,2}¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 6²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биотехнологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 51

*E-mail: vglebedev@mail.ru

Поступила в редакцию 21.10.2015

Принята к печати 25.01.2016

РЕФЕРАТ Создание растений, устойчивых к гербицидам, является важным направлением в генной инженерии лесных древесных пород. С целью придания устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина в растения осины обыкновенной (*Populus tremula* L.) методом агробактериальной трансформации перенесли ген *bar*, кодирующий фосфинотрицин-ацетилтрансферазу. Трансгенный статус 13 линий, полученных на основе двух элитных генотипов осины, подтвердили с помощью ПЦР. В 2014–2015 гг. оценили устойчивость шести линий к обработке гербицидом Basta в полунатуральных условиях. Трансгенные растения обладали устойчивостью к двукратной полевой дозе гербицида (10 л/га), тогда как контрольные погибли при воздействии 2.5 л/га. Содержание аммонийного азота в растениях с геном *bar* не изменилось после обработки гербицидом. Аномально низкая температура в третьей декаде октября 2014 г. выявила различия в зимостойкости линий, полученных на основе генотипов Pt или f2. Стабильность экспрессии гена *bar* после перезимовки в естественных условиях подтверждена методом ОТ-ПЦР. Отобраны четыре трансгенные линии осины, перспективные для проведения полевых испытаний. Ген *bar* может быть использован для переноса в трансгенные растения лесных пород, проявившие ценные признаки, например повышенную продуктивность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ген *bar*, осина, трансгенные растения, устойчивость к гербицидам, фосфинотрицин.

ВВЕДЕНИЕ

Многие лиственные породы (например, ива и тополь) на ранних стадиях роста не выдерживают конкуренции с сорными растениями, что делает борьбу с сорняками очень важной [1]. Эта проблема особенно актуальна в питомниках, где низкая конкурентоспособность молодых растений приводит к снижению их выживаемости и ослаблению роста. В связи с этим на борьбу с сорными растениями в питомниках тратится 50–70% средств, выделяемых на выращивание стандартного посадочного материала [2]. Механические способы борьбы отличаются трудоемкостью и низкой эффективностью. Более перспективно использование гербицидов, простых в применении, эффективных и экономичных.

В зоне умеренного климата в лесных питомниках выращивают различные виды *Populus*, однако использованию гербицидов мешает высокая чувстви-

тельность видов этих растений к большинству таких соединений [3]. Оптимальным представляется выращивание растений, устойчивых к высокоэффективным неселективным гербицидам, относительно безопасным для окружающей среды.

С этой целью в древесные растения встраивали различные гены, определяющие устойчивость к гербицидам. Первым таким геном был ген *aroA*, придающий устойчивость к глифосату [4]. Сообщалось также о переносе гена *crsl-1* для приобретения устойчивости к сульфонилмочевине [5], генов *CP4* и *GOX* для устойчивости к глифосату [6]. Наибольшее распространение, однако, получил ген *bar* почвенной бактерии *Streptomyces hygrosopicus*, придающий устойчивость к гербицидам широкого спектра действия (Liberty, Basta, Finale и др.) на основе фосфинотрицина (ФФТ, глюфосинат аммония). ФФТ является аналогом L-глутаминовой

кислоты и мощным ингибитором глутаминсинтетазы (ГС), играющей центральную роль в ассимиляции аммония и регуляции азотного метаболизма в растениях [7]. Ингибирование ГС приводит к быстрому накоплению аммония в растительной клетке и ее последующей гибели [8]. Ген *bar* кодирует фермент ФФТ-ацетилтрансферазу, который ацетирует свободную аминогруппу ФФТ и тем самым инактивирует его [9]. Ген *bar* встраивали в различные виды и гибриды *Populus* [3, 10] и *Eucalyptus* [11, 12], а также дуб [13] и различные виды хвойных [14, 15], но растения осины ранее не трансформировали. Цель нашей работы заключалась в создании устойчивых к гербицидам растений осины путем трансформации отечественных высокопродуктивных генотипов геном *bar* и отборе на основе испытаний в полунатуральных условиях линий, перспективных для плантационного лесоводства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растения осины (*P. tremula* L.) двух генотипов – Pt и f2. Растения с генотипом Pt, обнаруженные в Ленинградской области, характеризуются быстрым ростом и устойчивостью к ядровой гнили (СПбНИИЛХ, А.В. Жигунов, персональное сообщение), тогда как растения с генотипом f2 представляют собой культуру микропобегов клона 34, найденного С.Н. Багаевым в Костромской области [16]. Растения культивировали *in vitro* на среде WPM [17] с 0.5 мг/л гиббереллина при 22–24°C и фотопериоде 16 ч.

Трансформацию проводили штаммом *Agrobacterium tumefaciens* СВЕ21 с бинарным вектором pVIBar [18], содержащим гены *nos-nptII* и *35S-bar* согласно [19]. Канамицин-устойчивые трансформанты анализировали методом ПЦР. Растительную ДНК выделяли согласно [20]. Возможное загрязнение препаратов агробактериальной ДНК проверяли путем амплификации последовательности гена *virB*. Использовали следующие пары праймеров:

Vir-B1 – 5'-GGCTACATCGAAGATCGTATGAAATG-3';

Vir-B2 – 5'-GACTATAGCGATGGTTACGATGTTGAC-3';

Nos – 5'-CGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAG-3';

NptII – 5'-GCATGCGCGCCTTGAGCCTGG-3';

Bar-1 – 5'-TGCACCATCGTCAACCACTA-3';

Bar-2 – 5'-ACAGCGACCACGCTCTTGAA-3'.

Реакционная смесь содержала 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% бычьего сывороточного альбумина, 200 мкМ каждого dNTP, 0.4 мкМ каждого олигонуклеотида, 0.05 ед. акт./мкл Taq-полимеразы, 1–5 нг/мкл геном-

ной ДНК. Условия ПЦР: денатурация – 96°C (3 мин); 30 циклов – 94°C (1 мин), 60°C (*nptII*, *bar*) или 58°C (*virB*) по 1 мин, 72°C (1 мин); элонгация – 72°C (5 мин). Реакцию проводили на амплификаторе MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, США).

Устойчивость трансгенных линий *in vitro* оценивали путем укоренения растений на среде WPM с 0, 0.5 или 5 мг/л ФФТ. Через 2 недели после посадки определяли частоту укоренения, количество корней и их длину. Для оценки устойчивости к обработке гербицидом трансгенные и контрольные растения были микроразмножены, адаптированы к условиям теплицы и после пересадки в пластиковые сосуды объемом 1 л с субстратом торф : перлит (3 : 1) в начале июня 2014 г. перенесены на открытую площадку на территории ФИБХ РАН в Пущино. В середине июля растения обрабатывали водой (контроль) или 0.5, 1 и 2% водным раствором гербицида Basta (Bayer CropScience, 150 г/л ФФТ) в дозах, эквивалентных 2.5, 5 и 10 л/га (по четыре растения каждой линии в варианте). Визуальную оценку повреждений проводили через 3, 7, 14 и 28 сут после обработки по следующей шкале: 0 баллов – без повреждений, 1 – некроз 0–25% поверхности листьев, 2 – 25–50%, 3 – 50–75%, 4 – 75–100%, 5 – полный некроз. В день обработки и через 3 сут отбирали образцы листьев для оценки содержания аммонийного азота и воды. Растительный материал экстрагировали согласно [21]. Аммонийный азот определяли согласно [22]. Содержание воды определяли высушиванием при 105°C в течение 24 ч. В течение вегетационного сезона 2014 г. каждые 4 недели измеряли высоту растений и подсчитывали количество листьев, каждые 8 недель – диаметр основания ствола.

После перезимовки в естественных условиях в мае 2015 г. растения пересаживали в сосуды объемом 3 л. Степень подмерзания растений определяли по соотношению живой части к общей длине ствола. Метеоданные получены с автоматической метеостанции UGT в Пущино (около 600 м от места испытаний). Экспрессию гена *bar* оценивали в июне 2015 г. методом ОТ-ПЦР (внутренний контроль – ген актина). РНК выделяли по модифицированной методике [23]. кДНК синтезировали в два этапа. На первом этапе реакционную смесь (0.1–5 мкг РНК, 0.5 мкг олиго-dT-праймера, 10 ед. акт. ингибитора РНКаз) прогревали в течение 5 мин при 70°C и переносили на лед. На втором этапе добавляли 0.4 мМ dNTP, буфер для обратной транскриптазы и 4 ед. акт./мкл обратной транскриптазы M-MuLV, инкубировали в течение 1.5 ч при 37°C, после чего прогревали (15 мин при 70°C). ПЦР проводили с праймерами на гены *bar* и актина: Actin 1 up – 5'-TATGCCCTCCCACATGCCAT-3'; Actin 1 low – 5'-CATCTGCTGGAAGGTGCTGA-3'.

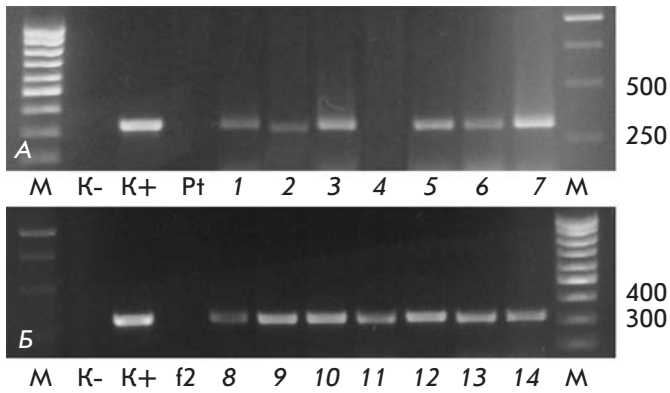


Рис. 1. ПЦР-анализ на наличие фрагмента гена *bar* растений осины генотипов Pt (А) и f2 (Б). М – молекулярный маркер; К- – вода; К+ – pBlBar; Pt, f2 – нетрансгенный контроль; 1 – PtXlBar4a; 2 – PtXlBar9a; 3 – PtXlBar14a; 4 – PtXlBar23a; 5 – PtXlBar29a; 6 – PtXlBar30a; 7 – PtXlBar31a; 8 – f2XlBar1a; 9 – f2XlBar2a; 10 – f2XlBar3a; 11 – f2XlBar4a; 12 – f2XlBar5a; 13 – f2XlBar6a; 14 – f2XlBar8a

Реакционная смесь содержала ScreenMix-HS («Евроген»), 0.8 мМ праймеров 0.1–5 мкг РНК или κДНК. Условия ПЦР: денатурация – 95°C (5 мин); 31 цикл – 95°C (45 с), 59°C (30 с), 72°C (1 мин); элонгация – 72°C (10 мин). В июле 2015 г. растения обрабатывали гербицидом по описанной выше методике.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 6.1 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате генетической трансформации вектором pBlBar получено 18 линий осины, устойчивых к канамицину: 10 – на основе генотипа Pt и восемь – на основе f2. Из 14 наиболее хорошо растущих *in vitro* линий (по семь с каждым генотипом) выделили ДНК для проведения ПЦР-анализа. ПЦР-анализ гена *virB* не выявил загрязнения образцов агробактериальной ДНК. Подтверждено присутствие последовательности селективного гена *nptII* во всех линиях (данные не приведены). Вставка целевого гена *bar* в геном осины обнаружена в шести из семи линий Pt (кроме PtXlBar23a), во всех линиях f2 выявлена амплификация фрагмента ДНК ожидаемого размера – 310 п.н. (рис. 1).

Устойчивость растений осины *in vitro* (13 линий и два исходных генотипа) определяли путем укоренения на среде, содержащей 0 (контроль), 0.5 мг/л (сублетальная концентрация) или 5 мг/л (летальная концентрация) ФФТ. Через 2 недели после посадки у нетрансгенных растений на среде с 0.5 мг/л ФФТ резко снизилась частота укоренения, количество и длина корней, а на среде с 5 мг/л ФФТ все расте-

Таблица 1. Устойчивость растений осины генотипа Pt к обработке гербицидом Basta

Линия	Доза гербицида, л/га	Степень некроза, баллы	
		через 3 сут	через 7 и 14 сут
Pt	2.5	5	5
	5	5	5
	10	5	5
PtXlBar9a	2.5	0	0
	5	< 1*	< 1
	10	< 1	1**
PtXlBar14a	2.5	0	0
	5	< 1	< 1
	10	1	1
PtXlBar29a	2.5	0	0
	5	< 1	< 1
	10	< 1	1

*Поражено до 1/3 всех листьев (некроз до 5–10% площади).

**Поражено 1/2–2/3 всех листьев (некроз до 25% площади).

Таблица 2. Устойчивость растений осины генотипа f2 к обработке гербицидом Basta

Линия	Доза гербицида, л/га	Степень некроза, баллы	
		через 3 сут	через 7 и 14 сут
f2	2.5	5	5
	5	5	5
	10	5	5
f2XlBar2a	2.5	0	0
	5	0	0
	10	< 1	1
f2XlBar3a	2.5	0	0
	5	0	< 1
	10	< 1	1
f2XlBar5a	2.5	0	0
	5	< 1	< 1
	10	< 1	< 1

ния погибли. Добавление ФФТ не повлияло на частоту укоренения трансгенных растений, хотя у некоторых линий отмечено снижение количества и длины корней. По итогам эксперимента *in vitro* отобрано по три трансгенные линии каждого генотипа, не показавшие снижения показателей укоренения на среде с ФФТ – PtXlBar9a, PtXlBar14a, PtXlBar29a, f2XlBar2a, f2XlBar3a и f2XlBar5a, которые оценивали на устойчивость к гербициду Basta в условиях открытой площадки. Выявлена низкая устойчивость



Рис. 2. Однолетние растения осины генотипа Pt через 7 дней после обработки гербицидом Basta: слева – нетрансгенный контроль, справа – линия PtXIBar14a (в каждой группе слева направо – вода, 2.5, 5, 10 л/га)

однолетней нетрансгенной осины: уже через 3 сут все листья на растениях обоих генотипов были полностью некротизированы вне зависимости от использованной дозы гербицида (табл. 1 и 2). Все трансгенные линии были устойчивыми к обработке 2.5 л/га гербицида, а две линии генотипа f2 – и к 5 л/га. В остальных вариантах на отдельных листьях наблюдались мелкие пятна некроза, занимающие до 5–10% площади листа. Через 7 сут после обработки Basta в максимальной дозе у некоторых трансгенных линий возросла степень поражения – увеличилось количество пораженных листьев и площадь некроза (до 25% площади листа). Через 14 и 28 дней после обработки симптомы поражения у трансгенных растений не усилились, а контрольные растения сбросили листья и полностью погибли. Внешний вид растений через 7 сут после обработки показан на рис. 2.

Показано, что уровень аммонийного азота в листовой ткани однолетних растений осины трансгенных линий был сходным, но в контрольных растениях содержание аммония было существенно выше: 17.5–19.6 и 24.2 мкг NH_4^+ /г сырого веса у генотипа Pt ($p < 0.001$) и 18.9–20.6 и 24.1 мкг NH_4^+ /г сырого веса у генотипа f2 ($p < 0.05$) соответственно. Через 3 сут после обработки гербицидом уровень аммония в контрольных растениях увеличился в зависимости от дозы в 2.7–4.6 раза у Pt (рис. 3) и 2.2–3.7 раза у f2 (рис. 4). В большинстве трансгенных линий уровень аммония снизился (до –36% от исходного уровня), тогда как в линии PtXIBar9a во всех вариантах его содержание возросло на 14–60% (в абсолютных значениях не отличаясь существенно от варианта обработки водой).

Таблица 3. Содержание воды в листьях осины до и после обработки гербицидом Basta

Генотип	Линия	Обработка	Содержание воды, %	
			до обработки	после обработки
Pt	Pt	вода	64.0	61.6
		гербицид	61.3–64.1	20.3–24.0
	PtXIBar9a	вода	59.5	55.7
		гербицид	56.0–60.4	53.9–57.2
	PtXIBar14a	вода	59.8	56.7
		гербицид	60.5–62.1	59.5–60.8
f2	PtXIBar29a	вода	59.7	59.2
		гербицид	57.4–61.7	56.9–61.0
	f2	вода	55.9	52.6
		гербицид	59.1–61.5	22.7–25.3
	f2XIBar2a	вода	60.6	59.5
		гербицид	60.9–61.6	58.7–61.3
f2XIBar3a	вода	60.8	61.1	
	гербицид	60.6–62.9	60.7–63.3	
f2XIBar5a	вода	59.9	59.0	
	гербицид	62.4–63.2	60.4–61.6	

До обработки листья осины содержали, в зависимости от линии, 55.9–64.1% воды (табл. 3). Обработка гербицидом вызвала резкое обезвоживание контрольных растений: содержание воды снизилось до 20.3–24.0% у растений с генотипом Pt и до 22.7–25.3% – с f2. У трансгенных растений этот показатель практически не изменился и составил 53.9–63.3% (95–102% от исходного уровня). Существенные различия между вариантами обработки гербицидом отсутствовали.

Измерения биометрических показателей растений осины в сезоне 2014 г. не выявили негативного влияния обработки гербицидом на рост трансгенных линий. Не обнаружено статистически значимых различий в измеренной в конце года высоте растений после разных вариантов обработки (рис. 5). Трансгенные линии также не отличались по высоте между собой и от контрольных растений. Не выявлено существенных различий и в облиственности растений (данные не приведены), но диаметр ствола у растений линии f2XIBar5a, обработанных 2.5 или 5 л/га, был значительно выше, чем в варианте обработки водой – 6.9, 7.0 и 6.3 мм соответственно ($p < 0.05$).

Для оценки влияния абиотических факторов на стабильность экспрессии перенесенного гена растения оставляли на зимовку в естественных условиях. В третьей декаде октября 2014 г. на всей Европейской части России наблюдались аномально низкие температуры. В Пущино в эти дни температу-

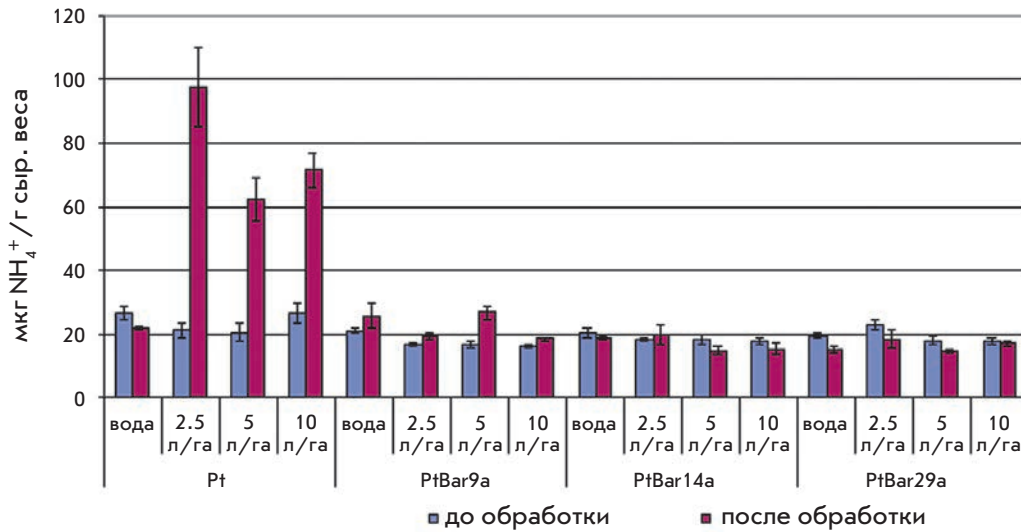


Рис. 3. Содержание аммонийного азота в листьях растений осины генотипа Pt до и после обработки гербицидом Basta

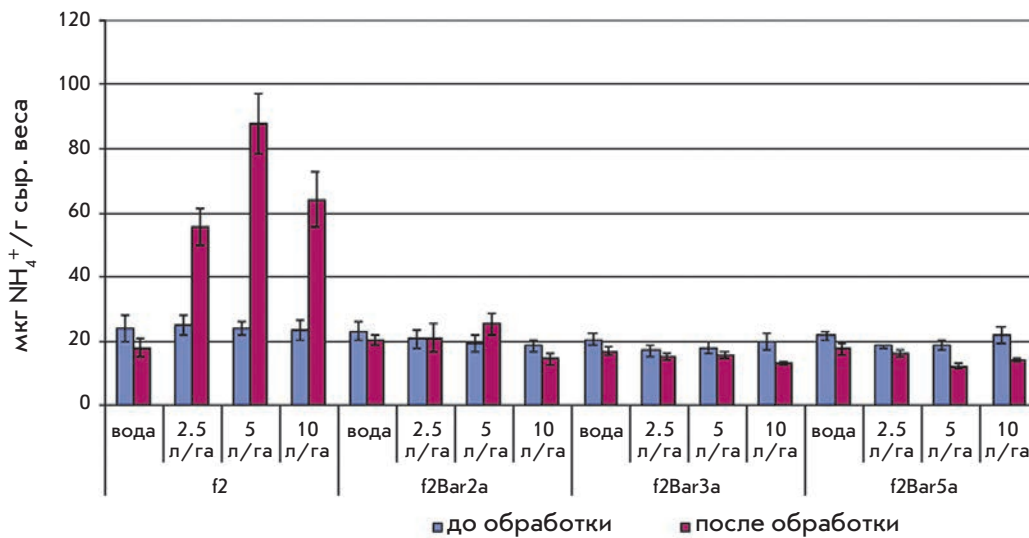


Рис. 4. Содержание аммонийного азота в листьях растений осины генотипа f2 до и после обработки гербицидом Basta

ра опускалась до -12.6°C , что примерно на 10°C ниже среднеголетних значений (рис. 6).

Как выяснилось весной после распускания почек, такое похолодание вызвало частичное подмерзание однолетних побегов или даже полную гибель растений (рис. 7). Генотип f2 показал значительно более низкую зимостойкость, чем генотип Pt. Растения линии f2ХIВар5а вымерзли полностью, у всех растений линии f2ХIВар3а отмечено подмерзание побегов (в среднем 22.9% длины), и только у линии f2ХIВар2а и в контроле около половины растений не получили никаких повреждений. Не погибли растения с генотипом Pt, а доля подмерзших составила 41.2–70.6% с более низкой степенью подмерзания побегов.

ОТ-ПЦР-анализ тотальной РНК пяти выживших после перезимовки трансгенных линий осины выявил

положительный сигнал ожидаемого размера у всех линий, что подтверждает транскрипцию гена *bar* (рис. 8). В нетрансгенных растениях обоих генотипов транскрипция гена *bar* не обнаружена.

Перезимовавшие растения пяти трансгенных линий осины и исходных генотипов в 2015 г. были повторно обработаны гербицидом Basta (погибшие контрольные растения заменили резервными). Развитие симптомов поражения у двулетних нетрансгенных растений было несколько замедлено по сравнению с однолетними в 2014 г. – через 3 дня после обработки гербицидом в дозе, эквивалентной 2.5 и 5 л/га, на части листьев еще оставались живые участки ткани (поражение четыре балла). Однако через 7 дней после обработки все листья нетрансгенных растений были полностью некроти-

Рис. 5. Высота растений осины в конце вегетационного сезона 2014 г.

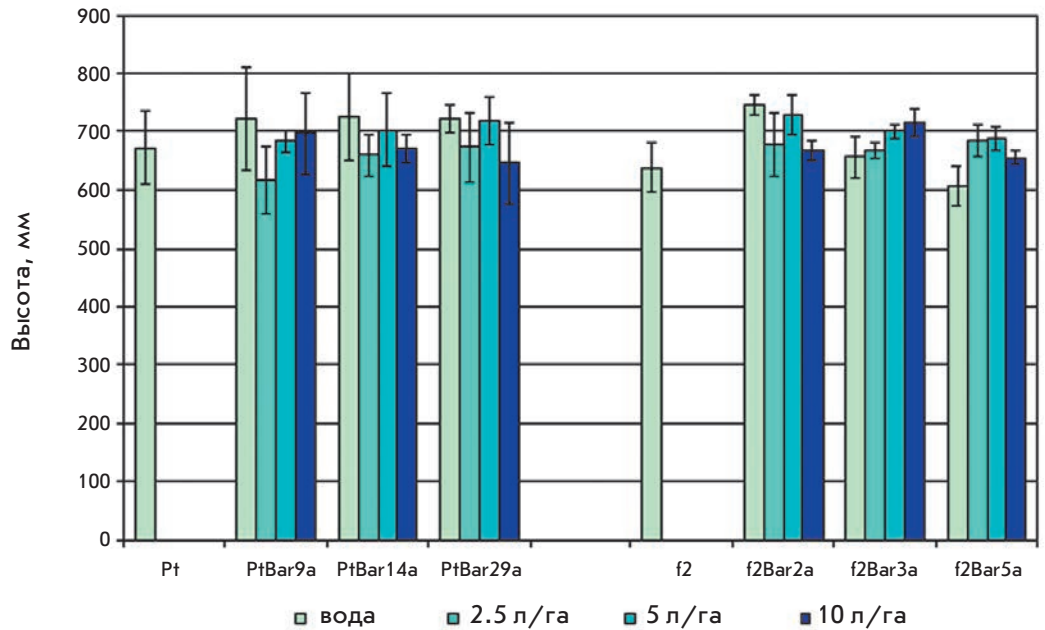
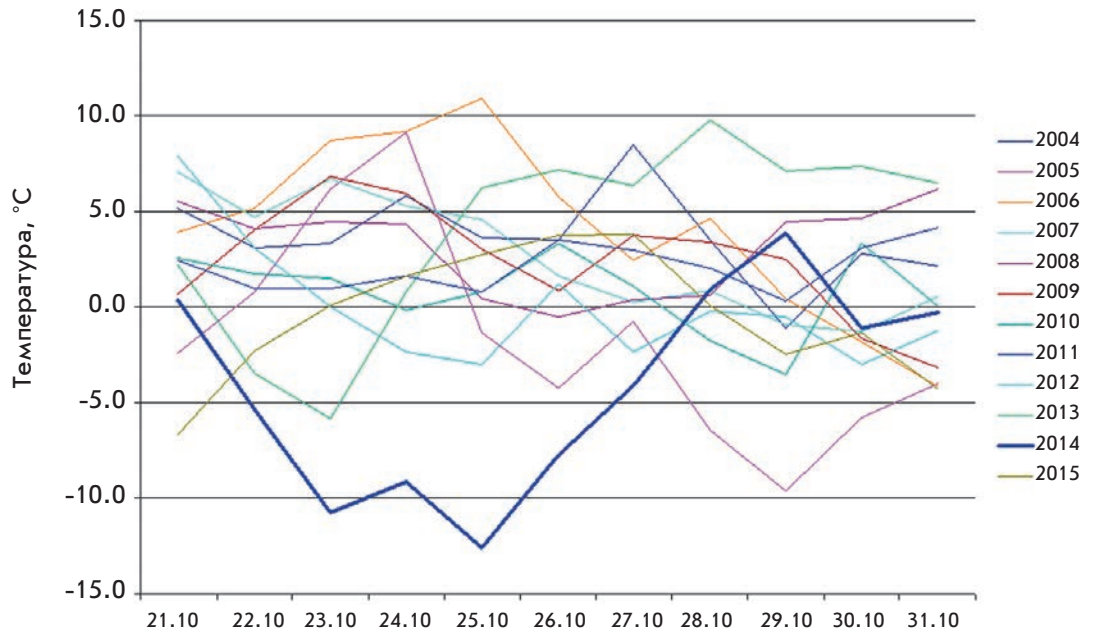


Рис. 6. Значения минимальных температур 3-й декады октября 2004–2015 гг. в Пущино



зированы (рис. 9). Не наблюдалось заметных различий в устойчивости трансгенных линий. Все растения были полностью устойчивыми к дозе 2.5 л/га. Обработка 5 л/га не вызвала симптомов поражения через 3 сут, через 7 сут на единичных листьях появились мелкие пятна некроза размером до 1 мм, через 14 сут симптомы поражения в виде пятен или полосок некроза вдоль краев листа не более

1 мм в ширину отмечены примерно у 25% всех листьев. Эффект от обработки двойной полевой дозой (10 л/га) был выражен сильнее: мелкие пятна некроза на отдельных листьях обнаружены уже на 3-й день после обработки, через 7 дней было поражено до трети всех листьев, а через 14 дней – около половины. В этом варианте мелкие пятна некроза (до 1–2 мм в диаметре) наблюдали в основном у краев

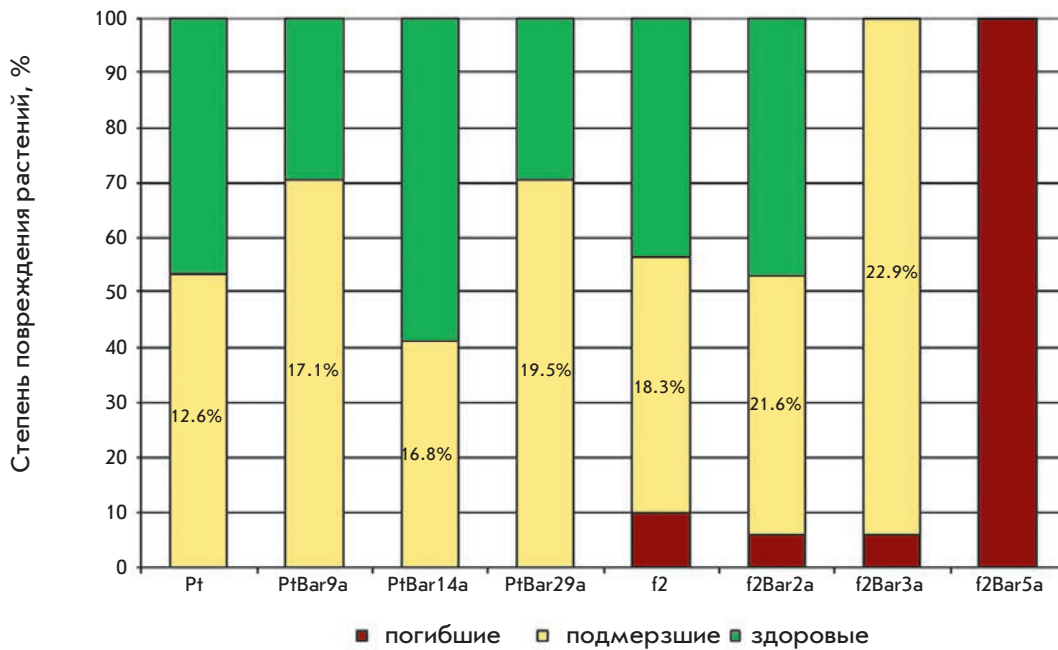


Рис. 7. Зимостойкость растений осины (степень повреждения побегов, %)

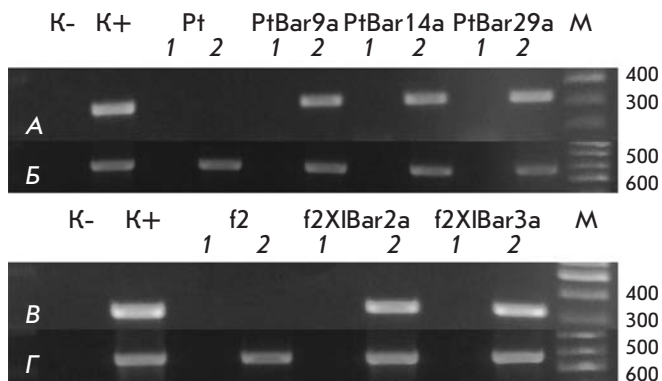


Рис. 8. ОТ-ПЦР-анализ экспрессии генов *bar* (А, В) и актина (Б, Г) в растениях осины генотипов Pt (А, Б) и f2 (В, Г). К- – вода; К+ – ДНК нетрансгенной осины (актин) или pVlBar (*bar*); 1 – РНК трансгенных линий; 2 – кДНК трансгенных линий; М – молекулярный маркер



Рис. 9. Двулетние растения осины генотипа f2 через 7 дней после обработки гербицидом Basta: слева – нетрансгенный контроль, справа – линия f2XlBar2a (в каждой группе слева направо – вода, 2.5, 5, 10 л/га)

листа, только у некоторых листьев в верхней части побегов (2–3 листа на растение) некроз занимал до 10–15% площади. После 14 дней дальнейшего развития симптомов поражения не наблюдалось.

На основе проведенных исследований отобрали четыре трансгенные линии, PtXlBar9a, PtXlBar14a, PtXlBar29a и f2XlBar2a, обладающие высокой устойчивостью к гербициду с ФФТ и максимальным уровнем зимостойкости.

ОБСУЖДЕНИЕ

Современные лесные плантации представляют собой искусственные насаждения интенсивного типа, предназначенные для получения специализированного сырья с продуктивностью, значительно превышающей продуктивность природных лесов. Такой эффект достигается несколькими способами, например, использованием элитных генотипов, в том числе и трансгенных, например, в апреле 2015 г. в Бразилии

одобрено коммерческое использование трансгенного эвкалипта с ускоренным ростом [24]. Немаловажное значение имеет и качественный уход, а также закладка плантаций высококачественным посадочным материалом, выращивание которого в питомниках невозможно без борьбы с сорняками. Химический способ борьбы позволяет увеличить выход посадочного материала и повысить его качество, существенно снизив при этом трудовые и денежные затраты. Придание устойчивости к гербицидам методами генной инженерии позволяет упростить борьбу с сорняками химическим способом, не повреждая при этом культурные растения. С этой целью в растения осины был встроены ген *bar* из почвенной бактерии *S. hygrosopicus* [9]. Этот ген не только придает устойчивость к гербицидам на основе ФФТ, но и является одним из наиболее широко используемых в генной инженерии селективных генов [25]. Кроме того, в отличие от большинства других генов устойчивости к гербицидам, ген *bar* обеспечивает инактивацию действующего вещества гербицида.

Для трансформации мы использовали элитные генотипы осины российского происхождения, отличающиеся ускоренным ростом и устойчивостью к сердцевинной гнили. Например, насаждения клона 34 (исходный материал для культуры *in vitro* генотипа f2) в возрасте 47 лет превосходили насаждения обычной осины по сумме площадей сечений на 51%, по запасу – на 43%, а доля деревьев со ствольными гнилями у этого клона была ниже в 4.7 раза [26]. Методом ПЦР встраивание гена *bar* подтверждено у 13 трансформантов. Эксперимент *in vitro* показал устойчивость всех трансгенных линий к летальной для нетрансгенных растений концентрации ФФТ в среде, что подтверждает экспрессию встроенного гена. Дальнейшие испытания устойчивости растений осины к гербицидам проводили в полунатуральных условиях: рост корневой системы ограничен объемом посадочного контейнера, но растения находятся в открытом грунте и подвержены всем воздействиям окружающей среды. В настоящее время это наиболее приближенный к естественным условиям уровень работы с трансгенными растениями, доступный в России, так как полевые испытания не проводятся уже около 10 лет. Растения обрабатывали или водой, или гербицидом Basta в дозах, эквивалентных 2.5, 5 и 10 л/га. Этот гербицид в дозе 1.5–2.5 л/га используется в качестве десиканта, а 4–5 л/га – в качестве гербицида. Таким образом, максимальная концентрация соответствовала двойной полевой дозе. Для оценки стабильности перенесенного признака обработку проводили в течение 2014 и 2015 гг. после перезимовки в естественных условиях.

Обработка однолетних растений показала, что осина очень чувствительна к ФФТ – уже через 3 сут все листья нетрансформированного контроля были полностью некротизированы. О высокой чувствительности к ФФТ растений рода *Populus* сообщалось ранее: полный некроз листьев *P. alba* наблюдали уже через 2 дня после обработки стандартной полевой дозой гербицида [3]. В отличие от контроля, трансгенные растения осины, несущие ген *bar*, показали высокую степень устойчивости – обработка 5 и 10 л/га приводила к образованию незначительных пятен некроза. Гербицид не вызвал ослабления роста ни одной из шести линий осины, тогда как в работе Meilan и соавт. [6] снижение роста наблюдали у 25% линий гибридов *Populus*, обработанных однократной дозой и у 17–61% – двукратной. Другие деревья с геном *bar* также проявляли высокую степень устойчивости: к двукратной дозе гербицидов с ФФТ были устойчивы растения эвкалипта [11] и *P. alba* [3]. Мы наблюдали различия между генотипами в реакции на обработку гербицидом: признаки поражения у трансгенных линий на основе генотипа Pt были выражены в большей степени, чем генотипа f2. Наши растения *P. tremula*, погибшие после обработки 375 г/га ФФТ, оказались более чувствительными к ФФТ, чем гибрид *P. alba* × *P. tremula*, который выжил после обработки 400 г/га ФФТ [10].

В клетках растений аммоний, выделяемый при восстановлении нитрата, деградации аминокислот и фотодыхании, эффективно детоксифицируется только глутаминсинтетазой [7], поэтому растения очень чувствительны к ингибиторам этого фермента, одним из которых является ФФТ. Накопление аммония в растениях, обработанных ФФТ, широко используется в качестве биохимического маркера ингибирования глутаминсинтетазы [27]. В однолетних нетрансгенных растениях осины через 3 сут после обработки содержание аммония увеличилось в 2.2–4.6 раза в зависимости от дозы и генотипа. По-видимому, генотип Pt более чувствителен к действию гербицида (рост в 2.7–4.6 раза), чем f2 (рост в 2.2–3.7 раза). Наблюдаемое нами повышение содержания аммония у осины было значительно менее выражено, чем у гибрида *P. alba* × *P. tremula*, когда через 24 ч содержание выросло почти в 100 раз – с 9 до 800–900 мкг/г сырого веса [10]. Это можно объяснить различиями в генотипах, времени после обработки – 72 и 24 ч, дозе ФФТ – 0.375–1.5 и 4 кг/га и скорости метаболизма, связанной с возрастом растений и нахождением в теплице или на открытой площадке. Во всех шести трансгенных линиях осины обработка гербицидом не привела к существенному повышению уровня аммония, довольно сходному во всех вариантах (12.4–27.0 мкг/г сырого веса). Этим наши ре-

зультаты отличаются от данных работы Asano и соавт. [28], которые наблюдали примерно 10-кратный разброс в содержании аммония в шести трансгенных линиях *Agrostis*, несущих ген *bar*, через 3 дня после обработки гербицидом, почти достигавший уровня нетрансгенных растений. У нас же, наоборот, в большинстве вариантов содержание аммония снизилось, и в трех вариантах, где снижение составило 34–36% (f2X1Bar3a после 10 л/га и f2X1Bar5a после 5 и 10 л/га), оно было значимым. Возможно, это связано с какими-то процессами, протекавшими в этот 3-дневный период, например с включением аммония в азотный метаболизм. Высокие дозы гербицида, вызвавшие некроз на листьях трансгенных растений, не отразились на содержании аммония.

Считается, что токсичность накапливаемого аммония является основным фактором гербицидной активности ФФТ [8, 29]. С другой стороны, показано, что действие гербицида обусловлено, главным образом, не накоплением аммония, а отсутствием глутамина, что делает невозможным синтез важнейших азотсодержащих соединений, образующихся из амидного и аминного азота глутамина [30]. Учитывая полный некроз листьев нетрансгенных растений осины при повышении уровня аммония всего в 2.2 раза, отсутствие взаимосвязи между поражением листьев и уровнем аммония у трансгенных растений, а также способность растений выживать при многократном повышении уровня аммония [31], можно предположить, что фитотоксичность аммония не является основной причиной гибели осины после обработки ФФТ.

Для оценки чувствительности к ФФТ использовали такой показатель, как снижение сырой [8] или сухой [32] массы. Так как гербицид Basta применяется и в качестве десиканта, мы решили использовать показатель обезвоживания листовой ткани. Обработка гербицидом вызвала резкое обезвоживание нетрансгенных растений – содержание воды упало почти в 3 раза независимо от дозы. По-видимому, уже в дозе 2.5 л/га (стандартной для десикации) был достигнут некий физиологический предел обезвоживания. Появление пятен некроза на листьях трансгенных растений, обработанных гербицидом в дозе 5 и 10 л/га, не отразилось на содержании в них воды, которое колебалось в диапазоне 95–102% по сравнению со значениями до обработки всех растений, в том числе и обработанных водой. Стоит отметить, что у контрольных растений f2 влажность снизилась в меньшей степени (в 2.4–2.7 раза), чем у растений Pt (в 2.6–3 раза).

В середине–конце октября 2014 г. в Европейской России произошло резкое похолодание, которое наблюдалось впервые с 1982 г. [33]. Отрицательные

аномалии в этот период достигали 8–11°C, и температура соответствовала середине декабря. Незапланированные испытания осины на зимостойкость привели к гибели всех растений линии f2X1Bar5a и к подмерзанию всех растений линии f2X1Bar3a. Это позволяет предположить некие изменения в этих линиях, значительно снизившие их устойчивость к низким температурам в осенний период. Интересно, что из трех трансгенных линий генотипа f2 именно у двух наиболее пострадавших отмечено существенное снижение уровня аммония после обработки гербицидом. Уровень зимостойкости остальных четырех трансгенных линий осины был значительно выше и находился на уровне нетрансгенных растений обоих генотипов. Этот случай лишь раз подтверждает необходимость проведения полевых испытаний многолетних растений в течение длительного периода времени и в различных климатических зонах.

Помимо уровня экспрессии встроенных генов, для древесных растений особенно важна ее стабильность, так как они растут много лет, ежегодно подвергаясь сменам периодов покоя и роста, а также воздействию различных абиотических и биотических стрессов. Нестабильная экспрессия перенесенных генов и, как следствие, проявление новых признаков ставит под вопрос коммерческую ценность таких растений. Стабильную экспрессию гена *bar* в гибридах *Populus* в полевых условиях без затухания наблюдали на протяжении трех [34] или восьми лет [35]. Высокий уровень устойчивости к гербициду Basta сохранялся также у подвоя груши с геном *bar* на 5-й год выращивания в поле [36]. Однако в двулетних полевых испытаниях тополя с генами устойчивости к глифосату на второй год отмечено сильное усиление повреждений двух линий из 80 от обработки гербицидами, а в некоторых линиях выявлены морфологические изменения [6]. В нашей работе сильный абиотический стресс не вызвал снижения экспрессии гена *bar* в выживших растениях осины, что подтверждено анализом экспрессии методом ОТ-ПЦР. Двулетние трансгенные растения сохранили высокий уровень устойчивости и на второй год испытаний, но развитие симптомов поражения у них было замедлено, причем и у нетрансгенных контрольных растений тоже. Это может быть связано со значительно увеличившейся листовой поверхностью или меньшей восприимчивостью к гербициду по причине более развитой кутикулы. Именно малоразвитой кутикулой объясняют сниженную устойчивость гибридов *Populus* с геном *bar*, обработанных вскоре после высадки в поле [35], но через 8 лет эти растения показали высокую устойчивость. В пользу этой версии говорит и то, что в отличие от первого года, когда пятна некроза

были относительно равномерно распределены по поверхности листа, на растениях второго года симптомы поражения концентрировались по краям листа, где кутикула могла быть тоньше. Возможно также, что нанесенный гербицид стекал к краям листа.

Так как устойчивость к гербицидам у древесных растений важна в первые годы выращивания, то такие гены целесообразно встраивать в уже трансгенные растения. Например, впервые повторная трансформация древесных растений была проведена именно геном *bar* на уже трансгенных растениях груши, несущих ген *gus* [37]. Перспективность подобного направления в лесной биотехнологии подтверждается исследованиями компании ArborGen (США), в которых гены устойчивости к гербицидам перенесли в трансгенную линию эвкалипта АГЕН427 [38], содержащую гены холодоустойчивости и стерильности [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе элитных генотипов нами получен ряд трансгенных линий осины с геном *bar*, придающим

устойчивость к гербицидам, содержащим фосфиотрицин. Двухлетние испытания в полунатуральных условиях показали устойчивость полученных линий к двукратной полевой дозе гербицида Basta. По результатам этих испытаний отобраны четыре линии (PtXIVar9a, PtXIVar14a, PtXIVar29a, f2XIVar2a), обладающие не только высокой устойчивостью к гербицидам, но и к экстремально низким температурам. Эти растения перспективны для проведения дальнейших исследований, в частности полевых испытаний. Кроме того, ген *bar* может использоваться для встраивания в другие трансгенные древесные растения, полученные ранее в нашей лаборатории и уже проявившие ценные признаки, такие, как повышенная продуктивность и модификация состава древесины [40]. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Минобрнауки РФ (ГК № 14.М04.12.0009
от 27.06.2014).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baum S., Weih M., Busch G., Krohner F., Bolte A. // *Landbauforschung*. 2009. V. 59. P. 163–170.
- Бубнов А.А. // *Труды СПбНИИЛХ*. 2014. № 3. С. 36–42.
- Confalonieri M., Belenghi B., Balestrazzi A., Negri S., Facciotto G., Schenone G., Delledonne M. // *Plant Cell Rep.* 2000. V. 19. P. 978–982.
- Fillatti J.J., Sellmer J., McCown B., Haissig B., Comai L. // *Mol. Gen. Genet.* 1987. V. 206. P. 192–199.
- Brasileiro A.C.M., Tournear C., Leple J.C., Combes V., Jouanin L. // *Transgenic Res.* 1992. V. 1. P. 133–141.
- Meilan R., Han K.-H., Ma C., DiFazio S.P., Eaton J.A., Hoiem E.A., Stanton B.J., Crockett R.P., Taylor M.L., James R.R., et al. // *Can. J. For. Res.* 2002. V. 32. P. 967–976.
- Mifflin B.J., Lea P.J. // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1977. V. 28. P. 299–329.
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizawa Y., Takematsu T. // *J. Pestic. Sci.* 1986. V. 11. P. 33–37.
- De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossel V., Movva N.R., Thompson C., van Montagu M., Lee-mans J. // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 2513–2518.
- De Block M. // *Plant Physiol.* 1990. V. 93. P. 1110–1116.
- Harcourt R.L., Kyo-zuka J., Floyd R.B., Bateman K.S., Tanaka H., Decroocq V., Llewellyn D.J., Zhu X., Peacock W.J., Dennis E.S. // *Mol. Breed.* 2000. V. 6. P. 307–315.
- González E., Gugliermoni C., Galvão M., Fagundes M., Ferreira M., Almeida G., Alves H., Gonsalves J., Silva F., Bentive-nha S., et al. // *BMC Proc.* 2011. V. 5 (Suppl. 7). P. 135.
- Alvarez R., Alvarez J.M., Humara J.M., Revilla A., Ordas R.J. // *Biotechnol. Lett.* 2009. V. 31. P. 1477–1483.
- Bishop-Hurley S.L., Zabkiewicz R.J., Grace L., Gardner R.C., Wagner A., Walter C. // *Plant Cell Rep.* 2001. V. 20. P. 235–243.
- Parasharami V.A., Naik V.B., von Arnold S., Nadgauda R.S., Clapham D.H. // *Plant Cell Rep.* 2006. V. 24. P. 708–714.
- Жигунов А.В., Шабунин Д.А., Бутенко О.Ю. // *Вестник ПГТУ. Серия: Лес. Экология. Природопользование*. 2014. № 4. С. 21–30.
- Lloyd G., McCown B. // *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 1981. V. 30. P. 421–427.
- Падегимас Л.С., Шульга О.А., Скрыбин К.Г. // *Молекуляр. биология*. 1994. Т. 28. С. 437–443.
- Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Шадрин Т.Е., Булатова И.В., Абрамочкин Д.Г., Мирошников А.И. // *Генетика*. 2010. Т. 46. С. 1458–1466.
- Rogers S.O., Bendich A.J. *Plant Mol. Biol. Manual*. Kluwer Acad. Publ., 1994. P. 1–8.
- De Block M., De Brouwer D., Tenning P. // *Plant Physiol.* 1989. V. 91. P. 694–701.
- Weatherburn M. // *Anal. Chem.* 1967. V. 39. P. 971–974.
- Chang S., Puryear J., Cairney J.A. // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1993. V. 11. P. 113–116.
- Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 577. doi: 10.1038/nbt0615-577c.
- Green J.M., Micheal D.K. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 5819–5829.
- Багаев С.Н., Багаев Е.С. // *Лесное хозяйство*. 1990. № 4. С. 45–48.
- Avila-Garcia W.V., Carol Mallory-Smith C. // *Weed Sci.* 2011. V. 59. P. 305–309.
- Asano Y., Ito Y., Fukami M., Sugiura K., Fujie A. // *Plant Cell Rep.* 1998. V. 17. P. 963–967.
- Pornprom T., Chompoo J., Grace B. // *Weed Biol. Management*. 2003. V. 3. P. 41–45.
- Евстигнеева З.Г., Соловьева Н.А., Сидельникова Л.И. // *Прикл. биохим. и микробиол.* 2003. Т. 39. С. 613–618.
- Petrović A., Yoshida Y., Ohmori T. // *J. Hort. Sci. Biotech.* 2009. V. 84. P. 181–186.
- Nolte S.A., Young B.G., Mungur R., Lightfoot D.A. // *Weed Res.* 2004. V. 44. P. 335–339.

33. Гидрометцентр, 03.11.2014, <http://meteoinfo.ru/news/1-2009-10-01-09-03-06/10052-03112014-2014->
34. Li J., Brunner A.M., Meilan R., Strauss S.H. // *Tree Physiol.* 2009. V. 29. P. 299–312.
35. Li J., Meilan R., Ma C., Barish M., Strauss S.H. // *West J. Appl. For.* 2008. V. 23. P. 89–93.
36. Lebedev V.G., Dolgov S.V. // *Acta Hort.* 2008. V. 800. P. 373–382.
37. Lebedev V.G., Skryabin K.G., Dolgov S.V. // *Acta Hort.* 2002. V. 596. P. 193–197.
38. Gulledge E., Judy C., Cunningham M. // AAIC 25th Anniversary Meeting, October 12–16, 2013, Washington, USA. <http://www.se-ibss.org/publications-and-patents/presentations/building-herbicide-resistance-for-short-rotation-hardwood-crops>
39. Zhang C., Norris-Caneda K.H., Rottmann W.H., Gulledge J.E., Chang S., Kwan B.Y., Thomas A.M., Mandel L.C., Kothera R.T., Victor A.D., et al. // *Plant Physiol.* 2012. V. 159. P. 1319–1334.
40. Shestibratov K., Lebedev V., Podrezov A., Salmova M. // *BMC Proc.* 2011. V. 5 (Suppl. 7). P. 124.

УДК 616.13.002.2-004.6

Цитомегаловирус в плазме больных острым коронарным синдромом

Е. А. Никитская¹, Ж.-Ш. Гривель²⁺, Е. В. Марюхнич¹, А. М. Лебедева¹, О. И. Иванова¹, П. П. Саввинова¹, А. В. Шпектор¹, Л. Б. Марголис², Е. Ю. Васильева^{1*}

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, лаборатория атеротромбоза, 127473, Москва, Делегатская ул., 20/1, Россия

²Отдел межклеточных взаимодействий, Национальный институт детского здоровья и развития человека им. Юнис Кеннеди Шрайвер Национальных институтов здоровья, Бетезда, Мэриленд, США

⁺ В настоящее время работает в Медицинском и исследовательском центре Сидра, Доха, Катар

*E-mail: vasilievahelena@gmail.com

Поступила в редакцию 02.09.2015

Принята к печати 24.02.2016

РЕФЕРАТ О существовании взаимосвязи между развитием острого коронарного синдрома (ОКС) и признаками локальной и системной воспалительной реакции, включающей повышение в крови воспалительных маркеров, таких, как С-реактивный белок (СРБ), известно уже более 100 лет. Традиционно воспалительную реакцию при атеросклерозе объясняют реакцией иммунной системы на липопротеиды низкой плотности. Тем не менее ряд данных указывает на возможное участие цитомегаловируса (ЦМВ) в активации воспаления при атеросклерозе и его прогрессировании с развитием ОКС. Однако доказательства были косвенными и сводились, главным образом, к связи прогноза ишемической болезни сердца (ИБС) с титром антител к ЦМВ. Мы предположили, что при обострении ИБС может происходить реактивация вируса с его выходом в кровоток. Цель нашей работы состояла в сравнении количества ДНК ЦМВ в плазме крови пациентов с различными формами ИБС и у здоровых добровольцев. Обследовано 150 человек (97 с различными формами ИБС и 53 здоровых добровольца). Методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) определено количество копий ДНК ЦМВ в плазме крови. Показано, что количество копий генома ЦМВ в плазме больных ОКС значительно выше, чем у здоровых доноров ($p = 0.01$). Количество копий ДНК ЦМВ коррелировало с уровнем СРБ в плазме. Эти результаты указывают на возможную взаимосвязь между активацией ЦМВ и обострением атеросклероза, что приводит к развитию ОКС. Определение содержания ЦМВ в плазме больных ИБС в динамике может помочь в разработке новых подходов к лечению больных коронарным атеросклерозом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирусы герпеса человека, ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром, полимеразная цепная реакция, цитомегаловирус.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВГЧ – вирусы герпеса человека; вч-СРБ – С-реактивный белок, измеренный высокочувствительным методом; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ОИМ – острый инфаркт миокарда; ОКС – острый коронарный синдром; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени, ХИБС – хроническая ишемическая болезнь сердца; ЦМВ – цитомегаловирус.

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклеротическое поражение коронарных артерий часто приводит к развитию ишемической болезни сердца (ИБС), проявляющейся стенокардией или безболевым ишемией миокарда. Это заболевание может тянуться годами в виде хронических форм ИБС (ХИБС), иногда резко обостряясь, что клинически манифестирует в виде нестабильной стенокардии или острого инфаркта миокарда (ОИМ). Эти клинические проявления принято объединять под названием острый коронарный синдром (ОКС). Предполагается,

что морфологическим субстратом такого обострения является воспаление с последующим разрывом атеросклеротической бляшки и тромбообразованием [1–3]. Несмотря на то что уже второе столетие, со времен Вирхова, обсуждается роль воспаления в развитии и прогрессировании атеросклероза [4], полной ясности в причинах этого воспаления нет. Сам факт воспаления подтверждается наличием макрофагов и лимфоцитов в бляшках, повышением уровня воспалительных цитокинов у больных атеросклерозом и др. [5–10]. Согласно наиболее признанной теории,

первичным триггером воспалительной реакции в сосудистой стенке считается субэндотелиальное накопление окисленных липопротеидов низкой плотности [11–13]. В то же время сообщается о присутствии в атеросклеротических бляшках различных бактерий и вирусов [14–19], которые также могут провоцировать воспалительную реакцию. Особое внимание привлекают герпесвирусы, прежде всего цитомегаловирус (ЦМВ). Во многих эпидемиологических работах обнаружена связь между заболеваемостью коронарным атеросклерозом, частотой развития острого инфаркта миокарда и уровнем антител к ЦМВ в крови [20, 21]. Это не позволяет, однако, оценить активность вирусной инфекции непосредственно при обострении атеросклероза. Исключение представляет работа S. Gredmark и соавт. [22], в которой показано, что РНК ЦМВ в моноцитах больных ОКС встречается чаще, чем у здоровых доноров и больных хроническими формами ИБС, что указывает на вероятную активацию этого вируса при ОКС. В то же время прямое определение содержания ЦМВ в плазме больных с атеросклеротическим поражением коронарных артерий ранее не проводили. Появление вируса в плазме может свидетельствовать о его активации [23–25]. В настоящей работе проведено сравнительное исследование ЦМВ в плазме больных различными формами ИБС и у здоровых добровольцев.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика групп больных и здоровых добровольцев

В исследовании приняли участие 150 человек, 97 из них – с ИБС и 53 здоровых добровольца. 71 пациент поступил в кардиореанимацию городской клинической больницы имени И.В. Давыдовского с диагнозом острый коронарный синдром, у 47 из них

диагностирован ОИМ с или без подъема сегмента ST в соответствии с Универсальным определением Европейского общества кардиологов [26], нестабильная стенокардия диагностирована в 24 случаях. 26 пациентов были госпитализированы в плановом порядке. ИБС диагностировали на основании клинической картины и положительных результатов стресс-теста, что впоследствии было подтверждено при проведении коронарографии [27]. У всех больных оценивали клинический прогноз, не зарегистрировано ни одного летального исхода, гемодинамически значимого кровотечения, инсульта или тромбоза стента. У двоих пациентов с ОКС при поступлении диагностирован кардиогенный шок, у двоих – острая сердечная недостаточность, у 12 – острая аневризма левого желудочка, у семи пациентов с тяжелым поражением коронарных артерий повторялись приступы стенокардии.

Обследование здоровых добровольцев включало опрос, биохимический анализ крови, а также ультразвуковое исследование сердца и сонных артерий, стресс-тест. По данным обследования в контрольной группе не было лиц с признаками атеросклероза.

Группы пациентов не отличались между собой по возрасту и полу, однако отличались по наличию таких факторов риска, как ожирение, артериальная гипертензия и сахарный диабет (табл. 1).

Все участники подписали информированное согласие на участие в данном исследовании, проведение которого одобрено локальным этическим комитетом Московского медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова.

Выделение вирусной ДНК из плазмы крови

У всех пациентов в течение 24 ч от момента госпитализации проводили забор 5 мл крови в пробирку с цитратом натрия. Образцы крови центрифугиро-

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с ИБС и здоровых добровольцев

Показатель	Пациенты с ОКС	Пациенты с ХИБС	Здоровые добровольцы	p
Число пациентов	71	26	53	
Средний возраст	64.4 ± 9.7	66.3 ± 10.6	61.3 ± 12.3	0.116
Мужчины	63.4 %	65.4 %	50.9 %	0.298
Курение	28.2 %	11.5 %	20.8 %	0.205
Гиперлипидемия	35.2 %	15.4 %	34.0 %	0.135
Ожирение	45.1 %	23.1 %	15.1 %	0.001*
Гипертензия	90.1 %	92.3 %	47.2 %	0.000*
Сахарный диабет	31.0 %	19.2 %	1.9 %	0.0002*

Представлены клинические характеристики всех трех групп пациентов.

*Отличия статистически значимы при $p < 0.05$.

Таблица 2. Праймеры и пробы ЦМВ

Зонд/Праймер	Нуклеотидная последовательность	5'-модификация	3'-модификация
Зонд	tacctggagtccttctgcgagga	CAL Fluor Red 610*	BHQ-2 **
Прямой праймер	aaccaagatgacaggtgatagg		
Обратный праймер	agcgtgacgtgcataaaga		

*CAL Fluor Red 610 – флуоресцентная метка на зонде.

**BHQ-2 – гаситель флуоресценции.

вали в течение 10 мин при 2500 об/мин, после чего отбирали плазму, замораживали в стерильных пробирках и хранили при температуре -80°C до дальнейшего использования.

Образцы размораживали, из плазмы выделяли ДНК по стандартному протоколу с использованием колонок QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen, Германия). Для элюции использовали 60 мкл специального буфера из этого же набора. До проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) образцы ДНК хранили при температуре -20°C .

Количественная ПЦР-РВ

ЦМВ выявляли методом ПЦР-РВ (CFX 96 C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad, США) с использованием высокочувствительных праймеров и 5'-3'-гидролизуемого зонда к гену белка тегумента pp65 ЦМВ (табл. 2). Амплификацию оценивали по стандартной кривой с использованием различных разведений стандартов (Bioresarch technologies, США), а также смеси для ПЦР ToughMix (Quanta, США, Cat# 95147-250).

ПЦР-РВ проводили по стандартному трехступенчатому протоколу: 1-й шаг – денатурация при 95°C , 5 мин; 2-й шаг – 95°C , 30 с; 3-й шаг – 60°C , 60 с.

Далее происходило считывание сигнала флуоресценции.

Второй и третий шаги повторялись снова в течение 45 циклов. Флуоресценция, детектируемая до 37-го цикла, считалась специфичной. Результаты представлены в виде числа копий ДНК ЦМВ в 1 мкл плазмы крови пациента.

Измерение С-реактивного белка высокочувствительным методом (вч-СРБ)

У всех пациентов при поступлении определяли вч-СРБ, уровень которого коррелирует с риском возникновения сердечно-сосудистых событий [28]. Этот белок определяли в плазме крови с помощью автоматического анализатора (Siemens Dimension Xpand Plus, Германия) с использованием реактивов С-Reactive Protein Flex Reagent (Siemens #DF37, Германия).

Статистическая обработка данных

Статистический анализ выполняли в программе Статистика 9.0. Все данные, полученные в исследовании, не имели признаков нормального распределения на основании теста Шапиро–Уилка и поэтому представлены с помощью медианы и интерквартильных интервалов. Вследствие непараметрического распределения для сравнения двух групп между собой использовали тест Манна–Уитни. При сравнении более двух групп применяли непараметрическую статистику с тестом Краскела–Уоллиса и ранговым тестом множественных сравнений. Также использовали коэффициент корреляции Спирмена. Различия между группами считали статистически значимыми при уровне $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Небольшие концентрации ДНК ЦМВ (более 100 копий в 1 мкл плазмы крови) достаточно часто обнаруживали как у больных, так и у здоровых добровольцев. Частота обнаружения вируса в трех группах различалась статистически значимо и была самой высокой у пациентов с ОКС (табл. 3).

При сравнении количества копий ДНК цитомегаловируса в трех группах выявлены значимые различия между пациентами с ОКС и здоровыми добровольцами (213.15 [101.21–436.67] против 82.10 [18.58–188.67] соответственно, $p = 0.012$). При этом статистически значимых отличий между группой хронической ИБС и группой здоровых добровольцев не обнаружено. Результаты представлены на рис. 1. Кроме того, в данной когорте установлена статисти-

Таблица 3. Частота встречаемости ЦМВ в различных группах

	Здоровые добровольцы	Пациенты с ОКС	Пациенты с ХИБС	p
Количество вирус-положительных пациентов	46.15% (18/39)	77.08% (37/48)	55.56% (10/18)	0.013

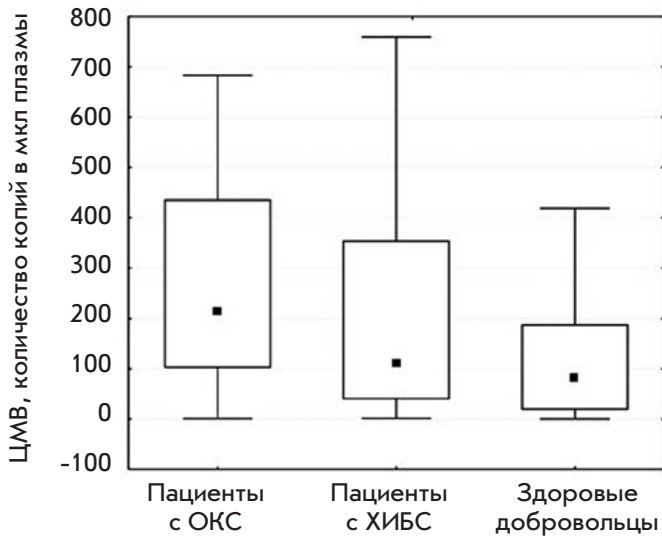


Рис. 1. Сравнение количества копий ДНК ЦМВ в плазме крови в исследуемых группах. Показана медиана с 25–75 перцентильями количества копий ДНК ЦМВ в указанных трех группах. Выявлены значимые различия между группой с ОКС и группой здоровых добровольцев ($p = 0.012$)

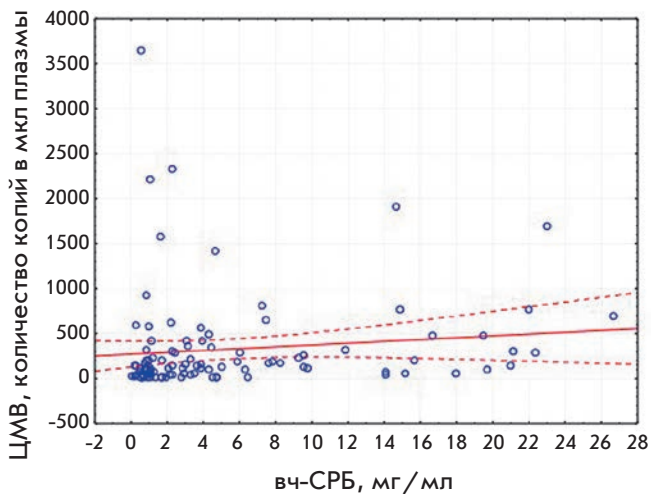


Рис. 2. Корреляция между количеством копий генома ЦМВ и уровнем вч-С-реактивного белка. Приведены результаты индивидуального анализа количества копий ЦМВ и уровня вч-СРБ. Показана корреляционная зависимость между показателями с 95% доверительными интервалами. При анализе исключены два значения, выпадающие из общего множества, которые примерно в 10 раз превышали средние значения в когорте. До исключения выпадающих значений коэффициент корреляции R был 0.25 ($p = 0.011$), после исключения $R = 0.30$ ($p = 0.002$)

чески значимая ($p = 0.002$) положительная корреляция между количеством копий ЦМВ и уровнем вч-СРБ (рис. 2).

Таким образом, нами показано, что встречаемость и количество копий ЦМВ в плазме крови больных острыми формами ИБС значимо выше, чем у здоровых. Различий между хроническими формами ИБС и контрольной группой не обнаружено.

Полученные нами данные показывают, что довольно часто небольшое количество вируса присутствует в плазме здоровых людей (см. табл. 3). Это согласуется с данными о серопозитивности взрослого населения разных стран по ЦМВ, полученными в результате эпидемиологических исследований [24, 29, 30]. Наши данные свидетельствуют о том, что количество копий ДНК ЦМВ может существенно возрастать при патологии: при ОКС оно более чем в 2 раза превышало количество у здоровых добровольцев. Наши результаты в целом согласуются с эпидемиологическими данными о корреляции между наличием ЦМВ и прогрессированием атеросклероза при учете титра антител к ЦМВ [31]. Так, в одном из эпидемиологических исследований выявлена корреляция между смертностью вследствие сердечно-сосудистых заболеваний и уровнем титра антител к ЦМВ [17]. В исследовании ARIC также показано, что титр антител к ЦМВ пропорционален увеличению толщины интима-медиа сонных артерий [32]. Однако результаты сероэпидемиологических исследований противоречивы. Например, в проспективном контролируемом исследовании Р.М. Ridker и соавт. не выявлено взаимосвязи между наличием антител к ЦМВ и риском атеротромботических событий. При этом высоту титра антител отдельно не оценивали [33].

Ранее герпесвирусную ДНК выявляли в бляшках и моноцитах крови методом ПЦР [34]. Melnick и соавт. [35] впервые показали, что ДНК ЦМВ содержится в стенках артерий больных атеросклерозом. Концентрация вирусной ДНК была выше в артериальной стенке пациентов, перенесших реконструктивные сосудистые операции (аортокоронарное шунтирование), по сравнению с пациентами с ранним атеросклерозом [36]. Позднее ЦМВ находили в атеросклеротических бляшках [37]. Нами также проведено исследование образцов, полученных от пациентов, умерших вследствие острого инфаркта и его осложнений, однако не выявили достоверных отличий в количестве копий ДНК ЦМВ в атеросклеротических бляшках и в коронарных артериях без макроскопических признаков атеросклероза [38].

Противоречивость этих данных может быть связана с тем, что как серопозитивность по ЦМВ, так и наличие ДНК ЦМВ в тканях и клетках крови не позволяют сделать вывод о репликации вируса.

В нашей работе количество копий ДНК ЦМВ определяли в плазме больных с различными формами ИБС. Присутствие вируса в плазме свидетельствует о продуктивной инфекции [23, 24, 29, 30]. Другим показателем продуктивной инфекции может служить появление РНК ЦМВ, которая была выявлена в мононуклеарах периферической крови [22]. В моноцитах крови больных ОКС количество РНК ЦМВ было значимо выше, чем у пациентов со стабильной стенокардией и здоровых добровольцев ($p < 0.001$), при этом встречаемость РНК ЦМВ в моноцитах была относительно небольшой и составила 2% в группе здоровых добровольцев, 10% при ХИБС и 15% при ОКС [22]. В целом, эти данные согласуются с результатами нашей работы. Однако частота встречаемости вируса в наших группах была выше, возможно, за счет того, что моноциты крови не являются единственными клетками организма, выделяющими ЦМВ в плазму.

Морфологической основой ОКС является разрыв атеросклеротической бляшки, вероятно, вследствие протекающего в ней воспалительного процесса. В целом ряде работ с использованием гистохимических методов показано, что в бляшках имеются активированные лимфоциты и макрофаги [11, 12, 39–42]. Ранее мы использовали оригинальную методику выделения клеток в бляшке с сохранением их поверхностных антигенов и оценки с помощью проточной цитометрии [43]. Это позволило количественно оценить число активированных лимфоцитов ($CD8^+CD25^+$ и $CD8^+HLA-DR^+$) в бляшках, которое оказалось значимо выше, чем в крови. В других работах, в том числе и нашей группы, методом ПЦР в реальном времени в сосудах обнаружен ряд бактерий и вирусов, включая ЦМВ [38]. Это может быть причиной хронической активации иммунной системы в сосудах, стимулирующей развитие атеросклероза [44]. Какую роль в такой активации играют окисленные липопротеиды, а какую сами микроорганизмы, остается неясным. Нельзя исключить, что обнаружение вирусов в сосудах не имеет отношения к самому атеросклерозу. Они могут находиться в сосудистой стенке,

не играя никакой патогенетической роли в развитии этой патологии. Данные, полученные в настоящей работе, опровергают это предположение: повышенный уровень ДНК ЦМВ в плазме больных ОКС говорит о его повышенной репликации при обострении атеросклероза. Не ясно, играет ли основную роль в прогрессировании атеросклероза именно активация ЦМВ или другие микроорганизмы тоже могут участвовать в этом процессе. Не определено и соотношение двух факторов – размножения ЦМВ и гиперлипидемии. Возможна и комбинация обоих механизмов: при размножении ЦМВ в бляшке макрофаги могут более активно накапливать липопротеиды, которые, окисляясь, в свою очередь могут усиливать воспалительные реакции в стенке сосуда. Для ответа на эти вопросы необходимы дальнейшие исследования. Перспективным представляется, прежде всего, дальнейшее определение уровня ЦМВ в плазме больных различными формами коронарного атеросклероза и сопоставление содержания вируса с динамикой клинической картины заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами показано, что у больных ОКС происходит активация ЦМВ. При этом количество копий ДНК ЦМВ в плазме коррелирует с уровнем вч-СРБ – маркера системного воспаления. Можно предположить, что активация ЦМВ является одним из пусковых механизмов воспалительного процесса в атеросклеротической бляшке, что приводит к нарушению ее целостности с последующим образованием тромба. Дальнейшее изучение механизмов воздействия ЦМВ на прогрессирование атеросклероза может быть полезно при разработке новых подходов к лечению ИБС. ●

*Работа выполнена при поддержке мегагранта
Министерства образования и науки Российской
Федерации (№ 14.В25.31.0016).*

*Работа Ж.-Ш. Гривеля и Л.Б. Марголиса
поддержана внутренней программой
Национального института здоровья США.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hamm C.V., Murray C.J., Lopez A.D. // Lancet. 1997. V. 349. P. 1498–1504.
- Hamm C.W., Bassand J.P., Agewall S., Bax J., Boersma E., Bueno H., Caso P., Dudek D., Gielen S., Huber K., et al. // Eur. Heart J. 2011. V. 32. P. 2999–3054.
- Steg P.G., James S.K., Atar D., Badano L.P., Blömmström-Lundqvist C., Borger M.A., Di Mario C., Dickstein K., Ducrocq G., Fernandez-Aviles F., et al. // Eur. Heart J. 2012. V. 33. P. 2569–2619.
- Вирхов Р. // Целлюлярная патология. /Пер. с нем. М.: Медицина, 1859. 480 с.
- Galkina E., Ley K. // Annu. Rev. Immunol. 2009. V. 27. P. 165–197.
- Harja E., Bu D.X., Hudson B.I., Chang J.S., Shen X., Hallam K., Kalea A.Z., Lu Y., Rosario R.H., Oruganti S., et al. // J. Clin. Invest. 2008. V. 118. № 1. P. 183–194.
- Muller W.A. // Circ. Res. 2009. V. 105. № 3. P. 223–230.
- Galkina E., Kadl A., Sanders J., Varughese D., Sarembock I.J., Ley K. // J. Exp. Med. 2006. V. 203. № 5. P. 1273–1282.
- Ait-Oufella H., Taleb S., Mallat Z., Tedgui A. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011. V. 31. № 5. P. 969–979.
- van Berkel T.J., Out R., Hoekstra M., Kuiper J., Biessen E., van Eck M. // Curr. Opin. Lipidol. 2005. V. 16. № 5. P. 525–535.

11. Geng Y.J., Libby P. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002. V. 22. № 9. P. 1370–1380.
12. Kruth H.S. // *Curr. Opin. Lipidol.* 2002. V. 13. № 5. P. 483–491.
13. Zhu J., Nieto F.J., Horne B.D., Anderson J.L., Muhlestein J.B., Epstein S.E. // *Circulation.* 2001. V. 103. № 1. P. 45–51.
14. Padilla C., Lobos O., Hubert E., Gonzalez C., Matus S., Pereira M., Pereira M., Hasbun S., Descouvieres C. // *J. Periodontal Res.* 2006. V. 41. № 4. P. 350–353.
15. Rafferty B., Dolgilevich S., Kalachikov S., Morozova I., Ju J., Whittier S., Nowygrod R., Kozarov E. // *J. Atheroscler. Thromb.* 2011. V. 18. № 1. P. 72–81.
16. Lo J., Abbata S., Shturman L., Soni A., Wei J., Rocha-Filho J.A., Nasir K., Grinspoon S.K. // *AIDS.* 2010. V. 24. № 2. P. 243–253.
17. Pesonen E., El-Segaier M., Persson K., Puolakkainen M., Sarna S., Ohlin H., Pussinen P.J. // *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 2009. V. 3. № 6. P. 447–454.
18. Roizman B., Pellet P.E. *Fields' Virology 5th ed.* N.Y.: Lippincott-Williams and Wilkins, 2007. P. 2479–2499.
19. Stowe R.P., Peek M.K., Cutchin M.P., Goodwin J.S. // *J. Med. Virol.* 2012. V. 84. № 11. P. 1797–1802.
20. Roberts E.T., Haan M.N., Dowd J.B., Aiello A.E. // *Am. J. Epidemiol.* 2010. V. 172. № 4. P. 363–371.
21. Simanek A.M., Dowd J.B., Pawelec G., Melzer D., Dutta A. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 2. e16103.
22. Gredmark S., Jonasson L., van Gosliga D., Ernerudh J., Söderberg-Nauclér C. // *Scandinavian Cardiovasc. J.* 2007. V. 41. P. 230–234.
23. Tomtishen III J.P. // *Virology J.* 2012. V. 9. P. 22.
24. Ross S.A., Novak Z., Pati S., Boppana S.B. // *Infect. Disord. Drug Targets.* 2011. V. 11. P. 466–474.
25. Gimeno C., Solano C., Latorre J.C., Hernández-Boluda J.C., Clari M., Remigia M.J., Furió S., Calabuig M., Tormo N., Navarro D. // *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46. P. 3311–3318.
26. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., Simoons M.L., Chaitman B.R., White H.D., Lindahl B., Morrow D.A., Chaitman B.A., Clemmensen P.M., et al. // *Eur. Heart J.* 2012. V. 33. P. 2551–2567.
27. Montalescot G., Sechtem U., Achenbach S., Andreotti F., Arden C., Budaj A., Bugiardini R., Crea F., Cuisset T., Di Mario C., et al. // *Eur. Heart J.* 2013. V. 34. № 38. P. 2949–3003.
28. Lagrand L.K., Visser C.A., Hermens W.T., Niessen H.W., Verheugt F.W., Wolbink G.J., Hack C.E. // *Circulation.* 1999. V. 100. № 1. P. 96–102.
29. Tanabe K., Tokumoto T., Ishikawa N., Koyama I., Takahashi K., Fuchinoue S. // *Transplantation.* 1997. V. 64. № 12. P. 1721–1726.
30. Staras S.A., Dollard S.C., Radford K.W., Flanders W.D., Pass R.F., Cannon M.J. // *Clin. Infect. Dis.* 2006. V. 43. № 9. P. 1143–1151.
31. Ji Y.N., An L., Zhan P., Chen X.H. // *Mol. Biol. Rep.* 2012. V. 39. № 6. P. 6537–6546.
32. Nieto F.J., Adam E., Sorlie P., Farzadegan H., Melnick J.L., Comstock G.W., Szklo M. // *Circulation.* 1996. V. 94. № 5. P. 922–927.
33. Ridker P.M., Hennekens C.H., Stamper M.J., Wang F. // *Circulation.* 1998. V. 98. № 25. P. 2796–2799.
34. Smieja M., Chong S., Natarajan M., Petrich A., Rainen L., Mahony J.B. // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. № 2. P. 596–600.
35. Melnick J.L., Petrie B.L., Dreesman G.R., Burek J., McCollum C.H., DeBakey M.E. // *Lancet.* 1983. V. 2. № 8351. P. 644–651.
36. Ridker P.M., Hennekens C.H., Buring J.E., Kundsinn R., Shih J. // *Ann. Intern. Med.* 1999. V. 131. № 8. P. 573–577.
37. Izadi M., Fazel M., Saadat S.H., Nasseri M.H., Ghasemi M., Dabiri H., Aryan R.S., Esfahani A.A., Ahmadi A., Kazemi-Saleh D., et al. // *Cardiovasc. J.* 2012. V. 8. № 2. P. 42–46.
38. Никитская Е.А., Гривель Ж.-Ш., Иванова О.И., Лебедева А.М., Шпектор А.В., Марголис Л.Б., Васильева Е.Ю. // *Креативная кардиология.* 2014. № 4. С. 50–62.
39. Ferrante G., Nakano M., Prati F., Niccoli G., Mallus M.T., Ramazzotti V., Montone R.A., Kolodgie F.D., Virmani R., Crea F. // *Circulation.* 2010. V. 122. № 24. P. 2505–2513.
40. Nakajima T., Goek O., Zhang X., Kopecky S.L., Frye R.L., Goronzy J.J., Weyand C.M. // *Circ. Res.* 2003. V. 93. № 2. P. 106–113.
41. Liuzzo G., Stephen L., Kopecky S.L., Robert L., Frye, W., O'Fallon M. // *Circulation.* 1999. V. 100. № 21. P. 2135–2139.
42. Weyand C.M., Goronzy J.J., Liuzzo G., Kopecky S.L., Holmes D.R., Frye R.L. // *Mayo Clin. Proc.* 2001. V. 76. № 10. P. 1011–1020.
43. Grivel J.-C., Ivanova O., Pinagina N., Blank P.S., Shpektor A., Margolis L.B., Vasilieva E. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. V. 31. № 12. P. 2929–2937.
44. Margolis L. // *Am. J. Med.* 2015. V. 128. № 6. P. 562–566.

УДК 577.152.161; 576.08

Ингибирование поли(ADP-рибозо)-полимеразы метаболитом нуклеиновых кислот 7-метилгуанином

Д. К. Нилов^{1,2}, В. И. Тараров³, А. В. Куликов⁴, А. Л. Захаренко⁵, И. В. Гущина²,
С. Н. Михайлов³, О. И. Лаврик⁵, В. К. Швядас^{1,2*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

⁵Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 01.12.2015

Принята к печати 01.02.2016

РЕФЕРАТ Способность метаболита нуклеиновых кислот 7-метилгуанина ингибировать поли(ADP-рибозо)-полимеразу 1 (ПАРП-1) и поли(ADP-рибозо)полимеразу 2 (ПАРП-2) выявлена *in silico* и изучена экспериментально. Показано, что для эффективного связывания пуриновых производных с ПАРП важна аминогруппа в положении 2 и метильная группа в положении 7. Активность ПАРП-1 и ПАРП-2 подавляется 7-метилгуанином со значениями IC_{50} 150 и 50 мкМ соответственно. В ПАРП-ингибирующей концентрации 7-метилгуанин не токсичен, но способен усиливать апоптотическую гибель BRCA1-дефицитных клеток рака молочной железы под воздействием цисплатина и доксорубина – широко используемых ДНК-повреждающих химиотерапевтических препаратов. 7-Метилгуанин имеет привлекательный предсказанный профиль фармакокинетики и токсичности и может рассматриваться в качестве дополнительного компонента химиотерапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА докинг, ингибиторы ПАРП, молекулярное моделирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПАРП – поли(ADP-рибозо)полимераза; МД – молекулярная динамика.

ВВЕДЕНИЕ

Под действием различных факторов стресса в ДНК человека возникают генотоксичные повреждения, которые должны устраняться для обеспечения правильной репликации ДНК, транскрипции и предотвращения канцерогенеза. В клеточные пути репарации вовлечены многие белки, которые распознают и устраняют модификации азотистых оснований и разрывы цепи ДНК [1]. Поли(ADP-рибозо)полимеразы (ПАРП; [КФ. 2.4.2.30]) представляют группу эукариотических белков с разнообразными функциями, связанными в основном с репарацией ДНК и клеточной гибелью. Наиболее изученные представители семейства ПАРП-1 и ПАРП-2 обладают

ДНК-зависимой активностью и катализируют синтез поли(ADP-рибозы) [2]. Донором остатка ADP-рибозы для синтеза полимера служат молекулы NAD^+ , в ходе реакции высвобождается никотинамид и образуется гликозидная связь между остатками. Связывание белков ПАРП-1 и ПАРП-2 с поврежденной ДНК приводит к поли(ADP-рибозил)ированию как самих ферментов, так и других белков, вовлеченных в метаболизм ДНК [3–6]. Результатом данной посттрансляционной модификации являются активация и сборка систем репарации в поврежденном локусе ДНК. Так, аутомодифицированная ПАРП-1 мобилизует белок эксцизионной репарации XRCC1, ассоциированный с ДНК-полимеразой β и ДНК-

лигазой III [7–9]. Важная роль PARP-1 и PARP-2 подтверждается тем фактом, что *parp-1^{-/-}* и *parp-2^{-/-}* мыши более чувствительны к ионизирующей радиации, а двойные мутанты *parp-1^{-/-}parp-2^{-/-}* погибают на ранней стадии развития в начале гастрюляции [10].

ДНК-связывающий домен PARP-1 построен из специализированных цинковых пальцев, в то время как его структура в PARP-2 неизвестна, а соответствующий участок последовательности не обладает гомологией с описанными ДНК-связывающими мотивами. Напротив, каталитические домены и активные центры PARP-1 и PARP-2 характеризуются высоким структурным сходством как в апоформе, так и в комплексе с ингибиторами [11, 12]. Связанный в активном центре субстрат NAD⁺ взаимодействует с остатками Gly863 и Tyr907 (нумерация для PARP-1) схожим образом с ингибиторами – миметиками никотинамидного фрагмента. Остов Gly863 образует две водородные связи с амидной группой никотинамида, а боковая цепь Tyr907 – стэкинг с никотинамидным кольцом [13]. Несколько описанных классов ингибиторов PARP содержат карбоксамидную группу, присоединенную к ароматическому кольцу, или лактамную группу, встроенную в систему ароматических колец [14–19], что обеспечивает образование упомянутых взаимодействий с остатками Gly863 и Tyr907. Помимо соединений, конкурирующих с NAD⁺ за активный центр, лиганды малой бороздки, затрагивающие ДНК-зависимый путь регуляции PARP-1, также могут рассматриваться в качестве ингибиторов [20].

Вовлеченность PARP в системы репарации ДНК делает этот фермент привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии. Ингибиторы PARP-1 и PARP-2 могут усиливать эффект различных ДНК-повреждающих противоопухолевых средств, таких, как цисплатин или доксорубин. При умеренном повреждении ДНК PARP принимает участие в репарации, что позволяет опухолевым клеткам выжить. Комбинирование ДНК-повреждающего агента и ингибитора PARP-1 или PARP-2 может способствовать преодолению лекарственной устойчивости и апоптотической гибели клеток, представляя, таким образом, многообещающую стратегию терапии опухолей [15, 21–23]. Кроме того, ингибиторы могут найти применение и при дефектах репарации ДНК в определенных опухолевых клетках. Так, отсутствие гомологичной рекомбинации в клетках с дефицитом BRCA1/2 делает их высокочувствительными к ингибированию PARP [24–26]. Несколько ингибиторов PARP, обладающих противоопухолевой активностью, не прошли доклинические или клинические испытания по причине токсичности и недостаточной эффективности [27–29]. В частности, хорошо из-

вестный ингибитор PARP-1 3-аминобензамид плохо проникает в клетку и влияет на другие метаболические процессы. В декабре 2014 года в США было одобрено использование олапариба, первого в своем классе ингибитора PARP-1, при прогрессирующем раке яичников [30]. Это соединение является производным фталазина с лактамной группой и в наномолярной концентрации подавляет ферментативную активность PARP. Тем не менее разработка эффективных и нетоксичных соединений, воздействующих на PARP и способных подавлять развитие различных типов рака, по-прежнему представляет важную и сложную проблему.

Один из перспективных классов ингибиторов PARP – природные азотистые основания и их производные, содержащие лактамную группу [31, 32]. Однако идентифицированные соединения (например, тимин, гипоксантин) обладают относительно слабым ингибирующим эффектом. В данной работе представлены результаты компьютерного скрининга ингибиторов PARP среди производных азотистых оснований и *in vitro* исследования отобранных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка модели белка

Стартовая модель PARP-1 построена на основе кристаллической структуры комплекса PARP с ингибитором 1efy [33] с помощью пакета программ AmberTools 1.2 (<http://ambermd.org>). К структуре белка добавляли атомы водорода, после чего помещали ее в ячейку воды типа TIP3P (минимальная толщина слоя молекул воды – 12 Å). Для нейтрализации заряда системы добавляли ионы хлора. Для минимизации энергии полученной модели молекулу белка описывали силовым полем *ff99SB* [34], а ингибитор – автоматически рассчитанными параметрами *GAFF* [35]. Минимизацию энергии (2500 шагов по методу наискорейшего спуска, затем 2500 шагов по методу сопряженных градиентов) проводили с помощью пакета программ Amber 10 [36] для оптимизации позиции атомов водорода. В ходе минимизации тяжелые атомы белка и ингибитора фиксировали позиционными ограничениями $k(\Delta x)^2$, где силовая постоянная k была равна 2 ккал/(моль × Å²). Ингибитор, молекулы воды и ионы хлора удаляли из оптимизированной системы, чтобы получить модель для проведения молекулярного докинга.

Молекулярный докинг

Компьютерную библиотеку производных природных азотистых оснований подготовили с использованием программы ACD/ChemSketch [37].

Молекулярный докинг проводили с помощью программы Lead Finder 1.1.14 [38]. Рассчитывали карту потенциала взаимодействия в активном центре модели ПАРП-1 (потенциальную решетку) и осуществляли скрининг библиотеки при помощи генетического алгоритма поиска. Проводили 20 независимых запусков докинга для каждого соединения, после чего вероятность успешного докирования P_{dock} определяли как отношение числа запусков с успешным результатом (удовлетворяющим заданному структурному критерию) к общему числу запусков, т.е. $P_{\text{dock}} = N_{\text{усп}}/20$. Структурным критерием было наличие двух водородных связей между лактамной группой докированного соединения и остатком Gly863. Соединения с $P_{\text{dock}} \leq 0.8$ автоматически исключали с помощью Perl-скрипта.

Молекулярно-динамическая симуляция

Чтобы включить молекулу отобранного ингибитора в систему для симуляции, его параметры, за исключением частичных зарядов, брали из силового поля *ff99SB*. С целью определения зарядов рассчитывали молекулярный электростатический потенциал ингибитора на HF/6-31G* уровне теории с помощью программы PC GAMESS/Firefly [39]. Подбор частичных атомных зарядов осуществляли с помощью метода RESP [40]. Уравновешивание и последующую симуляцию молекулярной динамики (МД) ПАРП-1 в комплексе с ингибитором проводили с использованием AmberTools 1.2 и Amber 10. Модель комплекса, полученную молекулярным докингом, окружали 12 Å-слоем воды TIP3P и описывали силовым полем *ff99SB*. Для релаксации сольватированной системы проводили минимизацию энергии методами наискорейшего спуска и сопряженных градиентов. Затем систему разогревали от 0 до 300 К в течение 50 пс и уравновешивали при 300 К в течение 500 пс. Наконец, рассчитывали траекторию равновесной симуляции (10 нс) при постоянном давлении. Все симуляции осуществляли с использованием периодических граничных условий и метода PME (Particle Mesh Ewald) для учета дальнедействующих электростатических взаимодействий.

Программу VMD 1.8.6 [41] использовали для визуализации структур. Параллельные вычисления МД-траектории проводили на суперкомпьютере МГУ [42].

Синтез соединений

7-Метилгуанин, 7-метилксантин, 7-метилгипоксантин, 7-этилгуанин получали путем алкилирования соответствующих нуклеозидов с последующим расщеплением N-гликозидной связи согласно ранее описанным методикам [43, 44].

7-Метилгуанин. 400 МГц ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6): $\delta = 3.82$ (s, 3H, Me), 6.03 (brs, 2H, NH_2), 7.81 (s, 1H, H-8), 10.66 (brs, 1H, NH).

7-Метилксантин. 400 МГц ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6): $\delta = 3.81$ (s, 3H, Me), 7.85 (s, 1H, H-8), 10.79 (brs, 1H, NH), 11.48 (brs, 1H, NH).

7-Метилгипоксантин. 400 МГц ^1H -ЯМР ($\text{CDCl}_3 - \text{CD}_3\text{OD}$): $\delta = 3.94$ (s, 3H, Me), 7.80 (s, 1H, H-2), 7.84 (s, 1H, H-8).

7-Этилгуанин. 400 МГц ^1H -ЯМР (ДМСО- d_6): $\delta = 1.36$ (t, 3H, J = 7.2 Гц, CH_3), 4.19 (q, 2H, Me, J = 7.2 Гц, CH_2), 6.09 (brs, 2H, NH_2), 7.90 (s, 1H, H-8), 10.26 (brs, 1H, NH).

Измерение ферментативной активности

Рекомбинантные белки ПАРП-1 человека и ПАРП-2 мыши очищали по описанной ранее методике [45, 46]. Реакцию поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемую ПАРП-1 и ПАРП-2, проводили в оптимальных для каждого фермента условиях [47, 48]. Кратко, для ПАРП-1: 50 мМ трис-НСl pH 8.0, 20 мМ MgCl_2 , 150 мМ NaCl, 7 мМ β -меркаптоэтанол, активированная ДНК (2 о.е. $_{280}$ /мл, степень активации 25%), 300 мкМ NAD^+ (0.18 мкКи [^3H] NAD^+), 37°C. Реакцию запускали добавлением ПАРП-1 до конечной концентрации 0.2 мкМ и останавливали через 1 мин, нанося реакционную смесь на бумажные фильтры (Whatman-1), пропитанные 5% раствором трихлоруксусной кислоты. Для ПАРП-2: 50 мМ трис-НСl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 0.1 мг/мл БСА, 8 мМ MgCl_2 , 1 мМ ДТТ, активированная ДНК (2 о.е. $_{280}$ /мл, степень активации 25%), 400 мкМ NAD^+ (0.4 мкКи [^3H] NAD^+), 37°C. Реакцию запускали добавлением ПАРП-2 до конечной концентрации 0.2 мкМ и останавливали через 5 мин, нанося реакционную смесь на бумажные фильтры. Фильтры отмывали 4 раза в 5% трихлоруксусной кислоте, затем в 90% этаноле (для удаления кислоты) и сушили на воздухе. Количество радиоактивной метки, включенной в кислотонерастворимый продукт, регистрировали на сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 2800 (Perkin Elmer) в толуоловом сцинтилляторе. Определение количества радиоактивно меченного продукта проводили на начальном участке зависимости скорости реакции от времени.

ПАРП-ингибирующую активность синтезированных соединений оценивали в реакции поли(ADP-рибозил)ирования при концентрации NAD^+ 0.3 мМ в случае ПАРП-1 и 0.4 мМ в случае ПАРП-2. Различные количества тестируемых соединений добавляли в реакционную смесь перед добавлением фермента. Реакцию и детекцию продуктов проводили как описано выше. Для определения значения IC_{50} (концентрация соединения, при которой активность фермента снижена на 50%) изучали влияние различ-

ных концентраций ингибитора на ферментативную активность. Измерения проводили по меньшей мере в двух независимых экспериментах. Значения IC_{50} рассчитывали методом нелинейного регрессионного анализа с помощью Origin Pro 8.0.

Измерение цитотоксичности

Цитотоксическую активность 7-метилгуанина, цисплатина, доксорубина и их комбинаций оценивали путем анализа клеточного цикла и измерения популяции Sub-G1 методом проточной цитометрии, а также измерения активности каспазы-3 как маркера активации апоптоза. BRCA1-дефицитную линию клеток рака молочной железы человека HCC1937 культивировали в DMEM с добавлением 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина/стрептомицина (100 ед./мл) и пирувата (0.11 мг/мл) при 37°C в увлажненной атмосфере O_2 (20%). Во всех опытах клетки находились в состоянии логарифмического роста. Через 24 ч после рассеивания клетки обрабатывали 7-метилгуанином (150 мкМ) с последующим добавлением цисплатина (70 мкМ) или доксорубина (1 мкМ) через 3 ч.

Для анализа клеточного цикла клетки собирали через 72 ч, фиксировали в 70% этаноле (конечная концентрация) в течение 60 мин на льду, промывали в фосфатном буфере и окрашивали в 500 мкл раствора, содержащего йодид пропидия (50 мкг/мл) и RNКазу А (25 мкг/мл) в течение 15 мин. Данные получали с помощью проточного цитометра BD FACS CantoII (BD Biosciences) и анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva. Расщепление флуорогенного пептидного субстрата Ac-DNLDAAC оценивали после 48 ч инкубации с цитотоксическими агентами. Клетки собирали, промывали фосфатным буфером, центрифугировали и ресуспендировали в фосфатном буфере в концентрации 2×10^6 клеток/100 мкл. Затем 35 мкл суспензии добавляли в ячейки 96-луночного планшета и смешивали с пептидным субстратом, растворенным в стандартном реакционном буфере (100 мМ HEPES, 10% сахарозы, 5 мМ ДТТ, 0.001% NP-40 и 0.1% CHAPS, pH 7.2). Расщепление субстрата измеряли по высвобождению кумаринового флуорофора на мультиридере VarioScan Flash (Thermo Scientific) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 460 нм. Измерения проводили по меньшей мере в двух независимых экспериментах.

Моделирование фармакокинетики и токсичности

Фармакокинетический и токсикологический профили 7-метилгуанина рассчитывали с помощью программы ACD/Percepta [49], которая позволяет предсказать *in silico* ADME-свойства (всасывание,

распределение, метаболизм, выведение) и токсичность с использованием QSAR-моделей, основанных на анализе похожих соединений из библиотеки экспериментальных данных. В случае 7-метилгуанина среди библиотечных соединений были ацикловир, кофеин, теобромин, теofilлин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Компьютерный скрининг

Модель ПАРП-1, наиболее изученного представителя семейства ПАРП, построили на основе кристаллографической структуры каталитического фрагмента в комплексе с ингибитором (PDB ID 1efy, разрешение 2.2 Å). Положение боковых цепей аминокислотных остатков оптимизировали, учитывая их ионизацию. Компьютерная библиотека производных природных азотистых оснований включала около 100 различных производных пурина и пиримидина, содержащих лактамную группу, с учетом возможности их препаративного синтеза. С помощью молекулярного докинга проведен компьютерный скрининг производных, способных связываться в активном центре ПАРП-1. Для более полного исследования конформационного пространства осуществляли серию независимых запусков докинга каждого соединения библиотеки и использовали процедуру структурной фильтрации, которая позволяет отсеивать ложноположительные результаты докинга [47]. Как отмечено ранее, субстрат и известные ингибиторы ПАРП имеют общую структурную особенность: их амидная (или лактамная) группа образует две водородные связи с остатком Gly863. Данное взаимодействие, необходимое для эффективного связывания в активном центре ПАРП, было учтено в качестве критерия для структурной фильтрации. Наряду с этим при отборе потенциальных ингибиторов учитывали формирование благоприятных гидрофобных контактов и электростатических взаимодействий ингибитора в активном центре ПАРП-1. Компьютерный скрининг показал, что наиболее перспективным ингибитором ПАРП среди исследованных производных пурина и пиримидина является 7-метилгуанин ($P_{\text{dock}} = 0.95$, $\Delta G^{\text{calc}} = -6.8$ ккал/моль).

Определение геометрических характеристик 7-метилгуанина в активном центре ПАРП-1 и проверку устойчивости фермент-ингибиторного комплекса проводили при помощи МД. Образование двух водородных связей между лактамной группой 7-метилгуанина и остатком Gly863, а также π -стэкинг пуриновых колец с боковой цепью Tyr907 и гидрофобное взаимодействие метильной группы в положении 7 с боковой цепью Ala898 наблюдали по всей МД-траектории (рис. 1). Обнаружено также

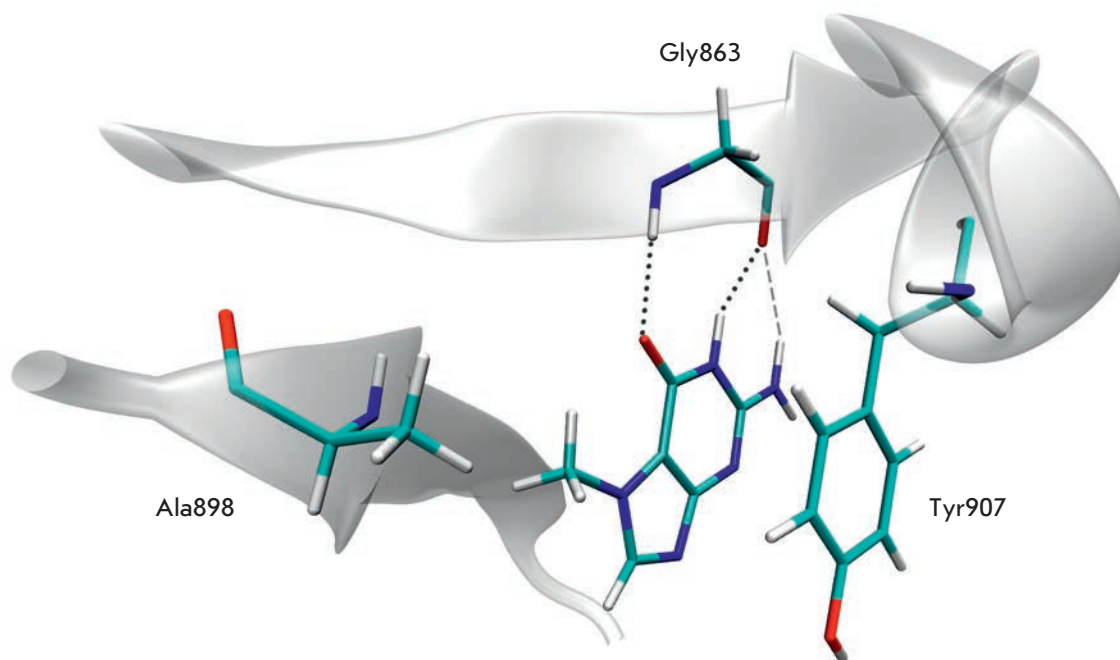


Рис. 1. Позиция молекулы 7-метилгуанина в активном центре ПАРП-1 и характерные взаимодействия, выявленные с помощью молекулярного моделирования: две водородные связи лактамной группы с Gly863 (показаны пунктирными линиями), электростатическое взаимодействие аминогруппы (показано штриховой линией), л-стэкинг пуриновых колец с Tyr907, гидрофобный контакт метильной группы с Ala898

электростатическое взаимодействие между аминогруппой 7-метилгуанина в положении 2 и кислородом остова Gly263, не являющееся обычной водородной связью. Среднее расстояние $\text{NH}_2:\text{H}\cdots\text{Gly863}:\text{O}$ было равно 2.42 Å, средний угол $\text{NH}_2:\text{N}\cdots\text{NH}_2:\text{H}\cdots\text{Gly863}:\text{O}$ – 137°, в то время как характерная длина водородной связи составляет 1.8–2.1 Å, а угол – не менее 150°. Характеристики положения 7-метилгуанина в активном центре ПАРП-1 представлены в табл. 1.

Интересно, что ранее была показана умеренная ингибирующая активность в отношении ПАРП-1 структурного аналога 7-метилксантина [32], который отличается от 7-метилгуанина оксогруппой в положении 2 (рис. 2). При проведении нами компьютерного скрининга 7-метилксантин был исключен на стадии структурной фильтрации ($P_{\text{dock}} = 0.45$), что указывало на его менее эффективное связывание. При моделировании взаимодействия фермента с 7-метилгипоксантином, структурным аналогом без заместителя в положении 2, предсказанные параметры связывания ($P_{\text{dock}} = 0.85$, $\Delta G^{\text{calc}} = -6.4$ ккал/моль) также были менее благоприятными. Анализ структуры комплексов ПАРП-1 с 7-метилгуанином и его структурными аналогами показал, что наличие аминогруппы в положении 2 существенно увеличивает эффективность связывания ингибитора в активном центре за счет электростатического вза-

Таблица 1. Дистанционные и угловые характеристики позиции 7-метилгуанина (7-MG) в активном центре ПАРП-1, определенные с помощью МД-симуляции. Средние значения приведены вместе со стандартным отклонением

Расстояние, Å	
7-MG:CO:O ... Gly863:H	2.0 ± 0.2
7-MG:NH:H ... Gly863:O	1.9 ± 0.1
7-MG:NH ₂ :H ... Gly863:O	2.4 ± 0.4
7-MG:CH ₃ :C ... Ala898:CB	4.0 ± 0.3
C(7-MG конд. кольца) ... C(Tyr907 бенз. кольцо)*	3.6 ± 0.2
Угол, град	
7-MG:CO:O ... Gly863:H ... Gly863:N	160 ± 11
7-MG:NH:N ... 7-MG:NH:H ... Gly863:O	159 ± 9
7-MG:NH ₂ :N ... 7-MG:NH:H ... Gly863:O	137 ± 10

*Расстояние между геометрическим центром конденсированных колец 7-метилгуанина и центром бензольного кольца Tyr907.

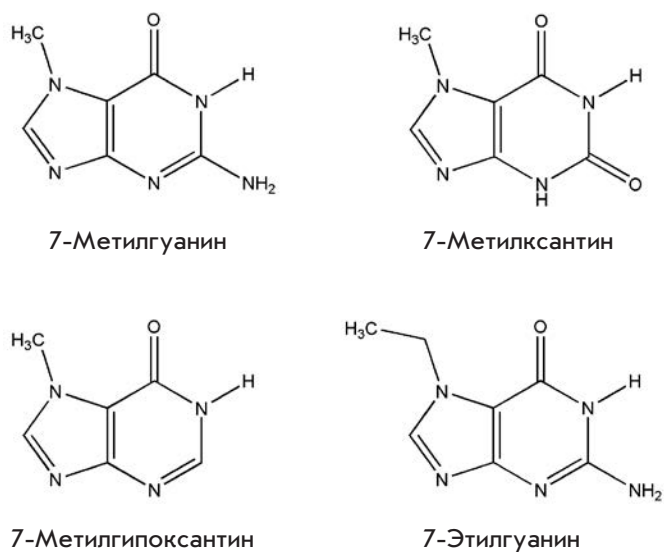


Рис. 2. Химические структуры синтезированных и протестированных соединений

Таблица 2. Ингибирующий эффект 7-метилгуанина и родственных соединений в отношении ПАРП-1 и ПАРП-2

Соединение	IC ₅₀ , мкМ	
	ПАРП-1	ПАРП-2
7-Метилгуанин	150	50
7-Метилксантин	800	160
7-Метилгипоксантин	780	620
7-Этилгуанин	230	90

имодействия с G1y863. Другим заместителем, обеспечивающим комплементарность к активному центру ПАРП-1, является метильная группа в положении 7, что подтверждает отсутствие ингибирующих свойств у немодифицированных ксантинов [32]. Следует отметить, что ингибирующий эффект не увеличивается при дальнейшем наращивании алкильной цепи в этом положении, о чем свидетельствуют расчетные параметры связывания 7-этилгуанина ($P_{dock} = 0.7$, $\Delta G^{calc} = -6.7$ ккал/моль).

Ингибирующие свойства пуриновых производных

Мы синтезировали 7-метилгуанин, 7-метилксантин, 7-метилгипоксантин и 7-этилгуанин, чтобы протестировать их способность подавлять ПАРП и оценить влияние заместителей на активность ингибитора. Ингибирующие свойства 7-метилгуанина и родственных соединений изучали с использованием двух очи-

щенных белков семейства ПАРП – ПАРП-1 человека и ПАРП-2 мыши. Представленные в табл. 2 экспериментальные данные показывают, что 7-метилгуанин действительно является наиболее эффективным ингибитором ПАРП-1 и ПАРП-2 со значениями IC₅₀ 150 и 50 мкМ. Замена 2-оксогруппы 7-метилксантина на аминогруппу приводит к пяти- и трехкратному увеличению способности ингибировать ПАРП-1 и ПАРП-2 соответственно. 7-Метилгуанин оказался эффективнее 7-этилгуанина, что свидетельствует об ограниченности участка связывания алкильного заместителя. Важно отметить, что все тестируемые пуриновые производные оказались более эффективными ингибиторами ПАРП-2, несмотря на очень похожую организацию участков связывания в ПАРП-1 и ПАРП-2. Можно предположить, что наблюдаемая селективность обусловлена различными траекториями доставки ингибитора в активный центр белков ПАРП.

Анализ цитотоксичности

Цитотоксичность традиционных противоопухолевых средств – цисплатина и доксорубина, а также 7-метилгуанина, анализировали на линии клеток рака молочной железы человека HCC1937, которая считается чувствительной к ингибированию ПАРП из-за дефекта гена репарации ДНК BRCA1 [22, 50, 51]. Индуцированную препаратами гибель клеток оценивали по популяции Sub-G1 (соответствует популяции апоптотических клеток с фрагментированной ДНК) на проточном цитометре (рис. 3). Обработка клеток 7-метилгуанином сама по себе не привела к увеличению числа клеток в фазе Sub-G1, которое составило около 2% (сопоставимо с контролем). Однако сравнение уровня клеточной гибели показало, что 7-метилгуанин сенсibiliзирует HCC1937 к действию цисплатина и доксорубина. При обработке клеток комбинацией 7-метилгуанина (150 мкМ) и цисплатина (70 мкМ) популяция клеток в фазе Sub-G1 увеличилась с 34 до 43%, а добавление 7-метилгуанина (150 мкМ) к доксорубину (1 мкМ) увеличило популяцию Sub-G1 с 32 до 42%. Таким образом, изменение уровня клеточной гибели при добавлении 7-метилгуанина происходит схожим образом в случае цисплатина и доксорубина.

Мы проанализировали также активацию каспазы-3 в клетках HCC1937, важного и обязательного события в программе апоптоза. Активная каспаза-3 расщепляет различные молекулы в клетке, что приводит к появлению апоптотической морфологии. Степень активации, измеренная по расщеплению специфического флуорогенного субстрата, коррелировала с уровнем клеточной гибели. Из рис. 4 видно, что активность каспазы-3 увеличивалась

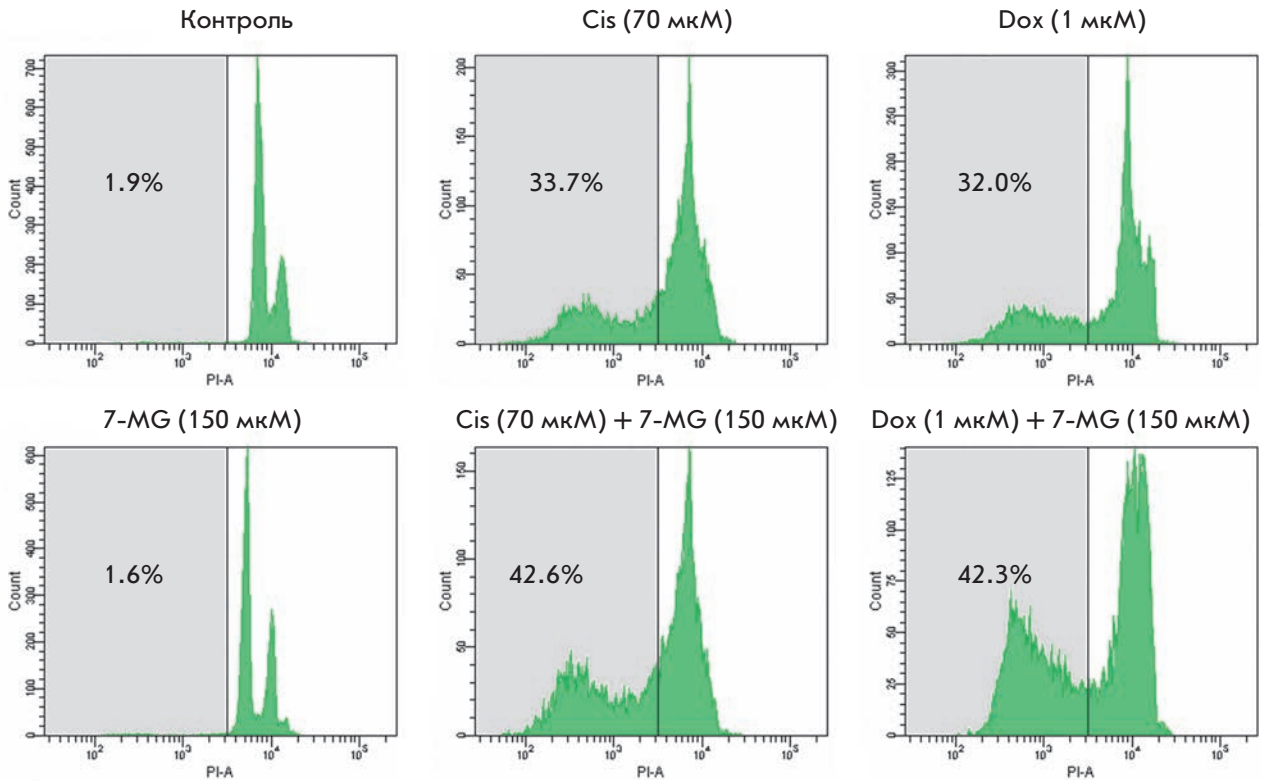


Рис. 3. Оценка популяции Sub-G1 клеток HCC1937, подвергнутых воздействию цисплатина (Cis), доксорубина (Dox) и 7-метилгуанина (7-MG) в виде монопрепарата и при их комбинации в течение 72 ч. Область популяции Sub-G1 показана серым цветом

при добавлении 7-метилгуанина к цисплатину и доксорубину на 27–39%, однако сам 7-метилгуанин не стимулировал каспазную активность. Эти данные согласуются с уровнем клеточной гибели, определенным методом проточной цитометрии.

Профиль фармакокинетики и токсичности

В заключение мы оценили фармакокинетические свойства и токсикологический профиль 7-метилгуанина при помощи QSAR-моделирования на основе опубликованных данных его структурных аналогов (ацикловир, кофеин, теобромин, теофиллин). Так, абсорбция в кишечнике человека оценивается как очень высокая, а биодоступность при пероральном введении – близка к оптимальной (83%). Расчетная доля 7-метилгуанина, связанного с белками плазмы, составляет 17%, что не должно существенно влиять на его эффективность. Маловероятно связывание 7-метилгуанина с рецептором эстрогена альфа (нет риска репродуктивной токсичности), калиевым каналом hERG (нет риска кардиотоксичности), обратным транспортером Р-гликопротеином и ферментами семейства цитохрома P450 (CYP3A4,

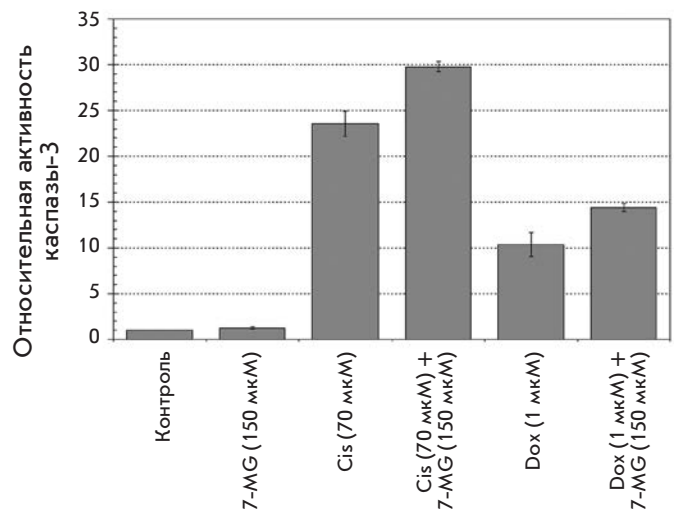


Рис. 4. Увеличение активности каспазы-3 (относительно контроля) в клетках HCC1937, подвергнутых действию цисплатина (Cis), доксорубина (Dox) и 7-метилгуанина (7-MG) в виде монопрепарата и при их комбинации в течение 48 ч

СУР2D6, СУР2С9, СУР2С19, СУР1А2). Таким образом, предсказанные свойства свидетельствуют об эффективности и безопасности 7-метилгуанина для человека.

ВЫВОДЫ

Несмотря на способность повреждающих ДНК лекарственных средств убивать опухолевые клетки, токсичность этих средств и устойчивость клеток к химиотерапии остаются серьезной проблемой. Системы репарации ДНК, включающие ПАРП-1 и ПАРП-2, важны для нормального развития организма, однако в случае использования ДНК-повреждающих средств эти белки могут уменьшать терапевтический эффект. Метаболит нуклеиновых кислот 7-метилгуанин выявлен *in silico* в качестве нового ингибитора каталитической активности ПАРП и исследован экспериментально. Показано, что важное условие эффективного связывания пуриновых производных – наличие аминогруппы в положении 2 и метильной группы в положении 7. В ПАРП-ингибирующей концентрации 7-метилгуанин не токсичен, однако способен увеличивать

чувствительность ВРСА1-дефицитных клеток рака молочной железы к распространенным химиотерапевтическим средствам (цисплатину и доксорубину). 7-Метилгуанин является метаболитом нуклеиновых кислот, содержится в плазме крови человека и выводится с мочой [52]. Хотя 7-метилгуанин уступает по ингибирующей активности олапарибу и некоторым другим известным ингибиторам ПАРП, можно ожидать, что это природное соединение будет иметь более выгодный фармакокинетический и токсикологический профили по сравнению с синтетическими ингибиторами и будет рассматриваться в качестве нового перспективного компонента противоопухолевой терапии. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки России (соглашение № 14.604.21.0018, ID RFMEFI60414X0018). Химический синтез пуринов выполнен при поддержке РФФИ (грант № 14-04-00835_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cline S.D., Hanawalt P.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. V. 4. P. 361–373.
- Drenichev M.S., Mikhailov S.N. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2015. V. 34. P. 258–276.
- Lautier D., Lagueux J., Thibodeau J., Ménard L., Poirier G.G. // *Mol. Cell. Biochem.* 1993. V. 122. P. 171–193.
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J.-C., de Murcia G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. P. 517–528.
- Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006. V. 70. P. 789–829.
- Hassler M., Ladurner A.G. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2012. V. 22. P. 721–729.
- Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 3563–3571.
- Ryu K.W., Kim D.-S., Kraus W.L. // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. P. 2453–2481.
- Cazzalini O., Donà F., Savio M., Tillhon M., Maccario C., Perucca P., Stivala L.A., Scovassi A.I., Prosperi E. // *DNA Repair (Amst.)* 2010. V. 9. P. 627–635.
- Ménissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMeur M., et al. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 2255–2263.
- Ruf A., Menissier de Murcia J., de Murcia G., Schulz G.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 7481–7485.
- Karlberg T., Hammarström M., Schütz P., Svensson L., Schüler H. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. P. 1056–1058.
- Ruf A., de Murcia G., Schulz G.E. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 3893–3900.
- Banasik M., Komura H., Shimoyama M., Ueda K. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 1569–1575.
- Jagtap P., Szabó C. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005. V. 4. P. 421–440.
- Ferraris D.V. // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53. P. 4561–4584.
- Ekblad T., Camaioni E., Schüler H., Macchiarulo A. // *FEBS J.* 2013. V. 280. P. 3563–3575.
- Efremova A.S., Zakharenko A.L., Shram S.I., Kulikova I.V., Drenichev M.S., Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Myasoedov N.F., Lavrik O.I., Mikhailov S.N. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2013. V. 32. P. 510–528.
- Ekblad T., Lindgren A.E.G., Andersson C.D., Caraballo R., Thorsell A.-G., Karlberg T., Spjut S., Linusson A., Schüler H., Elofsson M. // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. V. 95. P. 546–551.
- Kirsanov K.I., Kotova E., Makhov P., Golovine K., Lesovaya E.A., Kolenko V.M., Yakubovskaya M.G., Tulin A.V. // *Oncotarget.* 2014. V. 5. P. 428–437.
- Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Soto M., Pérez J.M. // *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 2006. V. 1. P. 39–53.
- Martin S.A., Lord C.J., Ashworth A. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2008. V. 18. P. 80–86.
- Brock W.A., Milas L., Bergh S., Lo R., Szabó C., Mason K.A. // *Cancer Lett.* 2004. V. 205. P. 155–160.
- Curtin N.J., Szabo C. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. P. 1217–1256.
- Farmer H., McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N.J., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., et al. // *Nature.* 2005. V. 434. P. 917–921.
- Boerner J.L., Nechiporchik N., Mueller K.L., Polin L., Heilbrun L., Boerner S.A., Zoratti G.L., Stark K., LoRusso P.M., Burger A. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0119614.
- Milam K.M., Cleaver J.E. // *Science.* 1984. V. 223. P. 589–591.
- Mateo J., Ong M., Tan D.S.P., Gonzalez M.A., de Bono J.S. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2013. V. 10. P. 688–696.
- Madison D.L., Stauffer D., Lundblad J.R. // *DNA Repair (Amst.)* 2011. V. 10. P. 1003–1013.
- Frampton J.E. // *BioDrugs.* 2015. V. 29. P. 143–150.

31. Virág L., Szabó C. // *FASEB J.* 2001. V. 15. P. 99–107.
32. Geraets L., Moonen H.J.J., Wouters E.F.M., Bast A., Hageman G.J. // *Biochem. Pharmacol.* 2006. V. 72. P. 902–910.
33. White A.W., Almasy R., Calvert A.H., Curtin N.J., Griffin R.J., Hostomsky Z., Maegley K., Newell D.R., Srinivasan S., Golding B.T. // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. P. 4084–4097.
34. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. // *Proteins.* 2006. V. 65. P. 712–725.
35. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. P. 1157–1174.
36. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., III, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Crowley M., Walker R.C., Zhang W., et al. // *AMBER 10.* University of California, San Francisco. 2008.
37. ACD/ChemSketch Freeware, version 8.17. Advanced Chemistry Development, Inc., <http://www.acdlabs.com>. 2005.
38. Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Chem. Inf. Model.* 2008. V. 48. P. 2371–2385.
39. Granovsky A.A. Firefly, version 7.1.F, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>. 2009.
40. Bayly C.L., Cieplak P., Cornell W.D., Kollman P.A. // *J. Phys. Chem.* 1993. V. 97. P. 10269–10280.
41. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. P. 33–38.
42. Воеводин Вад.В., Жуматий С.А., Соболев С.И., Антонов А.С., Брызгалов П.А., Никитенко Д.А., Стефанов К.С., Воеводин В.В. // *Открытые системы.* 2012. Т. 7. С. 36–39.
43. Jones J.W., Robins R.K. // *J. Am. Chem. Soc.* 1963. V. 85. P. 193–201.
44. Vidal A., Giraud I., Madelmont J.-C. // *Synth. Commun.* 2004. V. 34. P. 3359–3365.
45. Суханова М.В., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // *Биохимия.* 2004. Т. 69. С. 686–698.
46. Amé J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 17860–17868.
47. Захаренко А.Л., Суханова М.В., Ходырева С.Н., Новиков Ф.Н., Стройлов В.С., Нилов Д.К., Чилов Г.Г., Швядас В.К., Лаврик О.И. // *Молекуляр. биология.* 2011. Т. 45. С. 565–569.
48. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Amé J.-C., Ilna E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. // *Biochimie.* 2013. V. 95. P. 1208–1215.
49. ACD/Percepta. Advanced Chemistry Development, Inc., <http://www.acdlabs.com>. 2012.
50. Benafif S., Hall M. // *Onco Targets Ther.* 2015. V. 8. P. 519–528.
51. Helleday T. // *Mol. Oncol.* 2011. V. 5. P. 387–393.
52. Topp H., Sander G., Heller-Schöch G., Schöch G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 161. P. 49–56.

УДК 602.64:578.2

Гибридный белок на основе второй субъединицы гемагглютинаина вирусов гриппа А/Н2N2 формирует перекрестный иммунитет

Л. А. Степанова*, М. В. Сергеева, М. А. Шуклина, А. А. Шалджян, М. В. Потапчук, А. В. Коротков, Л. М. Цыбалова

Научно-исследовательский институт гриппа МЗ РФ, 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17

*E-mail: stepanova160@mail.ru

Поступила в редакцию 21.09.2015

Принята к печати 08.02.2016

РЕФЕРАТ Консервативные участки второй субъединицы гемагглютинаина (НА2) представляют интерес для дизайна вакцинных конструкций, способных обеспечить протективный иммунитет против вирусов гриппа А различных подтипов. На основе флагеллина и высококонсервативного фрагмента НА2 (35–107) вирусов гриппа подтипа А/Н2N2, содержащего В-клеточные, CD4+ Т-клеточные, а также CD8+ Т-клеточные эпитопы, сконструирован гибридный рекомбинантный белок FlgМН. Нативная конформация фрагмента НА2 частично сохранялась при присоединении к С-концу флагеллина в составе гибридного рекомбинантного белка FlgМН. Показано, что FlgМН стимулирует формирование смешанного Th1/Th2-ответа на целевую последовательность, перекрестно реагирующих антител, связывающихся с вирусами гриппа первой филогенетической группы (Н1, Н2, Н5), и индукцию специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+ИФН-γ+). Иммунизация рекомбинантным белком защищала животных от летальной гриппозной инфекции. Сконструированный белок FlgМН перспективен для включения в противогриппозную вакцину широкого спектра действия, способную стимулировать Т- и В-клеточный иммунный ответ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вакцина, грипп, НА2, рекомбинантный белок, флагеллин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ НА2 – вторая субъединица гемагглютинаина; Flg – флагеллин; FlgМН – гибридный белок, включающий флагеллин и консервативный участок НА2 вирусов гриппа А/Н2N2; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; ИФА – иммуноферментный анализ; ОП – оптическая плотность; СГТ – среднегеометрический титр; TLR5 – Toll-подобный рецептор 5; МНС – главный комплекс гистосовместимости.

ВВЕДЕНИЕ

Вируснейтрализующие антитела предотвращают инфекцию, блокируя прикрепление вируса гриппа к клеточной поверхности. Действие этих антител направлено, главным образом, на эпитопы первой иммунодоминантной высоковариабельной субъединицы гемагглютинаина (НА1). Узкая специфичность нейтрализующих антител делает существующие вакцины неэффективными против дрейфовых вариантов вируса гриппа и против вновь появляющихся вирусов с пандемическим потенциалом. Т-клеточный иммунитет вносит существенный вклад в очищение организма от вируса и обеспечивает легкое течение инфекции, поэтому для достижения более полного контроля над гриппозной инфекцией желательно иметь вакцины, индуцирующие не только гуморальный, но и Т-клеточный ответ. Разработка вакцин,

основанных на консервативных антигенах, которые усиливают как гуморальный, так и клеточный ответ, является универсальной стратегией контроля эпидемий и пандемий.

Гемагглютинин вируса гриппа – белок, синтезируемый в виде предшественника (НА0), который тримеризуется в эндоплазматическом ретикулуме и транспортируется на клеточную поверхность через аппарат Гольджи. Гемагглютинин (НА0) посттрансляционно разрезается хозяйскими протеазами на две субъединицы – НА1 и НА2, которые остаются связанными одним дисульфидным мостиком [1]. В отличие от НА1, вторая субъединица гемагглютинаина (НА2) относительно консервативна среди штаммов вируса и отвечает за слияние вирусной и клеточной мембраны в эндосомах, обеспечивая таким образом попадание рибонуклеинового комплекса в цитоплазму [2].

Иммунизация традиционными вакцинами и естественная гриппозная инфекция не приводят к образованию значительного количества анти-НА2-антител, что связано с низкой иммуногенностью стеблевого участка НА2 в присутствии иммунодоминантных рецепторсвязывающих регионов НА1 [3]. Однако в последнее время выделен ряд моноклональных антител (от мышей, человека), которые реагируют с эпитопами, локализованными в стеблевой части НА. Это перекрестно реагирующие антитела, которые нейтрализуют подтипы вируса гриппа в пределах филогенетической группы, обеспечивая, таким образом, широкий спектр защиты [4–11].

Моноклональные антитела, специфичные к регионам НА2 1–38 (CF2), 125–175 (FE1), способны ингибировать *in vitro* слияние вирусной и клеточной мембран. Внутривенное введение моноклональных антител CF2 и FE1 за 2 ч до заражения мышей Balb/c гомологичным и гетерологичным вирусами гриппа А/Н3N2 в дозе 1LD₅₀ обеспечивало 100% выживаемость опытных животных [6]. Моноклональное антитело CR6261, специфичное к гидрофобному карману стеблевой части НА2, ингибировало рН-индуцируемое конформационное изменение НА вирусов гриппа Н1N1, Н5N1 и обладало нейтрализующей активностью [4, 5]. Показано, что моноклональное антитело CR6261 взаимодействовало преимущественно с α-спиралью НА2, а также с соседними аминокислотными остатками НА2 и НА1. Большинство аминокислот в малой α-спирали НА2, которые взаимодействуют с CR6261, у подтипов вирусов гриппа первой филогенетической группы идентичны более чем на 99% (различия в 1–5 аминокислотных остатках). Моноклональное антитело CR6261 предотвращало конформационный переход НА при низких значениях рН, т.е. нейтрализовало вирус, стабилизируя нативное состояние НА и предотвращая рН-зависимое слияние вирусной и клеточной мембран. Выделено анти-Н3N2-моноклональное антитело 12D1, которое взаимодействовало с высококонсервативной большой α-спиралью НА2 (остатки 76–106), обладало нейтрализующей способностью и связывалось с вирусами гриппа подтипа Н3N2, циркулировавшими с 1968 по 2003 г. [8].

В последние годы разработан ряд кандидатных вакцин на основе НА2 вирусов гриппа А филогенетической группы II [12–14]. Показана их иммуногенность и эффективность в защите от заражения летальными дозами гомологичного и гетерологичного вирусов одной филогенетической группы. Предполагается, что конструирование антигена, формирующего иммунный ответ на консервативные эпитопы НА2, может служить основой для вакцины широкого спектра действия, обладаю-

щей профилактической и терапевтической эффективностью.

Целью данной работы было моделирование и создание гибридного рекомбинантного белка, содержащего перспективные Т- и В-клеточные эпитопы НА2 вирусов гриппа А/Н2N2, изучение его иммуногенности и протективного действия. В качестве основы гибридного белка выбран флагеллин – мукозальный адъювант, который усиливает иммунный ответ на присоединенные к нему антигены.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор консервативного участка НА2 вирусов гриппа А/Н2N2

Поиск аминокислотных последовательностей для анализа проводили в базе данных GenBank, построение выравниваний осуществляли с использованием программного обеспечения Vector NTI v10.0 (Invitrogen, США). Поиск вероятных Т-клеточных эпитопов осуществляли с использованием NetCTLpan1.1 Server [15] и параметров поиска, установленных по умолчанию. Поиск экспериментальных В- и CD4+ Т-клеточных эпитопов, гомологичных участкам НА2, проводили в базе данных Immune Epitope Database [16]. Визуализацию трехмерной структуры белков выполняли в программе Chimera 1.5.3 [17]. Для гомологичного моделирования трехмерной структуры белка по первичной последовательности использовали открытый веб-ресурс Phyre2 [18].

Конструирование экспрессионных векторов и создание штаммов-продуцентов *Escherichia coli*

Нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридный рекомбинантный белок FlgМН, оптимизировали для экспрессии в *E. coli*, синтезировали и встраивали в вектор pQE30 по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Для создания белков Flg (флагеллин) и МН (фрагмент гемагглютинаина) соответствующие нуклеотидные последовательности амплифицировали с использованием праймеров, несущих концевые сайты рестрикции BamHI и HindIII, и затем встраивали в поликлональный сайт вектора pQE30. Для получения штаммов-продуцентов рекомбинантных белков плазмидами pQE30/FlgМН, pQE30/МН, pQE30/Flg трансформировали клетки *E. coli* DLT1270. Штамм DLT1270, производное штамма DH10B [19], содержит ген репрессора лактозного оперона *lacI*, интегрированный в хромосому.

Выделение и очистка рекомбинантных белков

Штаммы *E. coli* DLT1270, трансформированные векторами pQE30/FlgМН, pQE30/Flg и pQE30/МН, на-

капливали в среде LB с ампициллином, экспрессию индуцировали добавлением 1 мМ IPTG. Клетки обрабатывали лизоцимом, рекомбинантные белки очищали из клеточного лизата с помощью металлоаффинной хроматографии на Ni-сорбенте.

Электрофорез и иммуноблотинг

Электрофорез в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) проводили в денатурирующих условиях по методу Лэммли [20]. Пробы смешивали с буфером для внесения, содержащим β -меркаптоэтанол, кипятили в течение 7 мин и наносили в градиентный 8–16% ПААГ. Электрофорез проводили в течение 1.5 ч при 10–12 мА. Гель фиксировали 10% уксусной кислотой и окрашивали Кумасси G-250 в течение 18 ч.

Горизонтальный перенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) осуществляли в ТВ-буфере (0.03 М глицин, 0.04 М трис, 0.037% додецилсульфат Na, 20% этанол) с использованием системы Mini Trans-Blot cell (BioRad, США) в охлаждаемой камере при +4°C в течение 1.5 ч при постоянном токе 200 мА. Затем мембрану блокировали в 3% растворе БСА (бычий сывороточный альбумин, Amresco, ЕС) в фосфатно-солевом буфере (ФБР) в течение ночи при комнатной температуре. Мембрану инкубировали 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами, разведенными в ФБР с 0.1% Твин 20 (ФБРТ) и 3% БСА, затем отмывали в ФБРТ. Флагеллин окрашивали кроличьими поликлональными антителами (Abscam, Великобритания) в разведении 1 : 16000. Для окрашивания фрагмента гемоглобина использовали кросс-специфичную сыворотку, полученную трехкратной последовательной иммунизацией мышей сублетальными дозами вирусов гриппа А филогенетической группы I (H2, H5 и H1pdm), в разведении 1 : 2000. Белки выявляли окрашиванием мембраны в течение 1 ч при комнатной температуре вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена (козьи антикроличьи IgG либо козьи антимышинные IgG, Invitrogen, США), в разведении 1 : 2000 и последующей инкубацией в течение 15 мин с субстратом ТМВ (тетраметилбензидин) Immunoblot solution (Invitrogen, США).

Иммунизация мышей

Иммуногенность рекомбинантного белка FlgMN исследовали на линейных мышцах Balb/c и C57Bl/6 (самки, возраст 6–8 недель, масса 18–20 г), полученных из питомника «Столбовая» ГУ научный центр биомедицинских технологий РАМН. Животных содержали в виварии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в соответствии с действующими правилами. Мышей (16 особей) иммунизировали рекомбинантным белком FlgMN интраназально (после ингаляци-

онной анестезии 2–3% изофлюран, 30% O₂, 70% N₂O) трехкратно с двухнедельным интервалом в дозе 10 мкг/мышь в объеме 50 мкл. Контрольной группе мышей (16 особей) вводили рекомбинантный белок Flg интраназально трехкратно с двухнедельным интервалом в дозе 10 мкг/мышь.

Получение сывороток и БАЛ

Образцы крови получали от пяти мышей опытной и контрольной групп через 2 недели после последней иммунизации, после эвтаназии в CO₂-камере (Vet Tech Solutions, Великобритания). Для получения сыворотки кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C. После образования сгустков крови образцы помещали на поверхность льда и охлаждали в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 400g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 мкл) замораживали при температуре –20°C.

Бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) получали от пяти мышей каждой группы через 2 недели после последней иммунизации после эвтаназии животных в CO₂-камере. Труп животного фиксировали на операционном столике брюшком кверху. Производили разрез кожи по средней линии от нижней челюсти. В нижнюю часть трахеи в направлении легких вводили катетер на глубину 3–5 мм. Дважды промывали бронхи и легкие 1 мл ФБР. БАЛ центрифугировали в течение 15 мин при 400g, отбирали аликвоты надосадка и замораживали их при температуре –20°C.

Получение спленоцитов мыши

Спленоциты мыши получали в соответствии с протоколом BD Pharmingen™. На 14-й день после последней иммунизации мышей опытной и контрольной групп (по три мыши из каждой группы) подвергали эвтаназии с помощью CO₂-камеры. Селезенки мышей извлекали асептически, гомогенизировали с использованием Medimachine (BD Biosciences, США) и избавлялись от дебриса путем фильтрации через шприцевые фильтры с диаметром пор 70 мкм (Syringe filcons, BD Biosciences, США). Эритроциты лизировали АСК-буфером (0.15 М NH₄Cl, 1.0 М KHCO₃, 0.1 мМ Na₂EDTA, pH 7.2–7.4), спленоциты отмывали полной средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием 0.4% раствором трипанового синего. Концентрацию клеток доводили до 2 × 10⁶ кл./мл.

Синтетические пептиды

Иммуногенность рекомбинантных белков оценивали с использованием следующих синтетических пептидов, синтезированных НПО «Верта»:

G-47 (24 аминокислоты): AADKESTQKAF-DGITNKVNSVIEK – малая α -спираль HA2 (35–58);
 G-48 (15 аминокислот): MNTQFEAVGKEFSNL – «расплетенный» в нативном неактивированном геммагглютинине «линкерный» участок HA2 (59–72);
 G-49 (34 аминокислоты): ERRLLENLNKKMEDGFL-DVWTYNAELLVLMENERT – часть большой α -спирали HA2 (73–107).

Иммуноферментный анализ

ИФА проводили общепринятым методом. 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) покрывали рекомбинантным белком FlgMН в концентрации 5 мкг/мл или очищенными вирусами A/Singapore/1/57 (H2N2), A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Kurgan/05/2005/RG (H5N1) в концентрации 2 мкг/мл, сорбцию проводили в ФБР pH 7.2 в течение ночи при 4°C. После сорбции вирусов часть планшетов заливали на 30 мин цитратным буфером (pH 5.0), затем 1 раз отмывали ФБР. Планшеты обрабатывали блокирующим буфером (0.01 М ФБР, pH 7.2 с 5% ЭТС) в течение 1 ч при комнатной температуре, отмывали 3 раза ФБРТ. В лунки планшетов добавляли 100 мкл двукратных разведений сывороток (начиная с 1 : 400) в блокирующем буфере, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Использовали конъюгаты козьих поликлональных антимишинных IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA (Abcam, Великобритания) с пероксидазой хрена в разведении 1 : 20000. В качестве субстрата использовали ТМБ (BD Bioscience, США), инкубация 15 мин. Оптическую плотность (ОП) измеряли с использованием микропланшетного ридера i-Mark (Bio-Rad) при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность, по крайней мере, в 2 раза большую, чем среднее значение бланка.

Проточная цитометрия

Мультипараметрическую проточную цитометрию выполняли в соответствии с протоколом BD Pharmingen™. Определяли способность синтетических пептидов G-47, G-48, G-49 и вируса гриппа A/Singapore/1/57 (H2N2) активировать продукцию ИФН- γ специфическими CD8⁺ Т-лимфоцитами в селезенке. Спленоциты мышей Balb/c и C57Bl/6 получали на 14-й день после последней иммунизации, 2×10^6 спленоцитов мышей опытных и контрольных групп стимулировали (в течение 6 ч при 37°C) 10 мкг пептидов G-47, G-48, G-49 или 1 мкг вируса A/Singapore/1/57 (H2N2) в присутствии брэфелдина А (1 мкг/мл) (BD Bioscience, США). Клетки отмывали, Fc-рецепторы блокировали антителами

CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, BD Pharmingen, США) и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами анти-CD3a-FITC, анти-CD8-PerCP (BD Pharmingen, США) при 4°C в течение 30 мин. Затем клетки пермеабелизировали в соответствии с протоколом тест-системы Cytofix/Cytoperm Plus (BD Bioscience, США) и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами анти-ИФН γ -PE (BD Pharmingen, США). Интенсивность флуоресценции измеряли на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения BD FACS Diva версия 6.1.3 (BD Bioscience, США).

Вирусы и заражение мышей

В работе использованы штаммы, полученные из Коллекции вирусов гриппа и ОРЗ лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России – A/Singapore/1/57 (H2N2), A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/Kurgan/05/2005/RG (H5N1). В экспериментах с летальным заражением использовали адаптированный к репродукции в легких мышей вариант вируса гриппа A/Singapore/1/57 (H2N2), полученный в лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Вирусы накапливали в 10–12-дневных развивающихся куриных эмбрионах и очищали методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы.

Иммунизированных мышей (по 11 мышей в опытной и контрольной группах) заражали адаптированным к мышам вирусом гриппа A/Singapore/1/57 (H2N2) в дозе 2LD₅₀. Вирус вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии (2–3% изофлюран, 30% O₂, 70% N₂O). После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными. Протективное действие FlgMН оценивали по двум параметрам: динамика падения массы тела и выживаемость мышей после заражения.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism v5.1. Статистическую значимость различий титров антител оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Сравнение показателей выживаемости проводили с использованием критерия Мантела–Кокса. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор и построение МН-фрагмента консенсусной последовательности HA2 вирусов гриппа A/H2N2

По результатам выравнивания консенсусных последовательностей HA2 найдены два протяженных

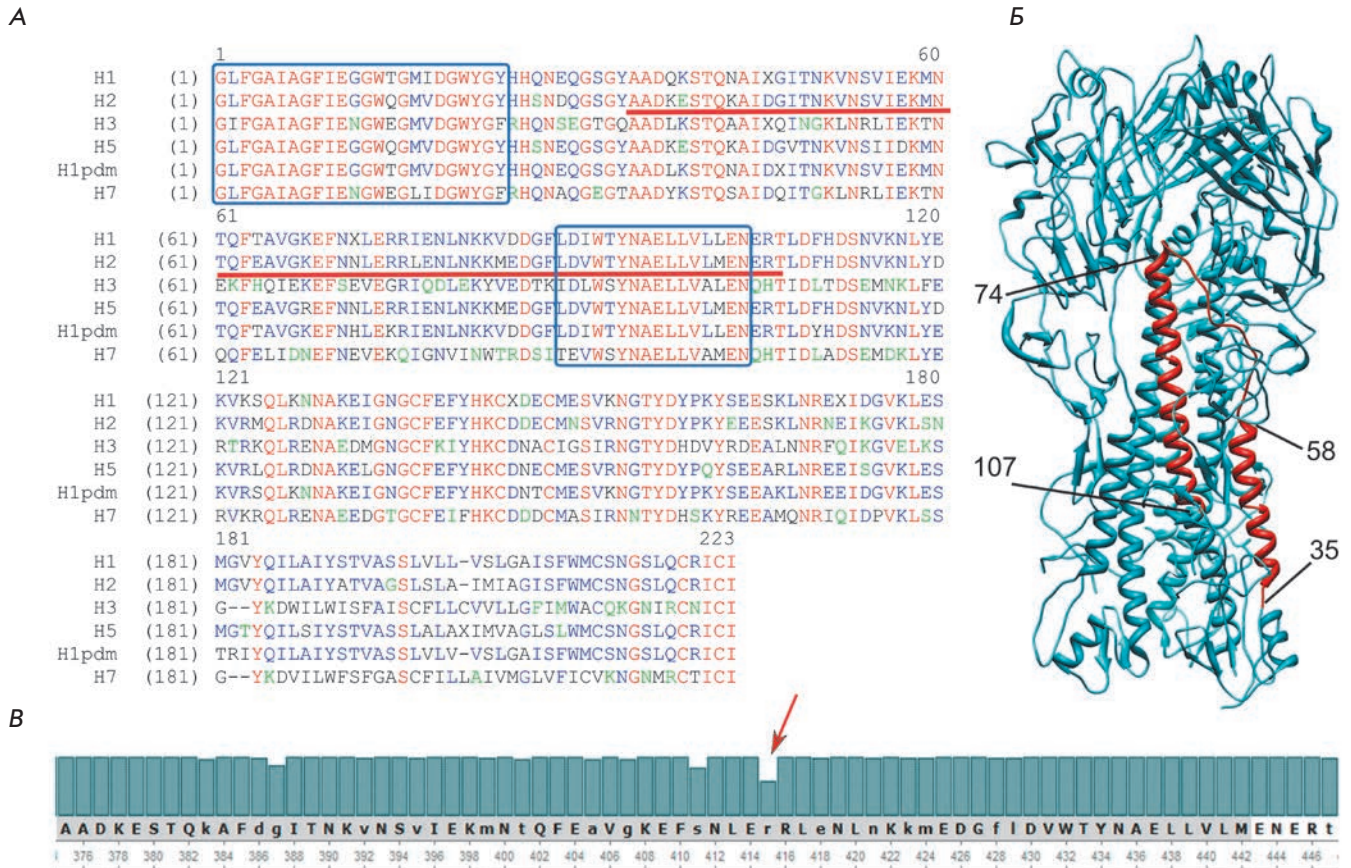


Рис. 1. А — выравнивание консенсусных последовательностей HA2 вирусов гриппа А различных подтипов. Два высококонсервативных участка с идентичностью последовательностей 78.3 и 62.5% соответственно выделены синими рамками. Подчеркнут фрагмент, выбранный для включения в состав гибридного белка. Б — трехмерная структура молекулы гемагглютинаина (тример, модель 3WR7 Protein Data Bank). Красным выделен фрагмент HA2 (35–107) одного из мономеров. Основные участки: малая α -спираль (35–58); неструктурная область (59–73); участок большой α -спирали, содержащий высококонсервативную область (74–107). В — степень консервативности аминокислот в участке HA2 (35–107) вирусов гриппа человека А/Н2N2 (нумерация по HA0). Наименее консервативный Arg416 (58.3%) отмечен красной стрелкой

высококонсервативных участка: (1–24) и (89–104) (рис. 1А). Идентичность на первом участке составляет 78.3%, однако он содержит высокогидрофобный пептид слияния HA, склонный к образованию агрегатов. Несмотря на то что консервативность второго участка меньше (62.5%), большинство аминокислотных замен не сопряжено с изменением физико-химических свойств боковых радикалов, что позволяет надеяться на небольшое изменение способности к презентации на определенных аллелях HLA. Кроме того, консервативная последовательность YNAELLVL, входящая в данный участок, обнаруживается в большей части В- и CD4+ Т-эпитопов в HA2 (рис. 2А). Наиболее отличаются от консенсуса последовательности H3 и H7 (филогенетическая группа II), при исключении которых идентичность

на участке повышается до 87.5%. Для конструирования целевого гибридного рекомбинантного белка был выбран фрагмент консенсусной последовательности HA2 вирусов гриппа человека А/Н2N2 (филогенетическая группа I).

В состав гибридного белка была включена консервативная область HA2 (89–104), а также малая α -спираль HA2 (35–58), выступающая на поверхность тримера, и потенциально доступная для связывания антителами (рис. 1Б). Для сохранения третичной структуры в состав гибридного белка FlgMN включен непрерывный фрагмент HA2 (35–107).

Фрагмент HA2 (35–107) вирусов гриппа H2 человека обладает наибольшей однородностью по аминокислотному составу. Наиболее вариабельной аминокислотой (встречаемость 58.3%) является аргинин

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

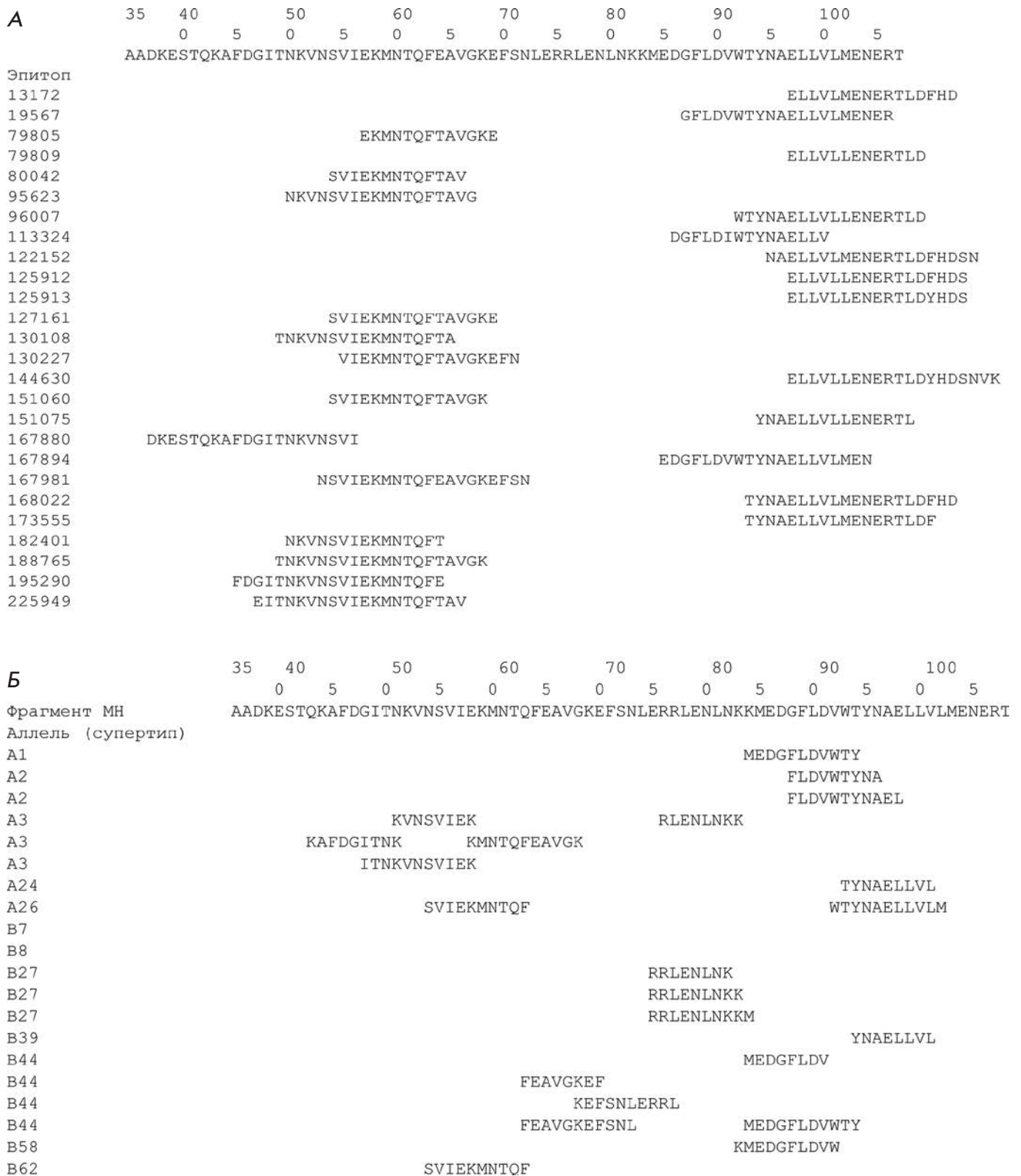


Рис. 2. А – экспериментальные В- и CD4+ Т-клеточные эпитопы, гомологичные фрагменту консенсусной последовательности H2 HA2 (35–107) не менее чем на 90%, результат поиска по базе данных IEDB. Б – потенциальные CD8+ Т-клеточные эпитопы в составе фрагмента HA2 (35–107) для репрезентативного набора аллелей HLA, результат анализа с использованием NetCTLpan1.1 Server [19]

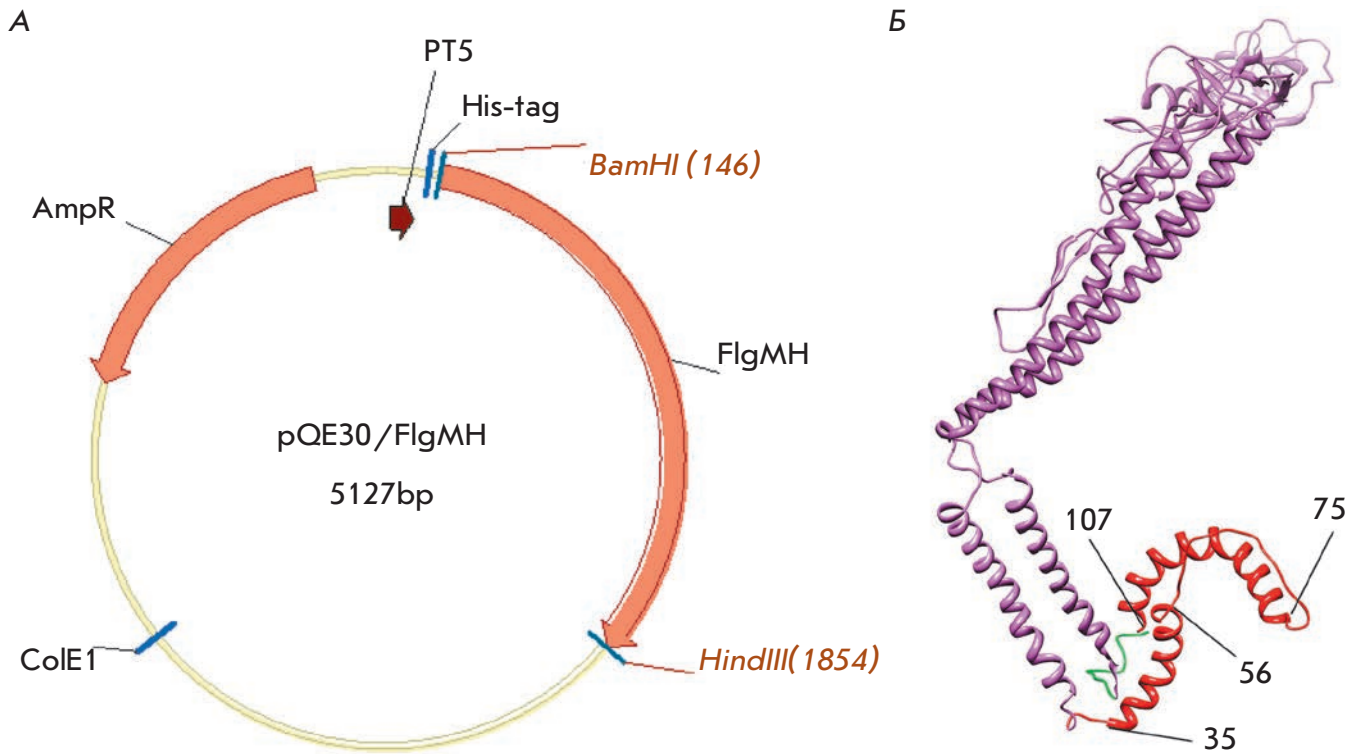


Рис. 3. А – карта плазмиды, кодирующей белок FlgMH. BamHI, HindIII – сайты клонирования гена, кодирующего белок FlgMH в поликлональный сайт вектора pQE30. ColE1 – участок начала репликации, PT5 – T5 промотор, AmpR – ген β-лактамазы, маркер устойчивости к ампициллину, His-tag – N-концевой гистидиновый таг. Б – теоретическая модель трехмерной структуры мономера гибридного белка FlgMH: красным выделен фрагмент HA2 (35–107), фиолетовым – флагеллин, зеленым – гистидиновый таг

(R) в положении 75 (позиция 415 в нумерации HA0), при этом в 41.7% в данном положении находится лизин (K). Обе аминокислоты положительно заряжены, боковой радикал аргинина крупнее и, следовательно, предпочтительнее для провокации гуморального иммунного ответа (рис. 1B).

Кроме того, последовательность HA2 (35–107) содержит участки, гомологичные экспериментальным B- и CD4⁺ T-клеточным эпитопам, представленным в базе данных IEDB (рис. 2A). Теоретический поиск показал наличие множественных потенциальных CD8⁺ T-клеточных эпитопов в составе фрагмента HA2 (35–107) для репрезентативного набора аллелей (рис. 2B).

Дизайн гибридного рекомбинантного белка FlgMH

Химерный белок конструировали с использованием коммерческой плазмиды pQE30, содержащей перед сайтом клонирования старт-кодон и гистидиновый таг. Гибридный белок FlgMH включал полную размерную последовательность флагеллина (FlgC) без старт-кодона и целевую последовательность MN,

кодируемые одной рамкой считывания с гистидиновым тагом (рис. 3A). Таким образом, рекомбинантный белок FlgMH состоял из флагеллина, к N-концу которого присоединен гистидиновый таг, а к C-концу – участок (35–107) консенсусной последовательности HA2 вирусов гриппа человека A/H2N2. Гомологичное моделирование трехмерной структуры FlgMH показало сохранение α-спирализации в участках MN, соответствующих фрагментам (38–56) и (75–107) в составе HA2 (рис. 3B), из чего можно предположить, что большая часть нативной структуры сохранена, и гибридный белок будет стимулировать образование антител, в том числе к структурным эпитопам, характерным для нативного HA.

Получение и очистка рекомбинантных белков

Нуклеотидные последовательности, кодирующие гибридный белок FlgMH, а также его компоненты Flg и MN были клонированы в вектор pQE30 и экспрессированы в штамме *E. coli* DLT1270 (рис. 4A). Теоретическая молекулярная масса белков составляла соответственно FlgMH – 61.3, Flg – 52.9,

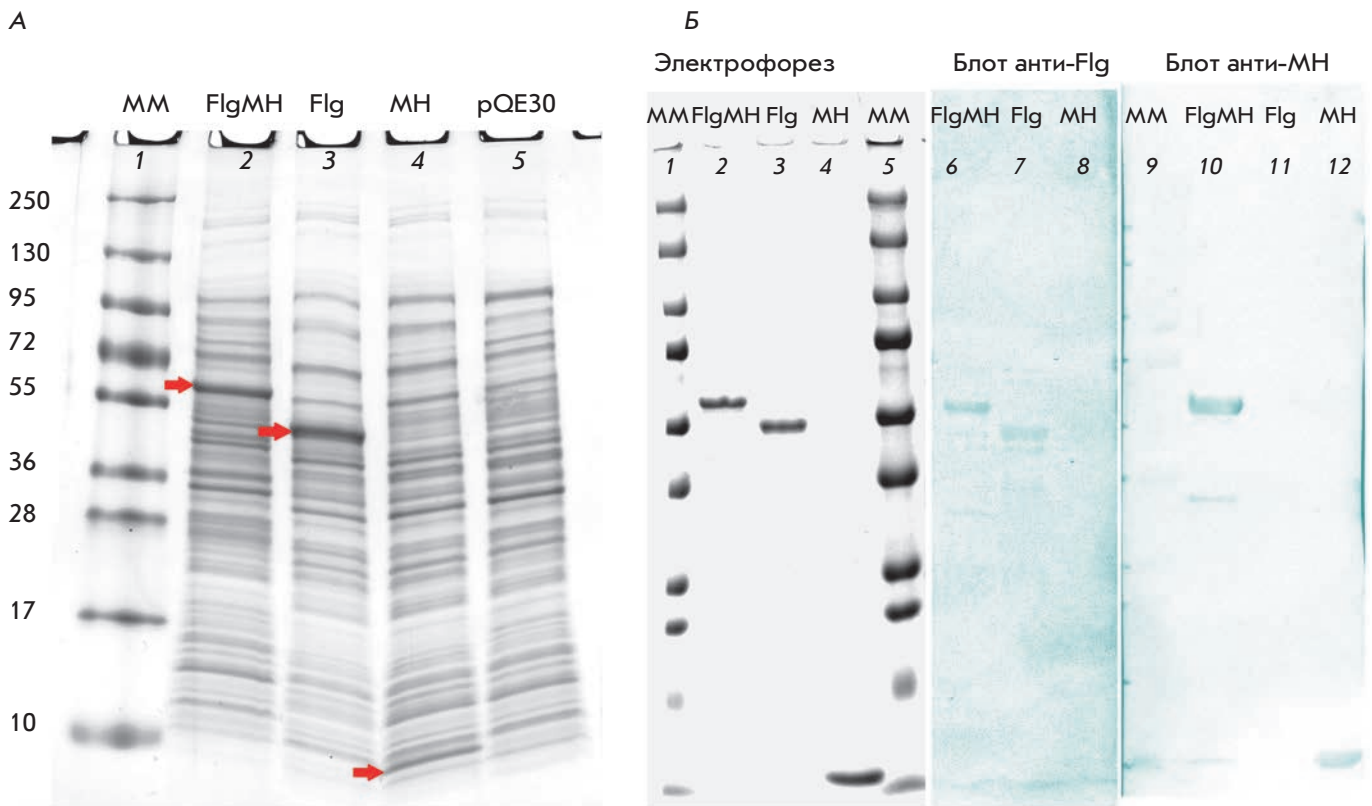


Рис. 4. А – экспрессия рекомбинантных белков в клетках *E. coli*. 1 – набор белковых стандартов (Fermentas, ЕС), обозначен в кДа; 2–4 – лизат клеток, трансформированных плазмидой рQE30 с соответствующей вставкой; 5 – лизат клеток, трансформированных вектором рQE30 без вставки. Полосы, соответствующие рекомбинантным белкам, обозначены стрелками. Б – рекомбинантные белки FlgMН, Flg и МН после хроматографической очистки на Ni-сорбенте. Представлен результат электрофореза, а также Вестерн-блот с использованием поликлональных антител к флагеллину (6–8) и антисыворотки к фрагменту МН (9–12)

МН – 9.8 кДа, что совпадало с их электрофоретической подвижностью в ПААГ (рис. 4Б). Белки FlgMН и Flg были хорошо растворимы в ФБР, в отличие от белка МН, который накапливался в тельцах включения и растворялся только в 2 М мочеvine. Очищенные белки FlgMН и Flg взаимодействовали в Вестерн-блоттинге с кроличьей поликлональной сывороткой к флагеллину, а белки FlgMН и МН – с мышинной кросс-специфичной сывороткой против НА вирусов гриппа филогенетической группы I (рис. 4Б).

Иммуногенность и протективность рекомбинантного белка FlgMН

Консенсусная последовательность НА2 (35–107), входящая в состав белка FlgMН, включает в себя В-, CD4+ и CD8+ Т-клеточные эпитопы, поэтому мы оценивали способность рекомбинантного белка FlgMН стимулировать как В-, так и Т-клеточный иммунный ответ.

Для исследования способности рекомбинантного белка FlgMН индуцировать образование НА2-специфических антител мышей Balb/c иммунизировали трехкратно интраназально белком FlgMН без адъюванта, контрольной группе мышей вводили белок Flg. Интраназальный путь введения антигена индуцирует формирование как системного, так и местного иммунного ответа. Поэтому на 14-е сутки после последней иммунизации мы определяли содержание IgA в сыворотке и БАЛ к целевому антигену, а также титры антител в сыворотке к вирусам гриппа первой и второй филогенетических групп, а также оценивали профиль подклассов IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3). Местный ответ обусловлен секреторным sIgA, мультимерная форма которого обладает эффективной противовирусной активностью, блокируя вирусную репликацию [21, 22]. Интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным белком FlgMН стимулировала формирование

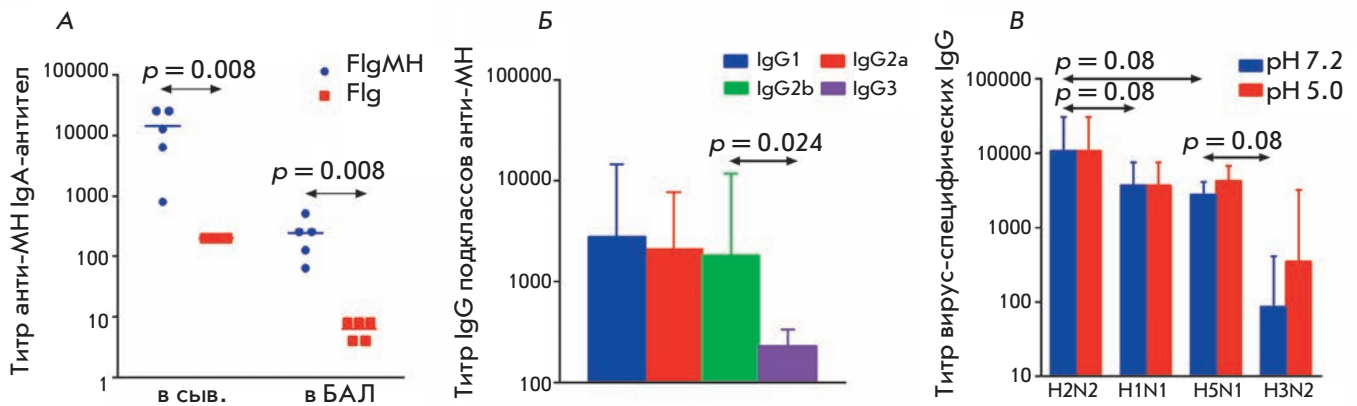


Рис. 5. Титры антител у мышей опытной и контрольной групп через 2 недели после трехкратной иммунизации. А – титры IgA-антител в сыворотке и БАЛ к целевому антигену МН. Б – СГТ подклассов IgG к целевому антигену МН у мышей опытной группы. В – СГТ IgG-антител в сыворотке к вирусам гриппа А/PR/8/34 (H1N1), А/Singapore/1/57 (H2N2), А/Aichi/2/68 (H3N2), А/Kurgan/05/2005 (H5N1). Для расчета значения p использован критерий Манна–Уитни

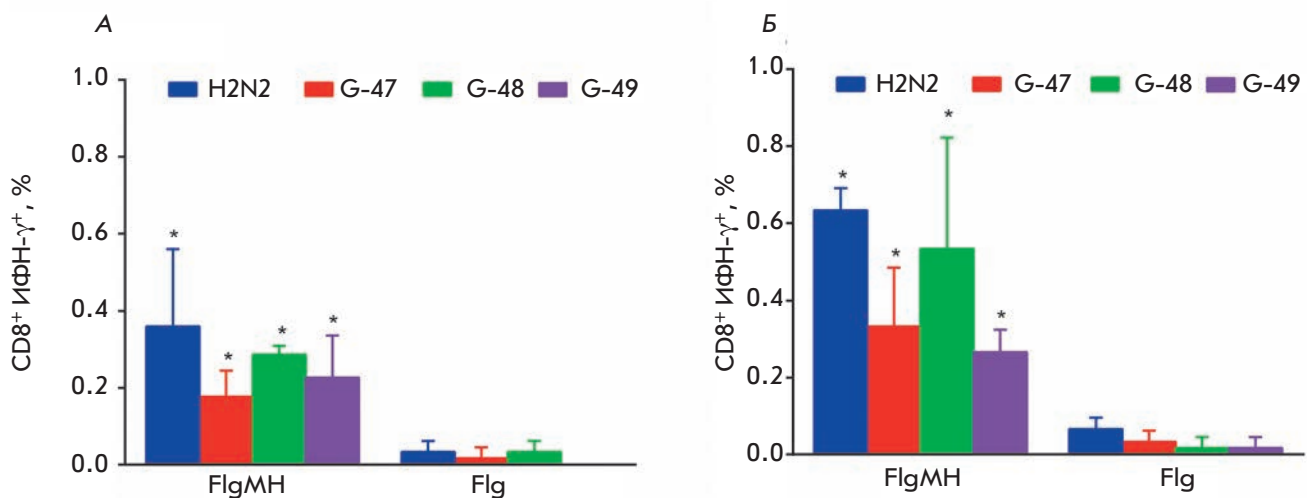


Рис. 6. Синтез ИФН- γ CD8+ Т-клетками селезенки мышей после рестимуляции пептидами G-47, G-48, G-49 и вирусом гриппа А/Singapore/1/57 (H2N2) у мышей C57Bl/6 (А) и Balb/c (Б). Селезенки забирали у трех мышей опытной и контрольной групп через 14 дней после трехкратной иммунизации. * – отличие от контроля $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни)

высокого уровня анти-НА2 IgA в сыворотке и БАЛ иммунизированных животных (рис. 5А).

Известно, что тип иммунного ответа на флагеллин и рекомбинантные белки на его основе определяется формой флагеллина. Растворимый флагеллин (мономерный и полимерный) индуцирует иммунный ответ, специфичный к флагеллину и введенному с ним целевому антигену с сильным преобладанием ответа Th2-типа [23–29]. Тогда как закрепленная в мембра-

не форма флагеллина вызывает преимущественно иммунный ответ Th1-типа [24, 28]. С другой стороны, показано, что тип иммунного ответа на целевой антиген зависит также от антигена, слитого с флагеллином [23]. Как показано на рис. 5Б, иммунизация растворимым рекомбинантным белком FlgMН приводила к индукции практически одинакового уровня IgG1 (тип ответа Th2), IgG2a и IgG2b (тип ответа Th1) НА2-специфических антител: IgG1 – 40.0%,

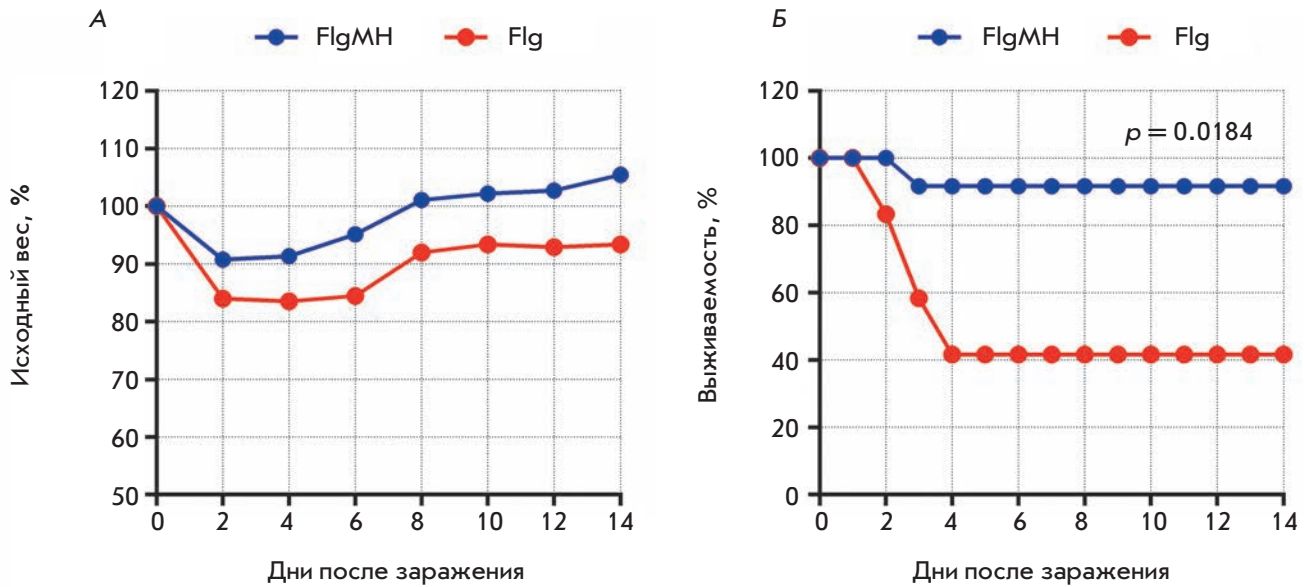


Рис. 7. Изменение среднего веса (А) и кривая выживаемости Каплана–Мейера (Б) в группах иммунизированных мышей после заражения адаптированным вирусом гриппа А/Singapore/1/57 (H2N2) в дозе 2LD₅₀. Мышей вакцинировали гибридным белком FlgMH или белком-носителем Flg, затем заражали летальным вирусом. За состоянием животных следили в течение 14 дней. Для расчета значения *p* использован критерий Мантела–Кокса

IgG2a – 30.3%, IgG2b – 26.4%, IgG3 – 3.3%. Отсутствие существенных различий подклассов IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b) к целевому антигену после иммунизации мышей рекомбинантным белком FlgMH предполагает формирование смешанного Th1 и Th2 иммунного ответа.

Выбранная консенсусная последовательность HA2 (35–107) достаточно консервативна у вирусов гриппа первой филогенетической группы (87.5% гомологии), поэтому представлялось важным оценить формирование кросс-реактивных антител после иммунизации мышей белком FlgMH. По результатам ИФА HA2-специфические IgG, индуцируемые рекомбинантным белком FlgMH, связывались не только с вирусом гриппа субтипа А/H2N2 (среднегеометрический титр, СГТ = 12800), но и с другими подтипами вируса гриппа А первой филогенетической группы: Н1 (СГТ = 4160) и Н5 (СГТ = 2880) (рис. 5В). Однако титры антител к вирусам гриппа подтипов Н1 и Н5 были значимо ниже, чем к подтипу Н2 ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни). Кроме того, индуцируемые антитела связывались с гемагглютинином в нативной конформации (рН 7.2) и с кислой формой гемагглютинина (рН 5.0) с одинаковой интенсивностью (рис. 5В), что свидетельствует о доступности целевой последовательности HA2 на поверхности вириона для антител.

Способность рекомбинантного белка FlgMH индуцировать клеточный ответ определяли по про-

дукции ИФН- γ CD3+CD8+ Т-лимфоцитами селезенки после рестимуляции синтетическими пептидами (G-47, G-48, G-49), соответствующими целевой последовательности HA2 и очищенным вирусом гриппа А/H2N2. Показано, что число активированных ИФН- γ секретирующих CD3+CD8+ Т-клеток как у мышей линии Balb/c (гаплотип H-2d), так и у мышей линии C57Bl/6 (гаплотип H-2b), иммунизированных рекомбинантным белком FlgMH, было статистически значимо выше ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), чем у мышей, иммунизированных белком-носителем флагеллином (рис. 6А,Б).

Флагеллин обеспечивает антигенспецифический CD4+ Т-клеточный ответ [30] через активацию TLR5, экспрессируемых на клетках CD11c+ [31], что приводит к сильному гуморальному ответу. Однако способность флагеллина стимулировать специфический CD8+ Т-клеточный ответ остается неясной. В ряде работ показано, что иммунизация мышей слитым белком (флагеллин-GFP, флагеллин-OVA) стимулирует CD8+ ответ на антиген, в отличие от иммунизации только антигеном без флагеллина [26, 32]. С другой стороны, установлено, что растворимый флагеллин, слитый с антигеном, преимущественно индуцирует Th2-ответ и не формирует антигенспецифических клеток CD8+ [23–36]. Для презентации в МНС-комплексе экзогенный антиген подвергается протеолитическому расщеплению, перед которым он должен быть развернут [33]. Восстановление дис-

ульфидных связей внутри белка является ключевым моментом в процессе разворачивания [34], и кросс-презентация дендритными клетками антигена, содержащего дисульфидные мостики, зависит от экспрессии тиоловых редуктаз, индуцируемой ИФН- γ [35]. Показано [36], что слияние МНС I ограниченных иммуногенных эпитопов с флагеллином может создать псевдоадъювантный эффект, который функционирует через усиление презентации антигена на поверхности клетки и не зависит от TLR5, MyD88 и консервативных регионов флагеллина. Это обусловлено более эффективным процессингом антигена, слитого с флагеллином, чем антигена в нативном состоянии, т.е. антиген, а не сигнал TLR5 является лимитирующим фактором при формировании CD8⁺ Т-клеточного ответа. Таким образом, флагеллин может быть платформой для вакцин, которые содержат слабопроцессирующиеся антигены, несущие CD8⁺ эпитопы [36].

Нами установлено, что растворимая форма флагеллина, слитого с последовательностью HA₂³⁵⁻¹⁰⁷, содержащей CD8⁺ эпитопы, стимулирует формирование HA2-специфических CD8⁺ Т-клеток.

Способность рекомбинантного белка FlgMN защищать мышей показана при заражении иммунизированных животных летальной дозой (2LD₅₀) адаптированного вируса гриппа A/Singapore/1/57 (H2N2). Иммунизация приводила к различию в динамике массы тела опытных и контрольных мышей, у иммунизированных мышей максимальная потеря массы тела составила 10%, у контрольных – 16.6% (рис. 7А). Иммунизация рекомбинантным белком FlgMN защищала мышей от заражения (рис. 7Б). Выживаемость в опытной группе составила 91.0%, в отличие от контрольной группы – 41%. Полученные различия были статистически значимыми ($p = 0.0184$, критерий Мантела–Кокса).

ВЫВОДЫ

Консервативные участки второй субъединицы HA представляют интерес для дизайна вакцинных кон-

струкций, способных обеспечить иммунитет широкого спектра действия против вирусов гриппа А. Гибридный рекомбинантный белок FlgMN на основе флагеллина и высококонсервативного фрагмента гемагглютинаина HA2 (35–107) вирусов гриппа подтипа А/Н2N2 содержит потенциальные В-клеточные, а также CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные эпитопы и сочетает адъювантную активность флагеллина, обусловленную его специфическим связыванием с TLR5, и консервативность участка стеблевой части молекулы гемагглютинаина, которая участвует в конформационных изменениях, ведущих к слиянию бислойных липидных мембран вируса и клетки-хозяина в процессе рН-индуцированной реакции слияния. Целевая последовательность, включающая малую α -спираль, фрагмент большой α -спирали и соединяющий их участок, входит в состав второй цепи гемагглютинаина и отличается очень высокой стабильностью аминокислотного состава в рамках подтипа.

Рекомбинантный белок FlgMN стимулирует формирование смешанного Th1/Th2-ответа на целевую последовательность, а также кросс-реагирующих антител, связывающихся с вирусами гриппа первой филогенетической группы (H1, H2, H5), и индукцию специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+ИФН- γ +). Иммунизация слитым белком защищала иммунизированных животных от летальной гриппозной инфекции. Сконструированный гибридный рекомбинантный белок FlgMN является перспективной основой для создания противогриппозной вакцины широкого спектра действия, способной стимулировать Т- и В-клеточный иммунный ответ. Кросс-протективный потенциал фрагментов HA2 может быть усилен оптимизацией их доставки и увеличением иммуногенности при помощи лигандов TLR-рецепторов для эффективной стимуляции врожденного иммунитета и последующего усиления адаптивного иммунного ответа. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00043).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skehel J.J., Wiley D.C. // Annu. Rev. Biochem. 2000. V. 69. P. 531–569.
2. Gerhard W., Mozdzanowska K., Zharikova D. // Emerg. Infect. Dis. 2006. V. 12. № 14. P. 569–574.
3. Kwong P.D., Wilson I.A. // Nat. Immunol. 2009. V. 10. № 6. P. 573–578.
4. Ekiert D.C., Friesen R.H., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J., Brandenburg B., et al. // Science. 2011. V. 333. № 6044. P. 843–850.
5. Trosby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., et al. // PLoS One. 2008. V. 3. № 12. P. e3942.
6. Gocnik M., Fislova T., Sladkova T., Mucha V., Kostolansky F., Vareckova E. // J. Gen. Virol. 2007. V. 88. № 3. P. 951–955.
7. Prabhu N., Prabakaran M., Ho H.T., Velumani S., Qiang J., Goutama M., Kwang J. // J. Virol. 2009. V. 83. № 6. P. 2553–2562.
8. Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Petersen E., Moran T.M., Palese P. // PLoS Pathog. 2010. V. 6. № 2. P. e1000796.
9. Wei C.J., Boyington J.C., McTamney P.M., Kong W.P., Pearce M.B., Xu L., Andersen H., Rao S., Tumpey T.M., Yang Z.Y., et al. // Science. 2010. V. 329. № 5995. P. 1060–1064.
10. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., et al. // Science. 2011. V. 333. № 6044. P. 850–856.

11. Wrammert J., Koutsonanos D., Li G.M., Edupuganti S., Sui J., Morrissey M., McCausland M., Skountzou I., Hornig M., Lipkin W.I., et al. // *J. Exp. Med.* 2011. V. 208. № 1. P. 181–193.
12. Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C., Wilson I.A., Garcia-Sastre A., Moran T.M., Palese P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 44. P. 18979–18994.
13. Bommakanti G., Citron M.P., Hepler R.W., Callahan C., Heidecker G.J., Najar T.A., Lu X., Joyce J.G., Shiver J.W., Casimiro D.R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 31. P. 13701–13706.
14. Stanekova Z., Adkins I., Kosova M., Janulíková J., Sebo P., Vareckova E. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 1. P. 24–35.
15. Stranzl T., Larsen M.V., Lundegaard C., Nielsen M. // *Immunogenetics.* 2010. V. 62. № 6. P. 357–368.
16. Vita R., Zarebski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. Database issue. P. D854–D862.
17. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. № 13. P. 1605–1612.
18. Kelley L.A., Sternberg M.J. // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 3. P. 363–371.
19. Grant S., Jessee J., Bloom F., Hanahan D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 12. P. 4645–4649.
20. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
21. Arulanandam B.P., Raeder R.H., Nedrud J.G., Bucher D.G., Le J., Metzger D.W. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 1. P. 226–231.
22. Bizanov G., Janakova L., Knapstad S.E., Karlstad T., Bakke H., Haugen I.L., Haugan A., Samdal H.H., Haneberg B. // *Scand. J. Immunol.* 2005. V. 61. № 6. P. 503–510.
23. Bobat S., Flores-Langarica A., Hitchcock J., Marshall J.L., Kingsley R.A., Goodall M., Gil-Cruz C., Serre K., Leyton D.L., Letran S.E. // *Eur. J. Immunol.* 2011. V. 41. № 6. P. 1606–1618.
24. Cunningham A.F., Khan M., Ball J., Toellner K.M., Serre K., Mohr E., MacLennan I.C. // *Eur. J. Immunol.* 2004. V. 34. № 11. P. 2986–2995.
25. Didierlaurent A., Ferrero I., Otten L.A., Dubois B., Reinhardt M., Carlsen H., Blomhoff R., Akira S., Kraehenbuhl J.P., Sirard J.C. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 11. P. 6922–6930.
26. Huleatt J.W., Jacobs A.R., Tang J., Desai P., Kopp E.B., Huang Y., Song L., Nakaar V., Powell T.J. // *Vaccine.* 2007. V. 25. № 4. P. 763–775.
27. Sanders C.J., Franchi L., Yarovinsky F., Uematsu S., Akira S., Nunez G., Gewirtz A.T. // *Eur. J. Immunol.* 2009. V. 39. № 2. P. 359–371.
28. Gat O., Galen J.E., Tennant S., Simon R., Blackwelder W.C., Silverman D.J., Pasetti M.F., Levine M.M. // *PLoS One.* 2011. V. 5. № 11. P. e1373.
29. Stepanova L.A., Kotlyarov R.Y., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Sergeeva M.V., Kasianenko M.A., Kuprianov V.V., Ravin N.V., Tsybalova L.M., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 3. P. e0119520.
30. McSorley S.J., Ehst B.D., Yu Y., Gewirtz A.T. // *J. Immunol.* 2002. V. 169. № 7. P. 3914–3919.
31. Bates J.T., Uematsu S., Akira S., Mizel S.D. // *J. Immunol.* 2009. V. 182. № 12. P. 7539–7547.
32. Cuadros C., Lopez-Hernandez F.J., Dominguez A.L., McClelland M., Lustgarten J. // *Infect. Immun.* 2004. V. 72. № 5. P. 2810–2816.
33. Jensen P.E. // *Semin. Immunol.* 1995. V. 7. № 6. P. 347–353.
34. Collins D.S., Unanue E.R., Harding C.V. // *J. Immunol.* 1991. V. 147. № 12. P. 4054–4059.
35. Singh R., Cresswell P. // *Science.* 2010. V. 328. № 5984. P. 1394–1398.
36. Bates J.T., Graff A.H., Phipps J.P., Grayson J.M., Mizel S.B. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 11. P. 6255–6262.

УДК 612.178.1

Снижение чувствительности миокарда к стимуляции мускариновых рецепторов третьего типа в постнатальном онтогенезе

С. В. Тапилина^{1,2}, Д. В. Абрамочкин^{1,2*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра физиологии человека и животных, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, кафедра физиологии, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

*E-mail: abram340@mail.ru

Поступила в редакцию 10.11.2015

Принята к печати 05.02.2016

РЕФЕРАТ Мускариновые рецепторы третьего подтипа (M3-рецепторы) наряду с M2-рецепторами опосредуют холинергические эффекты в миокарде млекопитающих. При этом у взрослых животных электрофизиологические эффекты, наблюдаемые при избирательной стимуляции M3-рецепторов в миокарде, крайне малы по сравнению с эффектами стимуляции M2-рецепторов. Нами изучено действие избирательной стимуляции M3-рецепторов путем аппликации агониста мускариновых рецепторов пилокарпина (10 мкМ) на фоне блокирования M2-рецепторов селективным антагонистом метоктрамином (100 нМ) на конфигурацию потенциалов действия (ПД) в препаратах предсердного и желудочкового миокарда новорожденных и трехнедельных крысят в сравнении с эффектами в миокарде взрослых крыс. В предсердном миокарде стимуляция M3-рецепторов вызывала уменьшение длительности ПД приблизительно одинаково выраженное у новорожденных и взрослых крыс, в то время как у трехнедельных крысят отсутствовал статистически значимый эффект. Эффект, развивающийся в желудочковом миокарде новорожденных крысят, более чем в 3 раза превосходил эффект у взрослых животных, у трехнедельных животных эффект отсутствовал. В препаратах всех типов действие стимуляции M3-рецепторов на электрическую активность полностью снималось их селективным антагонистом 4-DAMP (10 нМ). Согласно данным РВ-ПЦР, количество мРНК гена M3-рецепторов как в предсердном, так и в желудочковом миокарде снижается по мере взросления животного. Можно заключить, что вклад M3-рецепторов в реализацию холинергических воздействий на миокард снижается в постнатальном онтогенезе, что связано с уменьшением экспрессии гена M3-рецепторов по сравнению с геном M2-рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ацетилхолин, мускариновые рецепторы, онтогенез, потенциал действия, сердце.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АХ – ацетилхолин; M2-рецепторы – мускариновые рецепторы второго типа; M3-рецепторы – мускариновые рецепторы третьего типа; НК – новорожденные крысята; ТНК – крысята трехнедельного возраста; ВК – взрослые крысы; РВ-ПЦР – метод ПЦР в реальном времени; ПД – потенциал действия; ДПД50 – длительность ПД на уровне 50% реполяризации; ДПД90 – длительность ПД на уровне 90% реполяризации.

ВВЕДЕНИЕ

Парасимпатическая регуляция сердца чрезвычайно важна для его нормальной работы. Нейромедиатор ацетилхолин (АХ), выделяющийся из окончаний интрамуральных постганглионарных парасимпатических нейронов, является основным эффектором парасимпатической нервной системы. АХ действует на пейсмекерные и рабочие кардиомиоциты посредством мускариновых рецепторов второго подтипа (M2-рецепторов), вызывая соответственно

отрицательный хронотропный и инотропный эффект [1]. Однако в последнее время появилось множество свидетельств существования в миокарде млекопитающих функционально активных холинорецепторов третьего типа (M3-рецепторов) [2–4].

В то время как M2-рецепторы сопряжены с G_i-белками, а основные эффекты их стимуляции связаны со снижением внутриклеточного уровня сАМР, M3-рецепторы сопряжены с G_q-белками, что обуславливает активацию фосфоинозитидного каскада

внутриклеточной сигнализации при их стимуляции [1, 2]. При этом α -субъединица G_q -белка активирует фосфолипазу C, что в итоге приводит к повышению внутриклеточного уровня Ca^{2+} и активации протеинкиназы C, способной посредством фосфорилирования влиять на работу различных ионных каналов. С другой стороны, каналы, переносящие калиевый ток ($I_{K_{M3}}$), активируются, по всей видимости, в результате прямого взаимодействия с субъединицами G_q -белка [3, 5]. В результате стимуляция M3-рецепторов приводит к уменьшению длительности ПД, выраженному у взрослых крыс [6], мышей [4] и морских свинок [7] главным образом в предсердном миокарде. Помимо этого, M3-рецепторы опосредуют ряд эффектов АХ, не связанных с электрической активностью, в частности его антиапоптотическое действие на кардиомиоциты [8, 9].

Большинство работ, связанных с M3-рецепторами миокарда, ограничивалось лишь изучением их функций у взрослых животных, несмотря на то, что на ранних стадиях постнатального онтогенеза роль парасимпатической регуляции сердца в целом выше, чем у взрослых, в связи с недоразвитием или полным отсутствием симпатической иннервации миокарда [10]. При этом результаты экспериментов на крысах *in vivo* [11], а также предварительные данные нашей группы [12], полученные на миокарде новорожденных крысят, позволяют предполагать более высокую чувствительность миокарда к стимуляции M3-рецепторов на ранних стадиях онтогенеза.

В связи с этим в настоящей работе проведено сравнительное изучение электрофизиологических эффектов избирательной стимуляции M3-рецепторов в предсердном и желудочковом миокарде новорожденных крысят (НК) первого дня жизни, крысят трехнедельного возраста (ТНК) и взрослых крыс возрастом 4 месяца (ВК). Электрофизиологические данные сопоставляли с результатами измерения экспрессии генов M3- и M2-рецепторов методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали четырехмесячных самцов белых беспородных крыс ($n = 26$) массой 300–350 г, ТНК массой 24–28 г ($n = 24$, из пяти различных пометов) и НК массой 4.5–6 г ($n = 25$). Животных декапитировали, после чего быстро вскрывали грудную клетку, выделяли сердце и промывали раствором Тироде (состав в ммоль/л: NaCl 133.47; KCl 4.69; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.35; $NaHCO_3$ 16.31; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.18; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.5; глюкоза 7.77), насыщенным карбогеном (газовая смесь 95% O_2 , 5% CO_2). После этого из каждого сердца выделяли препарат ушка правого предсердия и препарат стенки правого желудочка.

Каждый препарат закрепляли в экспериментальной камере объемом 3 мл (температура 38°C, скорость потока раствора 10 мл/мин) эндокардиальной стороной вверх и стимулировали с помощью серебряных электродов с частотой 6 Гц (ВК и ТНК) или 4 Гц (НК).

ПД регистрировали стандартным методом внутриклеточного отведения биоэлектрической активности с помощью стеклянных микроэлектродов сопротивлением 25–50 МОм, подключенных к усилителю Neuroprobe-1600 (AM-Systems, США). Сигнал оцифровывался на аналогово-цифровом преобразователе E14-140 (L-Card, Россия) и записывался на компьютере с помощью программы Powergraph v. 3.3 (DiSoft, Россия). Обработку данных проводили в программе MiniAnalysis v. 3.0.1 (Synaptosoft, США). При анализе записей определяли длительность ПД на уровне 50 и 90% реполяризации (ДПД50 и ДПД90 соответственно), а также амплитуду ПД и величину потенциала покоя.

В электрофизиологических экспериментах использовали четыре соединения: селективные блокаторы M1-, M2- и M3-рецепторов – пирензепин, метоктрамин и 4-DAMP соответственно, а также агонист M-рецепторов пилокарпин, обладающий небольшой специфичностью по отношению к M1- и M3-рецепторам по сравнению с M2- и M4-рецепторами. Все вещества заказаны в Sigma (США). Концентрации веществ выбраны на основе данных предыдущих исследований [4, 7]. На каждом препарате не более 2 раз записывали эффект пилокарпина в норме или на фоне того или иного блокатора.

Уровни экспрессии генов сравнивали методом РВ-ПЦР. Для этого использовали препараты ушка правого предсердия и стенки правого желудочка, полученные от НК, ТНК и ВК, способом, описанным выше. Препараты помещали в раствор для стабилизации РНК (IntactRNA, «Евроген», Россия) на 24 ч при 4°C, которые затем хранили при –20°C до момента выделения РНК. РНК экстрагировали гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформным методом (ExtractRNA, «Евроген», Россия). РНК от геномной ДНК очищали при помощи ДНКазы I (2 000 ед. акт./мл, NEB, США) в течение 60 мин при 37°C. Концентрацию РНК измеряли при помощи спектрофотометра (Nanodrop 2000, ThermoScientific, США). Для синтеза кДНК суммарную РНК, очищенную от геномной ДНК, подвергали реакции обратной транскрипции с использованием набора MMLVRTkit («Евроген», Россия). Все манипуляции проводили в соответствии со стандартной методикой по протоколам, рекомендованным производителем. кДНК хранили при температуре –80°C до проведения РВ-ПЦР.

РВ-ПЦР проводили на приборе BioRad с системой детекции CFX96 с использованием набора реактивов

компании «Синтол» (Россия) и красителя EvaGreen (BIOTIUM, США). Использовали праймеры, синтезированные в ЗАО «Евроген» (5'-3'): М2-рецептор – ТСТААСТGTGATTGGTТАСТGGС (прямой), GCTTAACTGGGTAGGTCAGAGGT (обратный); М3-рецептор – САAGTGGTCTTTCATTCССТTCT (прямой), GCCAGGCTTAAAGAGGAAGTAGTT (обратный); GAPDH – СAGCGATGCTTTACTTTCTGAA (прямой), GATGGCAACAATGTCCACTTT (обратный).

Программа амплификации состояла из начальной денатурации при 95°C, 5 мин; за которой следовало 50 циклов ПЦР (1 мин при 95°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C), а затем последний шаг – 72°C, 10 мин. Данные анализировали пороговым методом при помощи программного обеспечения, поставляемого вместе с амплификатором. Результаты нормировали по количеству РНК, взятому в реакцию обратной транскрипции.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica v. 6.0. При оценке статистической значимости различий для связанных выборок использовали критерий Вилкоксона, для несвязанных – критерий Манна–Уитни. Использование непараметрических критериев было обусловлено малыми размерами выборок, не позволяющими гарантировать нормальность распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для избирательной стимуляции М3-рецепторов в электрофизиологических экспериментах использовали агонист мускариновых рецепторов пилокарпин (10 мкМ), который подавали в экспериментальную камеру в присутствии высокоселективного блокатора М2-рецепторов метоктрамина (100 нМ). Чтобы исключить возможный эффект активации М1-рецепторов, в специальных предварительных экспериментах пилокарпин подавали в присутствии их селективного антагониста пирензепина (100 нМ). Поскольку никаких различий между выраженностью эффектов пилокарпина на фоне метоктрамина и на фоне двух блокаторов обнаружено не было, что согласуется с ранними данными об отсутствии М1-рецепторов в кардиомиоцитах, то в дальнейшем для избирательной стимуляции М3-рецепторов пилокарпин подавали на фоне одного метоктрамина.

Помимо регистрации эффектов стимуляции собственно М3-рецепторов, ставили контрольные эксперименты, в которых пилокарпин апплицировали в отсутствие блокаторов, чтобы выявить суммарный эффект активации М2- и М3-рецепторов в препаратах миокарда.

Оказалось, что в отсутствие блокаторов пилокарпин вызывает ярко выраженное уменьшение дли-

тельности ПД как на уровне 50, так и на уровне 90% реполяризации в желудочковом (рис. 1, 2А,Б) и предсердном (рис. 2В,Г) миокарде крыс всех трех возрастов. Максимальный эффект пилокарпина развивался в течение 250–300 с от момента начала аппликации вещества, в дальнейшем мы будем обсуждать только максимальные значения эффектов пилокарпина.

Эффект избирательной стимуляции М3-рецепторов во всех сериях опытов был качественно сходен с действием пилокарпина в отсутствие блокаторов, однако существенно слабее выражен. Тем не менее у НК и ВК наблюдалось статистически значимое уменьшение ДПД50 и ДПД90 как в желудочковом (рис. 1А,В, 2А,Б), так и в предсердном миокарде

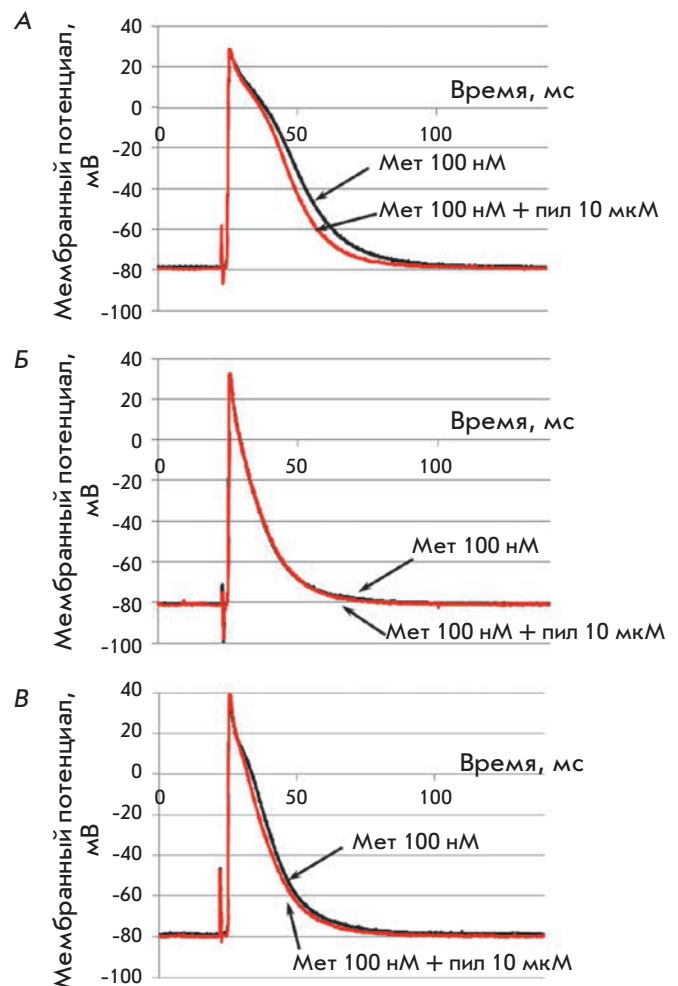


Рис. 1. Сопоставление оригинальных записей ПД в препарате изолированной стенки правого желудочка НК (А), ЛЖ (Б) и ВЖ (Б) в контроле и во время максимального развития эффектов пилокарпина (пил, 10 мкМ) в присутствии селективного блокатора М2-рецепторов метоктрамина (мет, 100 нМ)

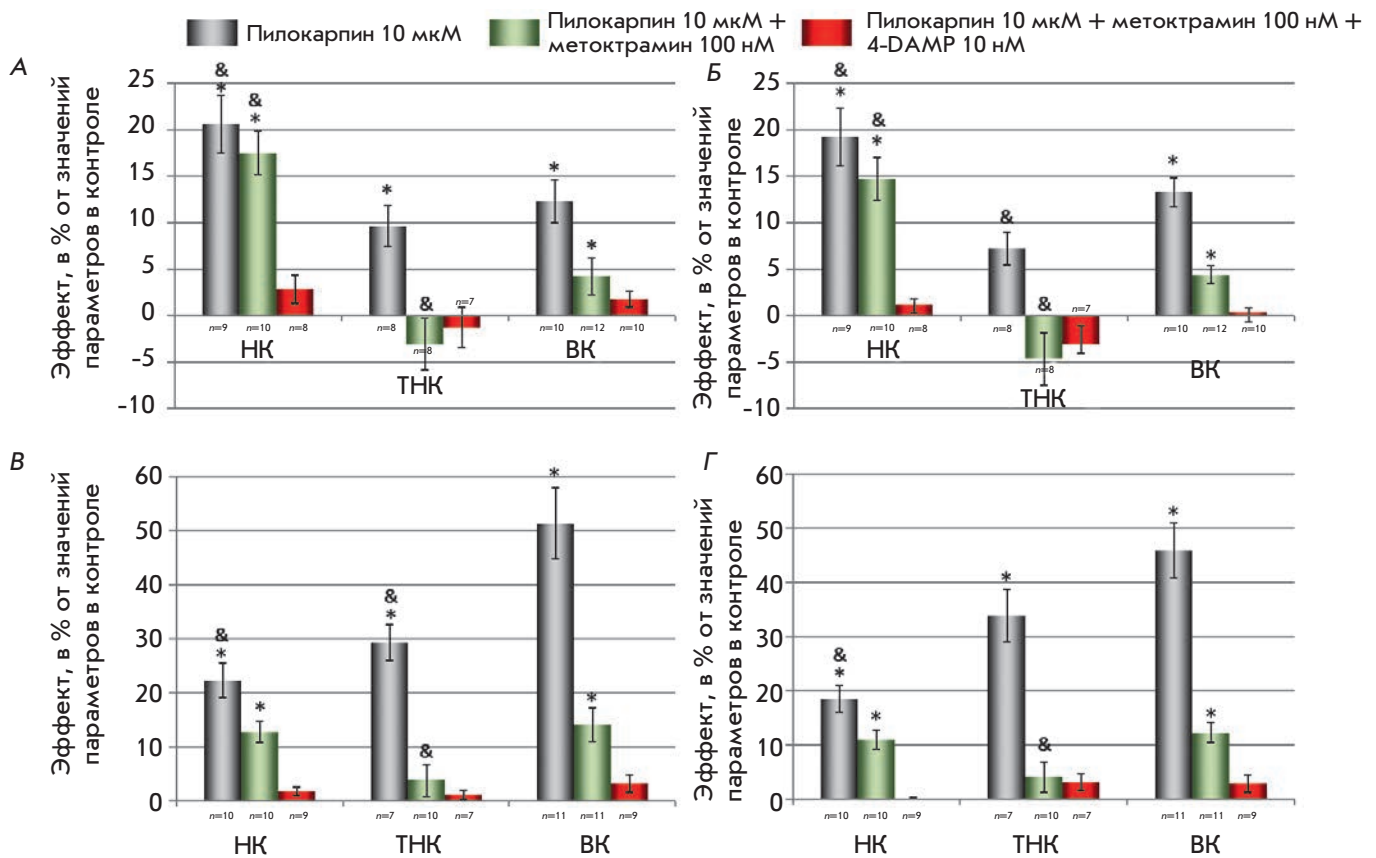


Рис. 2. Относительное уменьшение длительности ПД в препаратах желудочкового (А, Б) и предсердного (В, Г) миокарда на уровне 50% (А, В) и 90% (Б, Г) реполяризации под действием пилокарпина (10 мкМ) в нормальных условиях, а также в присутствии метоктрамина (100 нМ) и 4-DAMP (10 нМ). По оси ординат – максимальная выраженность изменений, вызванных пилокарпином, в % от значений соответствующих величин в контроле. * – статистическая эффекта, критерий Вилкоксона, $p < 0.05$. & – значимость отличия величин эффекта от соответствующего значения у взрослых крыс, критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$

(рис. 2В,Г). Напротив, в группе ТНК значимый эффект избирательной стимуляции М3-рецепторов отсутствовал (рис. 1Б, 2). Эффекты избирательной стимуляции М3-холинорецепторов практически не проявлялись на фоне селективного блокатора М3-рецепторов 4-DAMP (10 нМ), т.е. действительно были опосредованы активацией М3-рецепторов (рис. 2).

Важно отметить, что в желудочковом миокарде НК эффект стимуляции М3-рецепторов более чем в 3 раза превосходил эффект у ВК (рис. 2А,Б), в то время как в предсердном миокарде существенных различий в выраженности эффекта не наблюдалось. Таким образом, в желудочковом миокарде эффект М3-стимуляции был наиболее выражен у НК, а наименее – у ТНК. В предсердном миокарде основное различие между тремя возрастными группами наблюдалось по реакции на пилокарпин, подаваемый без блокаторов, – выраженность эффекта растет по мере увеличения возраста животного и у ВК более чем в 2 раза превосходит эффект у НК.

Согласно данным РВ-ПЦР, в миокарде животных всех возрастов синтезируется мРНК как М2-, так и М3-рецепторов, однако ген последних экспрессируется гораздо слабее (рис. 3). При этом уровень экспрессии гена М3-рецептора снижается по мере взросления животного как в предсердном, так и в желудочковом миокарде (рис. 3Б), т.е. в миокарде ТНК он выше, чем у ВК. Однако уровень экспрессии гена М2-рецептора был максимальным именно в группе ТНК. Поэтому отношение экспрессии М3 к М2 в желудочковом миокарде у ВК выше, чем у ТНК – 0.59 против 0.19%. В предсердном миокарде отношение приблизительно одинаковое – 0.16 и 0.18% соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, нами впервые получены сведения об изменении относительного вклада М3-рецепторов в регуляцию электрической активности желудочкового и предсердного миокарда крыс в постнатальном онтогенезе.

В электрофизиологических экспериментах избирательную стимуляцию М3-рецепторов вызывали ранее неоднократно применявшимся способом [4, 7], а именно, аппликацией 10 мкМ пилокарпина на фоне полной блокады М2-рецепторов 100 нМ метоктрамина. Отметим, что в нашей ранней работе повышение концентрации метоктрамина не приводило к изменению эффектов пилокарпина, а, следовательно, наблюдаемый в присутствии 100 нМ пилокарпина эффект не связан с активацией остаточных М2-рецепторов. Это подтверждается также практически полным исчезновением эффекта пилокарпина на фоне блокаторов М-рецепторов обоих типов, метоктрамина и 4-DAMP.

Электрофизиологические данные показывают, что степень воздействия стимуляции М3-рецепторов на электрическую активность желудочкового миокарда максимальна у НК. В предсердном миокарде чувствительность к пилокарпину в отсутствие блокаторов М-рецепторов увеличивается с возрастом, в то время как чувствительность к пилокарпину на фоне блокады М2-рецепторов одинакова у НК и ВК. Можно предположить, что как в предсердном, так и в желудочковом миокарде вклад М2-рецепторов в регуляцию электрической активности увеличивается с возрастом, при этом в желудочковом миокарде у НК М3-рецепторы занимают главенствующее положение.

Данные РВ-ПЦР в целом подтверждают эти предположения, поскольку показывают, что экспрессия гена М3-рецептора снижается с возрастом. Остается неясным, почему эффект стимуляции М3-рецепторов не наблюдается у ТНК. С одной стороны, это можно объяснить наименьшим отношением количества мРНК М3- к мРНК М2-рецепторов в этой возрастной группе. С другой стороны, относительный уровень трансляции белков М2- и М3-рецепторов может отличаться от уровня экспрессии мРНК соответствующих генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, результаты нашей работы позволяют предположить важную функциональную роль М3-рецепторов в желудочках новорожденных крысят, которая нивелируется у ВК. При этом функции М3-рецепторов не ограничиваются изученным нами воздействием на электрическую активность. Например, возможно участие М3-рецепторов в реализации кардиопротекторных воздействий АХ [8, 9] в условиях окислительного стресса, испытываемого организмом новорожденного. Связь изменения роли М3-рецепторов с началом симпатической регуляции

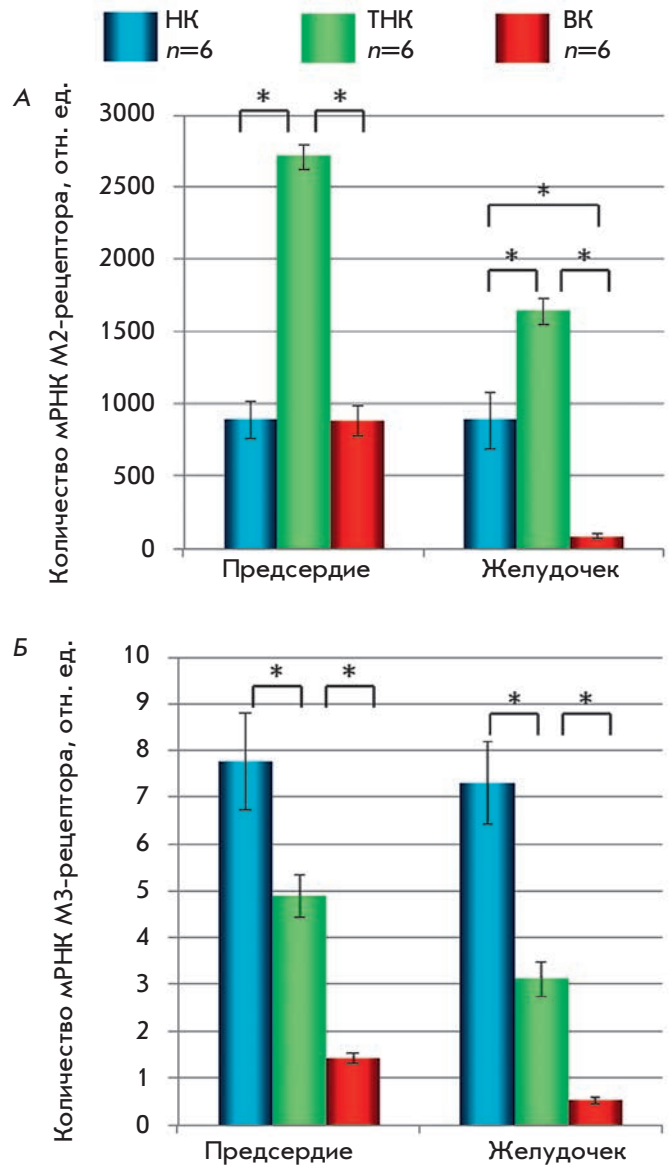


Рис. 3. Уровень экспрессии генов М2- (А) и М3-рецептора (Б) в предсердном и желудочковом миокарде НК, ТНК и ВК, выраженный в относительных единицах количества мРНК М2- и М3-рецепторов. * – статистическая значимость различий между возрастными группами, критерий Манна–Уитни, p < 0.05

миокарда представляется маловероятной, поскольку в трехнедельном возрасте перед включением симпатической регуляции эффект стимуляции М3-рецепторов уже отсутствует. ●

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-01564).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dhein S., van Koppen C.J., Brodde O. // *Pharmacol. Res.* 2001. V. 44. P. 161–182.
2. Wang H., Lu Y., Wang Z. // *Auton. Autac. Pharmacol.* 2007. V. 27. P. 1–11.
3. Shi H., Wang H., Yang B., Xu D., Wang Z. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 21. P. 21774–21778.
4. Abramochkin D.V., Tapilina S.V., Sukhova G.S., Nikolsky E.E., Nurullin L.F. // *Pflug. Arch.* 2012. V. 463. № 4. P. 523–529.
5. Shi H., Wang H., Lu Y., Yang B., Wang Z. // *J. Membrane Biol.* 1999. V. 169. P. 55–64.
6. Abramochkin D.V., Suris M.A., Borodinova A.A., Kuzmin V.S., Sukhova G.S. // *Neurochem. J.* 2008. V. 2. P. 90–94.
7. Wang H., Shi H., Lu Y., Yang B., Wang Z. // *Br. J. Pharmacol.* 1999. V. 126. P. 1725–1734.
8. Yang B., Lin H., Xu C., Liu Y., Wang H., Han H., Wang Z. // *Cell. Physiol. Biochem.* 2005. V. 16. № 4–6. P. 163–174.
9. Zhao J., Su Y., Zhang Y., Pan Z., Yang L., Chen X., Liu Y., Lu Y., Du Z., Yang B. // *Br. J. Pharmacol.* 2010. V. 159. № 6. P. 1217–1225.
10. Robinson R.B. // *Cardiovasc. Res.* 1996. V. 31. P. E68–E76.
11. Зиятдинова Н.И., Сергеева А.М., Дементьева Р.Е., Зефирова Т.Л. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2012. Т. 154. № 7. С. 4–6.
12. Тапилина С.В., Абрамочкин Д.В. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2015. Т. 159. № 1. С. 11–14.

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).

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 μM ; 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:

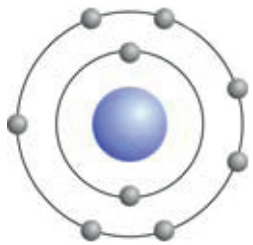
Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

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.



МОСКВА

F-2016



1906–1990

XI ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ с международным участием «ХИМИЯ ФТОРА»

посвящается 110-летию со дня
рождения академика И. Л. Кнунянца

Уважаемые коллеги!

ОРГКОМИТЕТ ПРИГЛАШАЕТ ВАС ПРИНЯТЬ УЧАСТИЕ В РАБОТЕ КОНФЕРЕНЦИИ

Конференция состоится 26–30 июня 2016 г. в Москве в Институте элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук (Россия, Москва, ул. Вавилова, 28).

ЦЕЛЬ конференции – обсуждение достижений и актуальных проблем развития химии фторсодержащих соединений, выявление приоритетных направлений исследований, развитие научных и коммерческих контактов научно-исследовательских институтов и вузов с промышленными предприятиями

НАУЧНАЯ ПРОГРАММА конференции охватывает все важнейшие аспекты и общемировые тенденции развития химии и технологии соединений фтора: *синтез и реакционная способность органических и неорганических соединений фтора; биологически активные фторсодержащие вещества для медицины и сельского хозяйства; фторполимеры; проблемы технологии и перспективы использования фторсодержащих веществ и материалов.*

Программа включает доклады ведущих ученых о последних достижениях в химии органических и неорганических соединений фтора, о результатах исследований, которые открывают путь к созданию новых технологий. Планируется проведение круглых столов с представителями промышленности и бизнес-сообщества.

Получить дополнительную информацию можно на сайте конференции <http://fluorine.moscow/>, и по телефону +7(499)135-6994

ОРГАНИЗАТОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ: ИНЭОС РАН, ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИИ И НАУК О МАТЕРИАЛАХ РАН, ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ РФ, РФФИ, АНО НИЦ ИНЭОС, ЗАО НПО «ПИМ-ИНВЕСТ»

Научный журнал
выходит 6 раз в год

Доступно для загрузки
из App Store



Теперь на iPad

Наше приложение доступно в «Кюске» AppleStore в разделе «Наука».

