

Письмо редакторов

Уважаемые читатели *Acta Naturae*!
Вашему вниманию предлагается 25-й номер нашего журнала. Журнал по-прежнему в строю и может предложить вам новые и, как мы надеемся, интересные публикации.

Номер открывают обзоры, в той или иной степени связанные с проблемами онкологии (О.В. Матвеева и др., Н.В. Крахмаль и др.). Один обзор посвящен новым мишеням для антибактериальной терапии (А.В. Гришин и др.), два – клеточной биологии (В.В. Гусельникова и др., М.А. Филатов и др.).

Тематика девяти экспериментальных статей весьма разнообразна, хотя, пожалуй, и здесь преобладает клеточная био-

логия. В этом нет ничего удивительного – клеточные культуры и клеточные модели широко используются в современных биологических исследованиях, и мы придерживаемся этого направления. Тем не менее мы стараемся поддерживать широкий профиль нашего журнала – в номере есть статьи, в которых используются биоинформатические подходы, а также работы, посвященные взаимодействию тех или иных лигандов с компонентами клетки, и биомедицинские сообщения. Журнал постепенно расширяет сферу своих интересов и приглашает к сотрудничеству.

До встречи в 26-м номере! ●

Редколлегия

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

Работает при финансовой
поддержке Министерства
образования и науки РФ



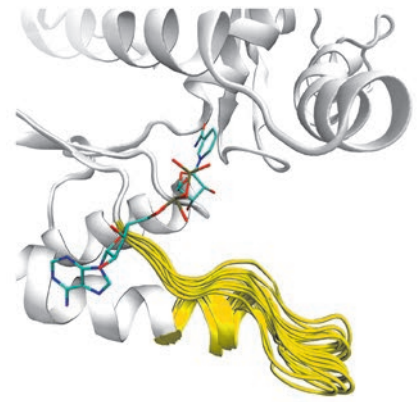
Лучшее российское интернет-СМИ
о науке, образовании, инновациях

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

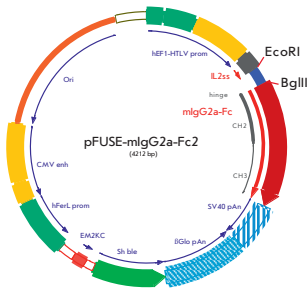
Поиск ингибиторов лактатдегидрогеназы А человека с использованием компьютерного моделирования

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

Изоформа А лактатдегидрогеназы человека (ЛДГ-А) играет важную роль в жизнеобеспечении опухолевых клеток с анаэробным метаболизмом, поэтому поиск эффективных ингибиторов фермента является перспективным направлением создания новых лекарственных препаратов. С целью выявления новых ингибиторов созданы полноатомные модели ЛДГ-А, разработаны структурные критерии отбора потенциальных ингибиторов и проведен компьютерный скрининг библиотеки низкомолекулярных соединений. Это позволило обнаружить потенциальный ингибитор STK381370.



Открытая конформация ЛДГ-А человека по данным рентгеноструктурного анализа



Карта плазмидного вектора pFUSE, содержащего ген константного фрагмента иммуноглобулина мыши

Направленная элиминация миелин-реактивных В-клеток с применением иммунотоксинов – лигандов антигенных рецепторов

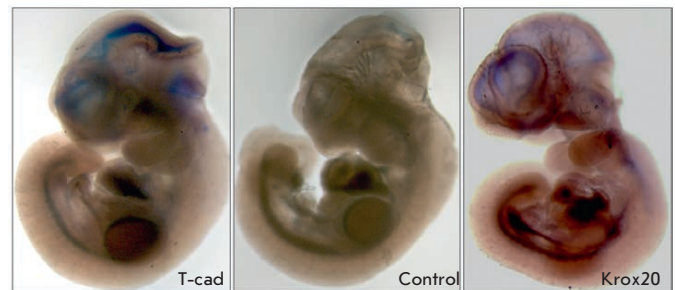
А. В. Степанов, А. А. Белогулов, Р. Kothapalli, О. Г. Шамборант, В. Д. Кнорре, Г. Б. Телегин, А. А. Овсеян, Н. А. Пономаренко, С. М. Деев, S. V. Kaveri, А. Г. Габибов

В экспериментах на животной модели рассеянного склероза – мышцах линии SJL/J с индуцированным экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЕАЕ) – было показано, что созданный рекомбинатный иммунотоксин способен направленно элиминировать популяцию патологических лимфоцитов *in vivo*. Предложенная концепция может лечь в основу дальнейшего развития препаратов для специфической терапии рассеянного склероза и ряда других аутоиммунных заболеваний.

Выявление экспрессии Т-кадгерина в эмбриогенезе у мыши

К. А. Рубина, В. А. Смутова, М. Л. Семенова, А. А. Поляков, S. Gerety, D. Wilkinson, Е. И. Суркова, Е. В. Семина, В. Ю. Сысоева, В. А. Ткачук

В представленной работе изучена экспрессия Т-кадгерина на ранних этапах развития эмбриона мыши. С использованием методов гибридизации *in situ* и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией установлено, что экспрессия Т-кадгерина в развивающемся головном мозге выявляется, начиная со стадии E8.75, а в сердце – со стадии E11.5, что указывает на возможную роль Т-кадгерина в процессах формирования сосудов в эмбриогенезе.



In situ-гибридизация эмбрионов мыши на стадии E10.5

Acta Naturae

ТОМ 7, № 2 (25), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 2015

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 (Ганнау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),
А.Л. Конов (Москва, Россия),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
К. Нирхауз (Берлин, Германия),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. 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, 2015

Номер подписан в печать 13 мая 2015 г.
Тираж 300 экз. Цена свободная.
Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

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/list/

Публикация в журнале бесплатная
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 0.872

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов..... 1

ОБЗОРЫ

О. В. Матвеева, Г. В. Кочнева, С. В. Нетесов,
С. Б. Оникиенко, П. М. Чумаков

Механизмы онколитического действия
парамиксовируса Сендай..... 6

Н. В. Крахмаль, М. В. Завьялова, Е. В. Денисов,
С. В. Вторушин, В. М. Перельмутер

Инвазия опухолевых эпителиальных клеток:
механизмы и проявления..... 18

А. В. Гришин, М. С. Кривоzubов, А. С. Карягина,
А. Л. Гинцбург

Лектины *Pseudomonas aeruginosa*
как мишени для новых антибактериальных
соединений..... 32

В. В. Гусельникова, Д. Э. Коржевский
NeuN – нейрональный ядерный антиген
и маркер дифференцировки
нервных клеток..... 46

СОДЕРЖАНИЕ

М. А. Филатов, Ю. В. Храмова, М. Л. Семёнова
**Рост и созревание фолликулов яичника
 мыши в альгинатном гидрогеле *in vitro*:
 состояние проблемы** 52

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Д. К. Нилов, Е. А. Прохорова, В. К. Швядас
**Поиск ингибиторов лактатдегидрогеназы А
 человека с использованием
 компьютерного моделирования.** 62

Ю. А. Филиппова, Г. А. Степанов, Д. В. Семенов,
 О. А. Коваль, Е. В. Кулигина, И. В. Рабинов,
 В. А. Рихтер
**Модифицированный метод анализа
 структуры рРНК позволил выявить новые
 свойства аналогов С/D-боксов-рРНК** 69

А. В. Степанов, А. А. Белогулов, Р. Kothapalli,
 О. Г. Шамборант, В. Д. Кнорре, Г. Б. Телегин,
 А. А. Овсепян, Н. А. Пономаренко, С. М. Деев,
 S. V. Kaveri, А. Г. Габибов
**Направленная элиминация миелин-реактивных
 В-клеток с применением иммунотоксинов —
 лигандов антигенных рецепторов** 79

И. Е. Деев, Н. В. Попова, А. Г. Петренко
**Влияние различных частей эктодомена
 рецептора IRR на его рН-чувствительность
 (биоинформатический подход)** 86

К. А. Рубина, В. А. Смутова, М. Л. Семенова,
 А. А. Поляков, S. Gerety, D. Wilkinson,
 Е. И. Суркова, Е. В. Семина, В. Ю. Сысоева,
 В. А. Ткачук
**Выявление экспрессии Т-кадгерина
 в эмбриогенезе у мыши** 93

Э. И. Нагаева, Н. Н. Потапьева, Д. Б. Тихонов
**Действие гидрофобных моноаминов
 на протон-активируемые
 ионные каналы ASIC1b** 102

Е. Ю. Тризна, Э. Н. Хакимуллина, Л. З. Латыпова,
 А. Р. Курбангалиева, И. С. Шарафутдинов,
 В. Г. Евтюгин, Э. В. Бабынин, М. И. Богачев,
 А. Р. Каюмов

**Ингибиторы образования биопленок
 бактериями *Bacillus subtilis* на основе
 тиопроизводных 2(5Н)-фуранона** 110

Е. В. Дубровин, Г. В. Преснова, М. Ю. Рубцова,
 А. М. Егоров, В. Г. Григоренко, И. В. Яминский
**Применение атомно-силовой микроскопии
 для 3D-анализа результатов гибридизации
 нуклеиновых кислот на микрочипах** 117

О. Е. Брызгунова, С. Н. Тамкович,
 А. В. Черепанова, С. В. Ярмошук,
 В. И. Пермякова, О. Ю. Анисеева,
 П. П. Лактионов

**Перераспределение свободных
 и связанных с форменными элементами
 циркулирующих ДНК при доброкачественных
 и злокачественных заболеваниях
 предстательной железы.** 125

Правила для авторов 129

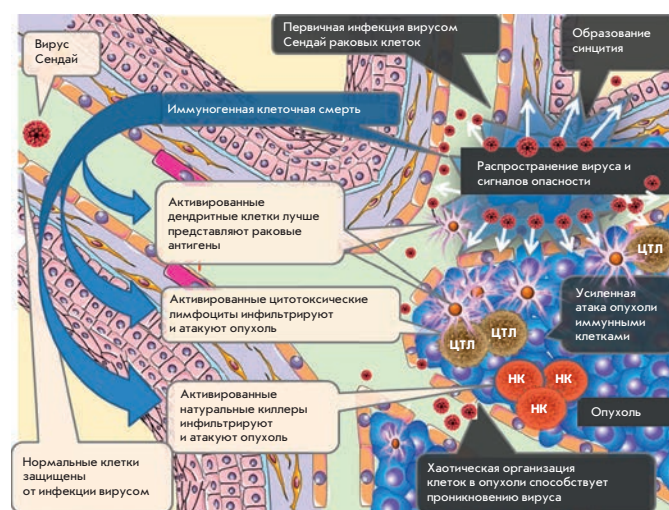


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
 (См. статью О. В. Матвеевой и др.)

УДК 571.27;61:578.7; 616:612.017.1; 616-006

Механизмы онколитического действия парамиксовируса Сендай

О. В. Матвеева^{1*}, Г. В. Кочнева², С. В. Нетесов³, С. Б. Оникиенко⁴, П. М. Чумаков⁵¹Biopolymer Design, 23, Nylander Way, Acton, Massachusetts, United States²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Россия, р.п. Кольцово Новосибирской обл.³Новосибирский государственный университет, 630090, Россия, Новосибирск, ул. Пирогова, 2⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, кафедра военно-полевой терапии, 194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Боткинская, 17⁵Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32

*E-mail: olga.matveeva@gmail.com

Поступила в редакцию 22.10.2014

После доработки 09.02.2015

РЕФЕРАТ Некоторые представители парамиксовирусов обладают онколитической активностью и могут использоваться в качестве противоопухолевых агентов. Такие парамиксовирусы включают непатогенные (аттенуированные) штаммы вирусов кори, вируса болезни Ньюкасла и вируса Сендай. Все эти вирусы и вирус Сендай, в частности, способны вызывать в большой степени специфическую гибель именно злокачественных, но не нормальных клеток. Гибель злокачественных клеток происходит за счет прямого цитолитического действия вируса, а также как следствие активации противоопухолевого иммунитета. Преимущественное взаимодействие парамиксовирусов со злокачественными клетками происходит за счет того, что эти клетки в избытке продуцируют некоторые гликопротеины, способные служить рецепторами для онколитических парамиксовирусов. Кроме того, частые генетические дефекты раковых клеток в системе интерферонового и апоптозного ответов создают благоприятные условия для репликации вируса именно в злокачественных клетках. Парамиксовирусы могут усиливать образование многоядерных клеточных конгломератов (синцитиев), что ускоряет вовлечение новых клеток в инфекционный процесс внутри опухоли и позволяет вирусу ускользать от нейтрализующего воздействия антител. Все эти факторы способствуют эффективному внутриопухолевому распространению вирусной инфекции и массовой гибели злокачественных клеток. Кроме того, онколитические парамиксовирусы способны вызывать иммуноопосредованную гибель злокачественных клеток. Они действуют как мощные индукторы интерферона и других цитокинов, стимулирующих противоопухолевую активность различных клеточных компонентов иммунного ответа, таких, как дендритные клетки, натуральные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты. Обнадёживающие результаты, полученные в различных исследованиях, проводимых с онколитическими парамиксовирусами, можно объяснить действием указанных механизмов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вакцинные штаммы вируса кори, вирус болезни Ньюкасла, вирус Сендай, онколитические парамиксовирусы, противоопухолевый механизм, противоопухолевый иммунитет, терапия рака.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВБН – вирус болезни Ньюкасла; ГКГС – главный комплекс гистосовместимости; ГН – гемагглютинин-нейраминидаза; ДК – дендритные клетки; ИФН – интерферон; ЛПКЧ – лейкоциты периферической крови человека; НА – нейраминидаза; НК – натуральные киллеры; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты; УФ – ультрафиолет.

ВВЕДЕНИЕ

Существующие методы терапии метастатического рака достаточно часто неэффективны, следовательно, необходима разработка новых противоопухолевых средств и новых методов уничтожения опухолевых клеток. Идея применения ви-

русов при злокачественных заболеваниях не нова. Ее возникновение относят к началу XX века, когда было замечено, что после вирусного заболевания или вакцинации живыми вирусами у некоторых пациентов происходит спонтанная регрессия опухоли. В 50-е годы появились первые обзорные работы, в которых

обсуждается эта проблема [1–3]. Позднее вирусы, способные специфично разрушать злокачественные клетки и оставлять невредимыми нормальные, стали называть онколитическими. Специфическое разрушение злокачественных клеток определяется избирательной репликацией вируса в этих клетках и активацией под действием вирусной инфекции противоопухолевого иммунитета.

Онколитические эффекты свойственны разнообразным вирусам, геномы которых представлены молекулами как ДНК, так и РНК. Геномная ДНК таких вирусов может быть одноцепочечной, например у парвовирусов [4], или двухцепочечной, как у онколитических аденовирусов [5] и поксвирусов [6]. Геномная РНК онколитических вирусов тоже может быть представлена разными формами: плюс-РНК-цепью у энтеровирусов [7], двумя цепями – у реовирусов [8], минус-РНК-цепью – у парамиксовирусов и рабовирусов [9].

В качестве потенциальных противоопухолевых агентов были изучены некоторые представители семейства Paramyxoviridae – ряд аттенуированных вакцинных штаммов вируса кори [10], различные непатогенные для человека вирусы животных, такие, как вирус болезни Ньюкасла [11–13] и вирус Сендай, которому посвящен этот обзор.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА СЕНДАЙ

Изучение вируса Сендай и его онколитических свойств

Противоопухолевые свойства вируса Сендай, также известного как вирус парагриппа мышей типа 1, или гемагглютинирующий японский вирус, изучают в основном на протяжении последних 10 лет. Этот парамиксовирус принадлежит к роду *Respirovirus* семейства Paramyxoviridae. На рис. 1 показано филогенетическое дерево семейства Paramyxoviridae (А), строение вириона (Б) и строение генома (В) вируса Сендай. Геном вируса Сендай представлен минус-РНК длиной 15,3 т.н. и содержит шесть генов, кодирующих белки. Из них два гена кодируют поверхностные гликопротеины HN и F, три – нуклеокапсидные белки NP, P и L, один – негликозилированный внутренний матриксный белок М. Отличительное свойство парамиксовирусов – присутствие белка F, который способствует слиянию мембран при нейтральных значениях pH. Белок F синтезируется в виде неактивного предшественника, белка F0, впоследствии расщепляемого клеточными протеазами на две субъединицы, F1 и F2, которые остаются связанными друг с другом дисульфидными мостиками [14].

За созревание вируса в природных условиях ответственна, вероятно, аргининспецифичная сериновая протеаза Клара «Clara» [15–17]. Возможность процессинга белка F0 определяет тропизм парамиксовирусов к разным типам тканей [18]. Без протеолитической активации F0 образуются только неактивные вирусные частицы-предшественники [19]. При наработке вируса Сендай в культуре клеток, которые не вырабатывают нужную для активации протеазу, этот фермент (например, трипсин) необходимо специально добавлять во внеклеточную среду.

Вирус Сендай вызывает легко передающуюся инфекцию дыхательных путей у мышей, хомяков, морских свинок, крыс и иногда у свиней [20]. Вирус Сендай способен распространяться как воздушно-капельным путем, так и при непосредственном контакте. Его можно обнаружить в колониях мышей по всему миру, но считается, что он совершенно безопасен для людей [20]. В США вирус Сендай одобрен для проведения клинических испытаний, направленных на поиск способов иммунизации против заболеваний, вызываемых вирусом парагриппа типа 1, у детей. При проведении этой работы исходили из того, что вирус Сендай и вирус парагриппа 1 вызывают индукцию перекрестно реагирующих антител. Оказалось, что интраназальное введение вируса Сендай хорошо переносится и вызывает появление антител, способных нейтрализовать вирус парагриппа 1 [21]. Эта работа важна как доказательство безопасности вируса Сендай для людей.

Ряд работ, проведенных в Японии, показал, что ослабленный генно-инженерными методами непатогенный для грызунов вирус может интенсивно распространяться в опухолевых клетках и уничтожать их, не затрагивая окружающие нормальные клетки. Такое действие вируса часто приводит к подавлению роста опухолей у мышей. Список протестированных ксенотрансплантационных моделей опухолей человека включает клетки фибросаркомы, панкреатической эпителиоидной карциномы и рака толстой кишки [22]. Применение рекомбинантного вируса Сендай приводило к существенному подавлению роста опухоли в мышечных моделях и даже полному рассасыванию сформировавшихся опухолей мозга [23]. Сходные результаты получены при ксенотрансплантации мышам клеток саркомы и рака предстательной железы человека [24, 25]. На крысиных ксенотрансплантационных моделях установлено, что рекомбинантный вирус Сендай с высокой эффективностью уничтожает меланому, гепатоцеллюлярный рак, нейробластому, плоскоклеточный рак и рак предстательной железы человека [26]. На сингенных мышках показано, что препараты вируса Сендай

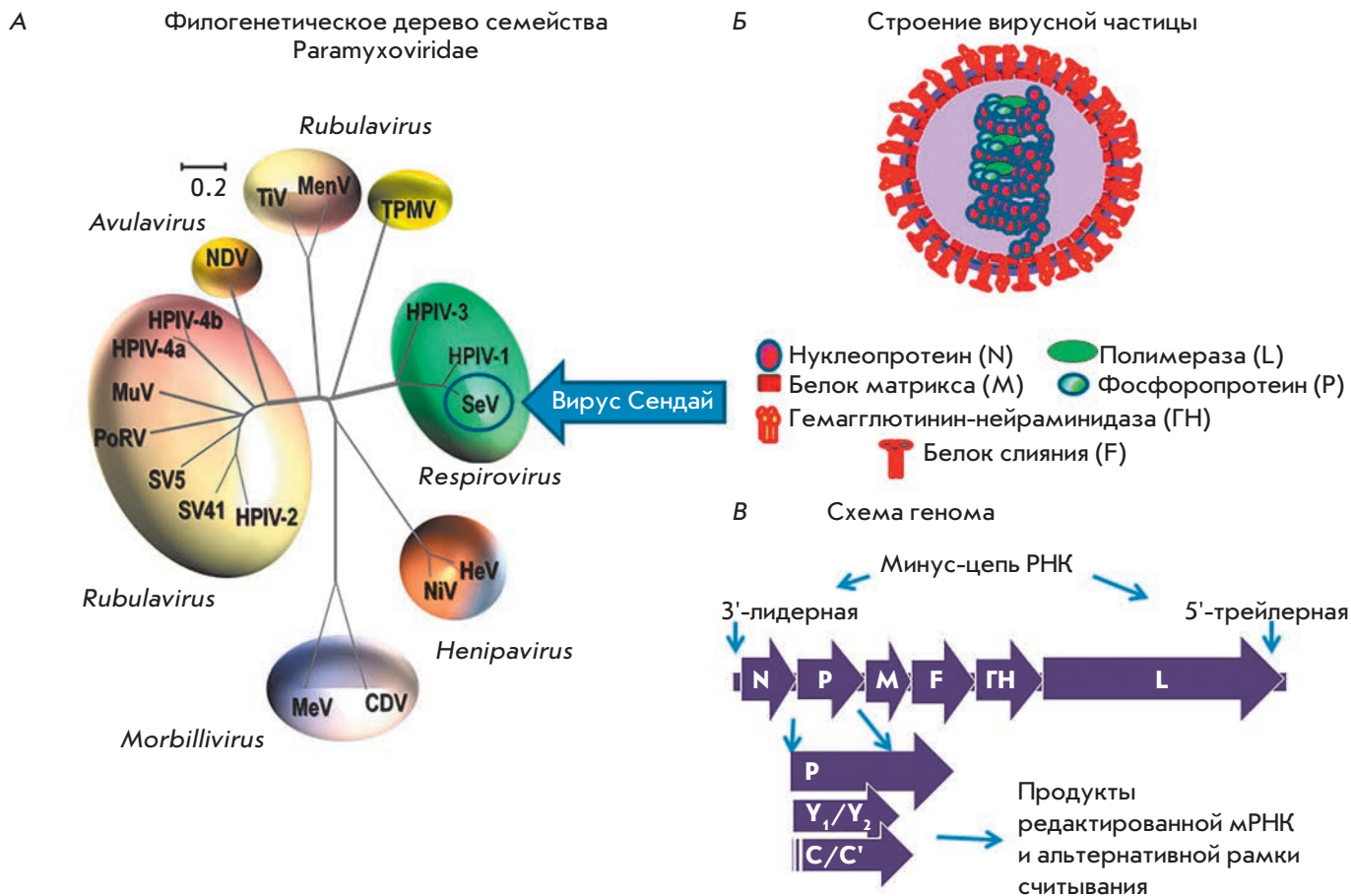


Рис. 1. Вирус Сендай: его филогенетическое дерево, схемы строения вирусной частицы и генома. А – расположение вируса Сендай на филогенетическом дереве семейства Paramyxoviridae. Дерево было построено на основе нуклеотидных последовательностей гемагглютинин-нейраминидазы с помощью множественного выравнивания программой Clustal W и метода попарного сравнительного соединения. Вирусы сгруппированы по родам и их названия сокращены следующим образом. Род *Morbillivirus*: MeV (вирус кори), CDV (вирус собачьей чумки (или чумы плотоядных)); род *Henipavirus*: HeV (вирус Хендра), NiV (вирус Нипах); род *Respirovirus*: SeV (вирус Сендай), HPIV-3 (вирус парагриппа человека типа 3), HPIV-1 (вирус парагриппа человека типа 1); род *Avulavirus*: NDV (вирус болезни Ньюкасла); род *Rubulavirus*: HPIV-2 (вирус парагриппа человека типа 2), HPIV-4a (вирус парагриппа человека типа 4a), HPIV-4b (вирус парагриппа человека типа 4b), MuV (вирус эпидемического паротита), PoRV (свиной рубуловирис), SV5 (вирус обезьян SV5), SV41 (вирус обезьян SV41); TiV (вирус Тиоман); MenV (вирус Менангле). Неклассифицированные вирусы: TPMV (парамиксовирус тупайи). Б – схема вирусной частицы; В – схема генома вируса Сендай

даже после их инактивации ультрафиолетом (УФ) эффективны против рака толстой кишки [27, 28], мочевого пузыря [29] и почки [30]. Эффективность УФ-инактивированного вируса Сендай показана также на мышинных ксенографтах рака предстательной железы человека [31]. Во всех этих исследованиях терапия с применением вируса Сендай приводила к полной регрессии опухолей или к серьезному подавлению их роста.

Кратковременная ремиссия после внутривенной инъекции живого вируса Сендай описана у больного острым лейкозом в США еще в 1964 году [32].

Изучение онколитических свойств вируса Сендай в России

В середине 50-х годов академик АМН В.М. Жданов получил из Японии штамм вируса Сендай, который в дальнейшем использовали в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского в качестве модельного. В конце 60-х годов из лаборатории В.М. Жданова этот штамм был передан В.М. Сенину (РОИЦ РАМН) и в дальнейшем прошел примерно 30 пассажей на куриных эмбрионах. Отсутствие патогенности вируса Сендай для человека делало его перспективным потенциальным терапевтическим средством, эффек-

тивным при злокачественных заболеваниях. В начале и середине 90-х под руководством В.М. Сенина этот штамм вируса Сендай испытывали в клиниках Москвы и Санкт-Петербурга на добровольцах – больных разнообразными злокачественными заболеваниями третьей и четвертой стадии. Хотя у части больных улучшение состояния было кратковременным или не наблюдалось вовсе, у другой части больных наблюдались длительные ремиссии, даже когда опухоли были признаны неоперабельными, и вирус использовали в качестве монотерапии. В этих случаях отмечено рассасывание первичных опухолей и метастазов, исчезали все объективные и субъективные признаки онкологического заболевания. Иногда признаки заболевания отсутствовали и спустя 5–10 и более лет после одного или двух курсов терапии вирусом Сендай. Краткие истории болезни этих больных приведены в тексте патента [33, 34]. В качестве побочных явлений отмечали лишь кратковременный подъем температуры в первые сутки после введения вируса.

Штамм вируса Сендай, использованный в этих испытаниях, был депонирован в Американскую коллекцию типовых культур (АТСС) под номерами РТА-13024 и РТА-121432. Препарат под номером РТА-13024 содержит вирус в замороженной аллантоисной жидкости, а препарат под номером РТА-121432 содержит вирус в лиофилизированной форме. Первичная нуклеотидная последовательность этого вирусного штамма была депонирована в базу данных GenBank под номером KP717417.1.

МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ПАРАМИКСОВИРУСОВ

Прямое уничтожение злокачественных клеток

Предпочтительная высокая аффинность парамиксовирусов в отношении злокачественных, а не нормальных клеток. Полимеры сиаловых кислот служат клеточными рецепторами для некоторых парамиксовирусов [35, 36]. Поскольку любой вирус связывается со своими рецепторами с высокой аффинностью, большое количество сиаловых кислот на поверхности опухолевых клеток способствует предпочтительной ассоциации вируса со злокачественной, а не с нормальной клеткой, что приводит к более высокой концентрации вирусов в опухолях и метастазах по сравнению с нормальными тканями. Рис. 2 иллюстрирует такое предпочтительное связывание вируса Сендай с раковыми клетками.

В настоящее время показано, что жизнеспособность клеток рака предстательной железы человека, РС3 и DU145, существенно подавляется УФ-

инактивированным вирусом Сендай. Апоптоз клеток РС3 наблюдается через 24 ч после обработки вирусом Сендай, при этом отсутствует подавление роста нормального эпителия предстательной железы [31]. Результаты этой работы, по мнению авторов, подтверждают, что чувствительность опухолевых клеток предстательной железы к вирусу Сендай в значительной степени обусловлена присутствием на поверхности этих клеток большого количества вирусных рецепторов, содержащих сиаловую кислоту, и, следовательно, его большей аффинностью к этим клеткам.

Инфицирование клеток вирусом Сендай может происходить по альтернативному пути без участия сиаловой кислоты [37]. Белок F в этом случае может прикрепляться к гепатоцитоспецифичному асиалогликопротеиновому рецептору (hepatocyte-specific asialoglycoprotein receptor, ASGR). Однако механизмы такого пути, а также их возможная взаимосвязь с онколитическим потенциалом вируса еще не изучены.

Повреждение интерфероновой и апоптозной систем клеток. Хорошо известно, что в опухолевых клетках по мере прогрессии накапливаются мутации и другие генетические изменения, способствующие повреждению интерфероновой системы [38, 39]. Кроме того, процесс малигнизации приводит к разбалансировке клеточной системы, ответственной за апоптоз [39, 40]. В результате опухолевые клетки теряют способность индуцировать синтез интерферона, приобретают невосприимчивость к вирусной инфекции и реагировать на антипролиферативное действие интерферона. Они также теряют способность переходить к апоптозу, несмотря на получаемые сигналы. Эти нарушения ведут к прогрессии опухоли и ее росту.

Те же самые нарушения, которые способствуют росту опухоли, вирусы могут использовать для собственной репликации, что приводит к более масштабной гибели злокачественных клеток по сравнению с нормальными клетками. Рис. 2 иллюстрирует различия между злокачественными и нормальными клетками, приводящие к тому, что инфекция злокачественных клеток становится более вероятной и эффективной, способной приводить к иммуногенной смерти злокачественных клеток и дальнейшему распространению вируса внутри опухоли.

Образование синцития из злокачественных клеток. Некоторые представители парамиксовирусов выработали механизм распространения инфекции, который включает слияние инфицированных и неинфицированных клеток. Такое слияние приводит к образованию синцития, представляющего собой круп-



Рис. 2. Сравнение способности злокачественных и нормальных клеток взаимодействовать с вирусом Сендай и распространять инфекцию. Раковые клетки лучше взаимодействуют с вирусом, поскольку у них часто повышен уровень экспрессии сиалосодержащих гликопротеинов, которые могут служить рецепторами для вируса Сендай. Кроме того, во время процесса малигнизации раковая клетка накапливает множество генетических изменений. В такой клетке часто нарушается интерфероновый и апоптозный ответ на различные сигналы организма, в том числе и на вирусную инфекцию. Это нарушение делает возможным заражение раковых клеток вирусом, его репликацию, производство новых инфекционных частиц и распространение вирусной инфекции внутри опухоли

ную многоядерную структуру. Инфицированные клетки могут сливаться и образовывать синцитий с 50–100 соседними клетками [41]. Инфицирование новых клеток-хозяев путем их слияния делает возможным распространение вирусной инфекции без высвобождения вируса из клеток. Следовательно, способность образовывать синцитий представляет собой одну из используемых вирусом стратегий ускользания от воздействия нейтрализующих антител хозяина, которые могли бы его инактивировать. Рис. 3 иллюстрирует образование синцития, провоцируемое вирусом Сендай. В системе *in vivo* синцитий обычно существует не более 4–5 дней, после чего погибает.

Существует предположение, что способность некоторых вирусов индуцировать образование синцития и их онколитический потенциал взаимосвязаны. В поддержку этой гипотезы свидетельствует тот факт, что с помощью генной инженерии гены, которые кодируют белки слияния, необходимые для образования синцития, можно перенести из вируса одного типа в другой. Показано, что такой перенос придает онколитический потенциал вирусам, которые до этого им не обладали [42, 43]. Этот потенциал можно дополнительно повысить с помощью аминокислотных замен, приводящих к созданию белков с увеличенной способностью вызывать слияние клеток [44, 45]. Вызывать существенную регрессию опу-

холей способны даже плазмиды [46–48], кодирующие мембранные гликопротеины со сходной функцией.

Уничтожение злокачественных клеток посредством специфического противоопухолевого иммунитета

Нейраминидаза (НА) парамиксовирусов удаляет сиаловые кислоты с поверхности злокачественных клеток. Известно, что повышенный уровень сиалирования клеточных мембран связан с процессом малигнизации: с инвазивным и метастатическим потенциалом клеток [49–54]. Установлено, что использование некоторых ингибиторов сиалирования позволяет снизить злокачественность раковых клеток [55–57].

Возможно, дополнительное сиалирование как механизм, способствующий избеганию злокачественными клетками иммунологического надзора организма хозяина, возникло путем модификации клеточной поверхности с образованием более толстой «оболочки», которая скрывает онкомаркеры. Десиалирование опухолевых клеток снижает их потенциал роста, делая их доступными для воздействия натуральных киллерных клеток (НК). Более того, обработанные сиалидазой опухолевые клетки лучше активируют секрецию интерферона- γ НК-клетками. Показано, что активность и цитотоксичность НК-клеток зависит от экспрессии сиаловых кислот, специфичных для поверхности опухолевых клеток [58].

Гемагглютинин-нейраминидаза (ГН) – это белок, способный вызывать гемагглютинацию и обладающий ферментативной активностью. Нейраминидаза (НА) – часть молекулы ГН – является ферментом (сиалидазой), который отщепляет сиаловые кислоты с поверхности клеток [35, 36]. НА кодируется и синтезируется некоторыми представителями онколитических парамиксовирусов: вирусом болезни Ньюкасла, вирусом Сендай и вирусом эпидемического паротита. НА распознает на поверхности клетки рецепторы – полимеры сиаловых кислот [36]. НА также способствует слиянию клеток, что помогает образующимся вирионам распространяться внутри ткани, избегая взаимодействия с антителами хозяина.

Удаление сиаловых кислот может приводить к существенному изменению способности клеток В-лимфомы стимулировать цитолитические Т-лимфоциты. В эксперименте с тремя различными типами сиалидаз, одна из которых НА вируса болезни Ньюкасла [59], установлено, что этот фермент может расщеплять 2,3-, 2,6- [60] и 2,8-связи между остатками сиаловой кислоты [61]. Показано также, что в системе *in vitro* отсутствуют суще-

ственные различия в специфичности по отношению к расщепляемому субстрату между вирусами болезни Ньюкасла, Сендай и эпидемического паротита [62]. Данные наблюдения позволяют предположить, что злокачественные клетки становятся десиалированными после обработки опухоли вирусом, и этот процесс вносит вклад в усиление противоопухолевого иммунного надзора. Рис. 4 иллюстрирует возможность удаления остатков сиаловой кислоты с поверхности злокачественной клетки сиалидазой вируса Сендай, что приводит к выявлению раковых антигенов, которые становятся доступными для распознавания цитотоксическими лимфоцитами.

Стимуляция продукции интерферонов (ИФН) типа I и II

В лейкоцитах периферической крови человека (ЛПКЧ) вирус Сендай действует как сильный стимулятор продукции интерферона α (ИФН- α) [63]. Вирус индуцирует секрецию по меньшей мере девяти различных видов ИФН- α : 1a, 2b, 4b, 7a, 8b, 10a, 14c, 17b и 21b. Основным среди них ИФН- α 1a, который составляет примерно 30% суммарного лейкоцитарного ИФН- α [64]. Вирус Сендай также способен стимулировать в ЛПКЧ продукцию ИФН- γ [65], поэтому он был выбран среди множества других вирусов для получения ИФН из лейкоцитов человека в промышленном масштабе [66].

УФ-инактивированный вирус Сендай может индуцировать секрецию ИФН- α и ИФН- β в некоторых линиях опухолевых клеток [31]. Инактивированный вирус индуцирует секрецию ИФН типа I дендритными клетками мыши. Эта индукция не зависит от слияния клеток, однако, по-видимому, за этот эффект отвечает белок слияния F [67].

В настоящее время известно, что стимуляция синтеза интерферонов способствует онколитическому иммунному надзору несколькими способами. Интерфероны типа I и ИФН- γ существенно повышают уровень представленности антигенов, зависящих от главного комплекса гистосовместимости типа I (ГКГС I). ИФН- γ значительно активизирует ГКГС II-зависимое представление антигенов. Оба эти процесса повышают представленность специфичных для опухоли антигенов злокачественными и специальными антигенпредставляющими клетками, что ведет к стимулированию пролиферации и активности противоопухолевых цитотоксических Т-клеток. Интерфероны также способны подавлять ангиогенез, нивелируя ангиогенные стимулы, поступающие от опухолевых клеток, и подавляя размножение эндотелиальных клеток. Это подавление коррелирует с пониженной васкуляризацией опухоли и последующим замедлением ее роста (см. обзоры [68–70]).

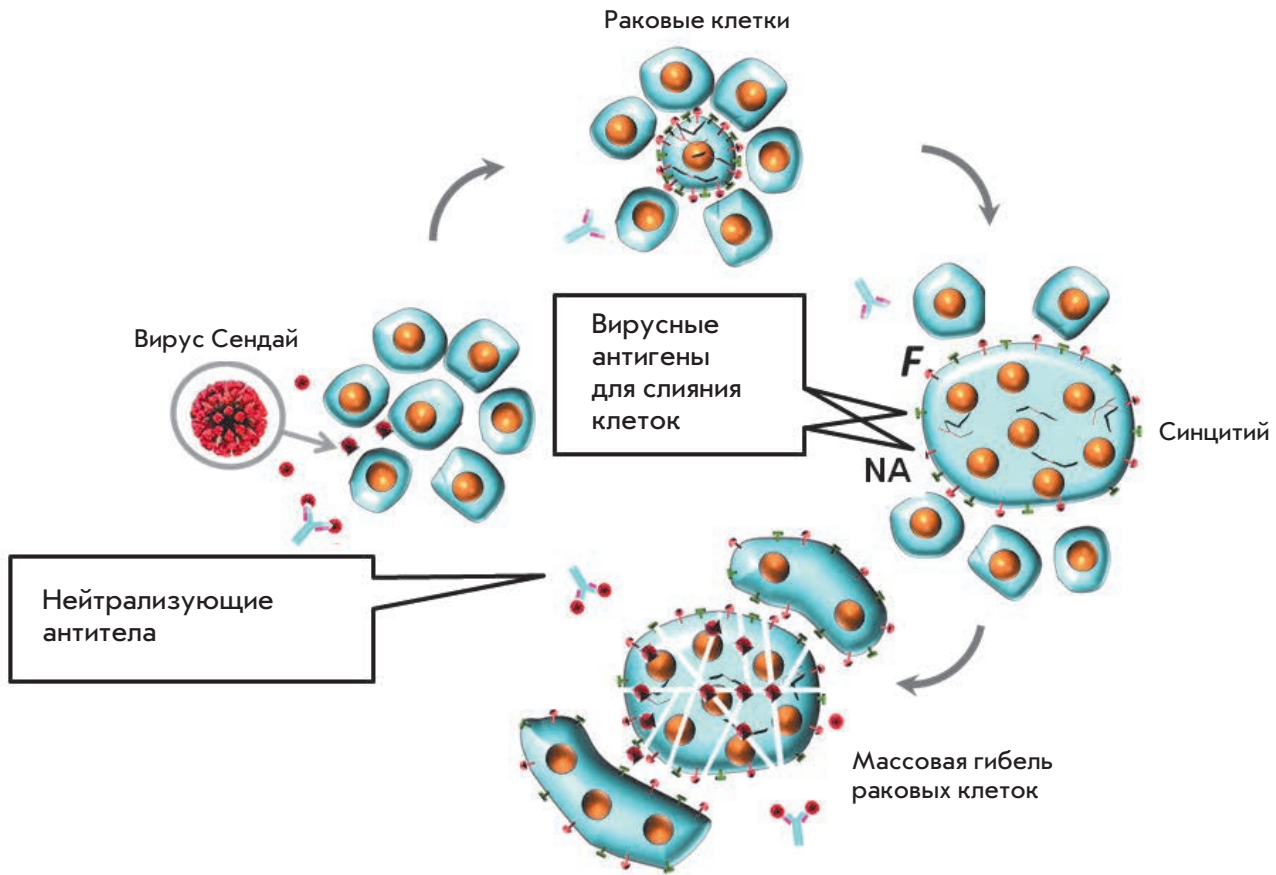


Рис. 3. Гипотеза об образовании синцития, приводящего к эффективной гибели раковых клеток в опухоли непосредственно от вирусной инфекции. У грызунов, природных хозяев вируса Сендай, инфицированные клетки экспрессируют вирусные белки слияния (F) и гемагглютинин-нейраминидазу. Белок F синтезируется в виде неактивного предшественника, белка F0, впоследствии расщепляемого клеточной протеазой на две субъединицы – F1 и F2, которые остаются связанными друг с другом дисульфидными мостиками [14]. Субъединица F1 транспортируется на клеточную поверхность и вместе с гемагглютинин-нейраминидазой катализирует слияние зараженных вирусом и окружающих незараженных клеток. При этом образуется многоядерная структура, называемая синцитий. Эта структура гибнет в течение нескольких дней после инфицирования. Образование синцития помогает распространению вирусной инфекции из зараженных клеток в незараженные при наличии нейтрализующих антител. Вирус Сендай с незрелым белком F0 не способен заражать клетки и образовывать синцитий. При заражении грызунов процессинг белка F0 происходит в бронхиолярных эпителиальных клетках, экспрессирующих протеазу Клара «Clara» [15–17]. Таким образом, эта протеаза ответственна за активацию вируса в дыхательных путях природных хозяев вируса

Парамиксовирусы стимулируют продукцию других цитокинов. Показано, что вирус Сендай способен стимулировать в ЛПКЧ продукцию интерлейкина-2 [65], макрофагальных воспалительных белков-1α и -β и многих других цитокинов [63]. Введение вируса Сендай животным показало, что как живой, так и облученный УФ вирус стимулирует секрецию интерлейкина-6 [27]. Установлено, что за стимуляцию секреции интерлейкина-6 в дендритных клетках отвечает белок слияния (F) вируса Сендай [67]. Введение УФ-инактивированного вируса Сендай

в раковую опухоль почки вызывало экспрессию хемокина CXCL10 (также известного под названием белок 10, способный индуцироваться интерфероном γ) [30].

Парамиксовирусы способны стимулировать натуральные киллеры (НК). Активированные НК способны разрушать опухолевые клетки без предварительной стимуляции антигеном. Эти клетки являются частью важной ветви врожденной иммунной системы организма, действие которой

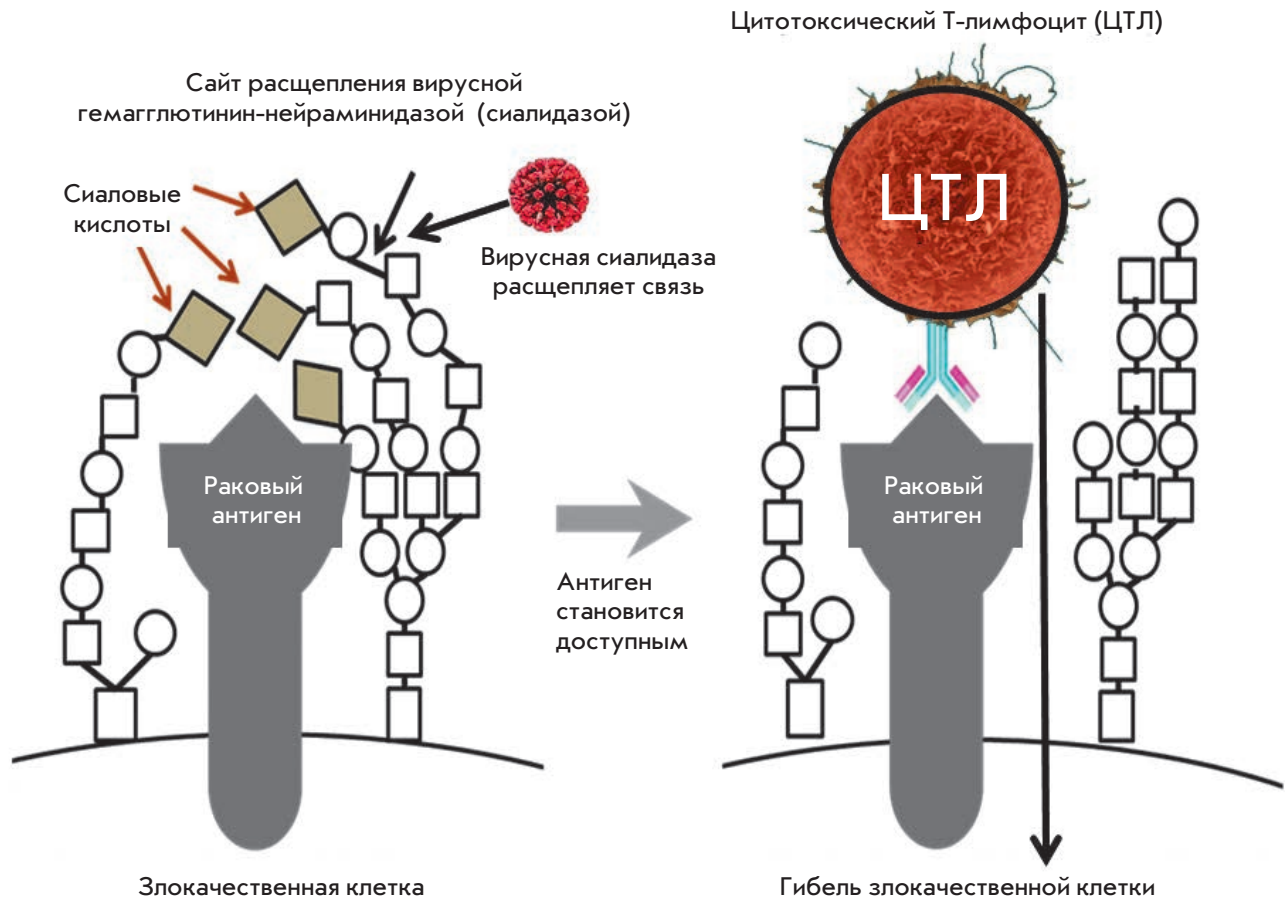


Рис. 4. Гибель злокачественной клетки за счет эффекта десалирования и стимуляции иммунного надзора. Повышенный уровень сialiрования мембран клеток связан с процессом их малигнизации: с увеличением клеточного инвазивного и метастатического потенциала. Скорее всего, дополнительное сialiрование поверхностей злокачественных клеток развилось как механизм, способствующий избеганию злокачественными клетками иммунологического надзора организма-хозяина путем модификации клеточной поверхности и образования «толстой шубы» из полимеров сиаловых кислот, которая скрывает онкомаркеры (антигены). Десалирование снижает потенциал роста опухолевых клеток, делая их более доступными для натуральных клеток-киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Более того, обработанные сиалидазой опухолевые клетки лучше активируют секрецию интерферона- γ киллерными клетками. Показано, что активность и цитотоксичность киллерных клеток зависят от экспрессии сиаловых кислот, специфичных для поверхности опухолевых клеток. Экспериментальные данные указывают на то, что злокачественные клетки становятся десалированными после обработки опухоли парамиксовирусом, и этот процесс вносит вклад в усиление противоопухолевого иммунного надзора

запускается сразу после обнаружения патогена и не включает развития иммунологической памяти на антиген. За активацию НК отвечают несколько рецепторов, в том числе два белка, названных белками натуральных киллеров – 46 (НКр46) и 44 (НКр44). Получено экспериментальное свидетельство того, что НК активируются всего одним белком парамиксовирусов, а именно ГН [71]. Предполагается, что активация НК УФ-инактивированным вирусом Сендай [30] связана с взаимодействием белка ГН с рецепторами НКр46

и/или НКр44. Эффективное связывание белка ГН с рецепторами НКр46 и/или НКр44 приводит к лизису клетки, имеющей на своей поверхности белок ГН или его фрагменты [72–74].

Изучение УФ-инактивированного вируса Сендай показало, что НК играют важную роль в опосредованной вирусом регрессии роста опухоли. В мышинной модели рака почки противоопухолевое действие вируса снижалось при его совместной инъекции с антителом против ганглиозида GM1, которое снижает количество НК-клеток [30].

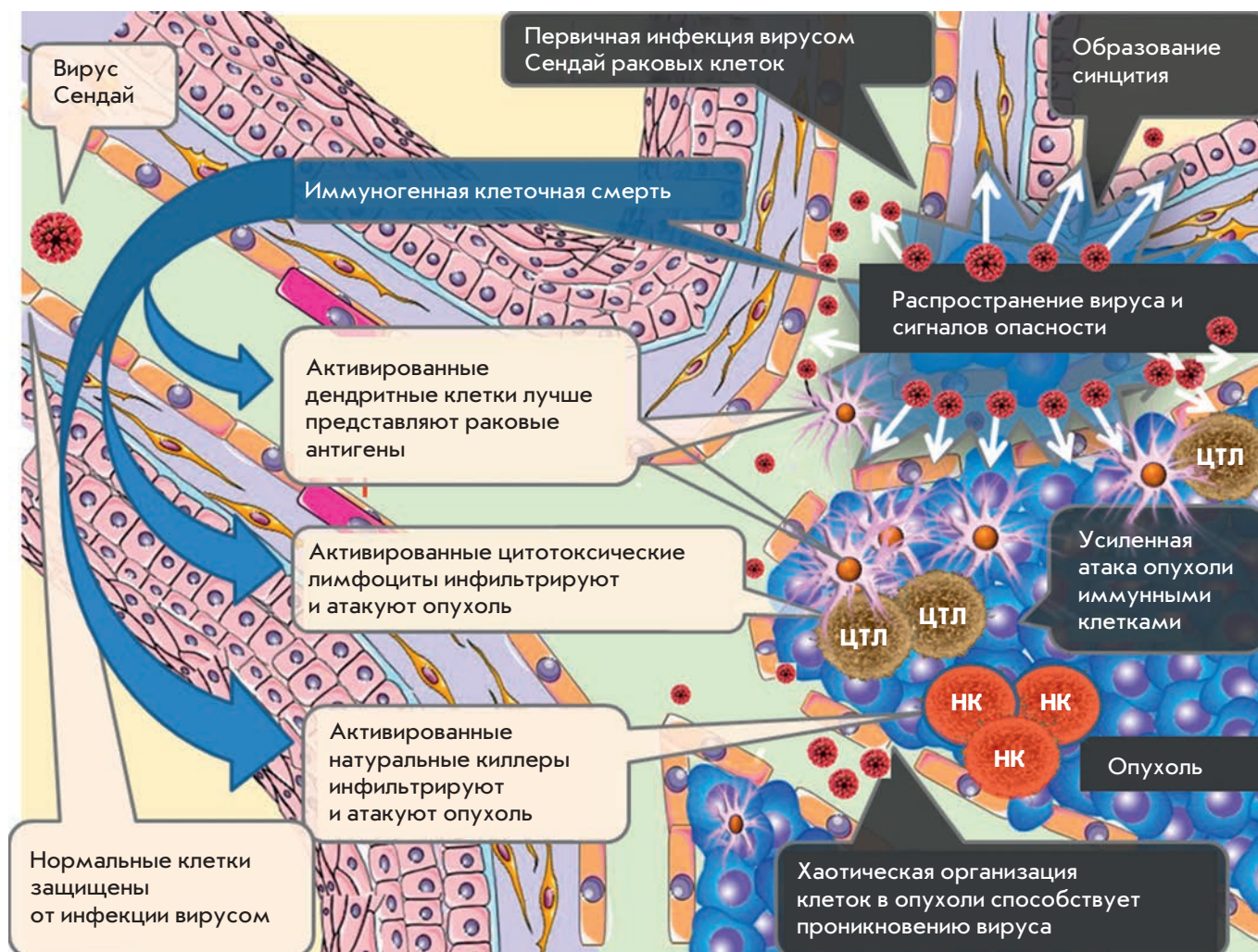


Рис. 5. Иммуноопосредованная гибель злокачественных клеток. Архитектура нормальных тканей – кровеносных сосудов, базальных мембран, структура межклеточных контактов и т.д., защищает клетки от проникновения вируса. Кроме того, нормальные клетки способны обеспечить защиту от вируса путем секреции интерферонов. В то же время раковые клетки, у которых система интерферонного ответа, как правило, нарушена, гораздо более доступны для вируса. Доступности дополнительно способствует хаотичная организация клеток внутри опухоли. Вирус Сендай способен вызывать образование синцития и массовую иммуногенную гибель опухолевых клеток. Подобная гибель приводит к распространению сигналов опасности, активации нативного и приобретенного противоопухолевого иммунного ответа. Антигенпредставляющие дендритные клетки активируются и мигрируют в опухоль, как и цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ), натуральные киллерные клетки (НК) и другие иммунные клетки. Все эти клетки обеспечивают иммуноопосредованную гибель злокачественных клеток, которая происходит наряду с гибелью злокачественных клеток от вирусной инфекции

Индукция противоопухолевой цитотоксической активности Т-лимфоцитов. Показано, что вирус болезни Ньюкасла (ВБН) усиливает опухолеспецифический цитотоксический ответ CD8 Т-клеток (ЦТЛ) и повышает активность Т-хелперных клеток CD4 в отсутствие противовирусного ответа Т-клеток [73]. УФ-инактивированный вирус, который не способен реплицироваться, так же активно стимулирует противоопухолевый ЦТЛ-ответ, как и интактный,

способный к репликации ВБН. По-видимому, влияние ВБН на ЦТЛ-ответ вызвано внедрением функциональных молекул вирусного белка ГН в мембраны опухолевых клеток, а также стимуляцией нейраминидазной активности [73] (рис. 4). Так как белки ГН вирусов Сендай и ВБН обладают высокой степенью гомологии, эти данные позволяют предположить, что белок ГН, независимо от его происхождения (вирус Сендай, ВБН или другие родственные парамик-

совирусы), активирует как НК, так и ответы, связанные с цитотоксическими лимфоцитами.

Стимуляция дендритных клеток. Дендритные клетки (ДК) – специализированные антигенпредставляющие клетки, способные эффективно усиливать как врожденный, так и приобретенный иммунный ответ против различных патогенов и опухолей. После обнаружения вируса или иного патогена в ДК запускается специальная программа дифференцировки, в результате чего они становятся способными активировать наивные Т-клетки.

Отметим, что даже УФ-инактивированный вирус Сендай вызывает интенсивную инфильтрацию опухоли дендритными клетками [27], при этом *ex vivo* инфекция ДК рекомбинантным вирусом Сендай индуцирует созревание и активацию ДК всего за 1 ч [74]. Введение активированных ДК, несущих различные варианты рекомбинантных вирусов Сендай, существенно повышает выживание животных, привитых клетками злокачественной меланомы [75, 76], рака толстой кишки [77], плоскоклеточного рака [78], рака печени, нейробластомы и рака предстательной железы [26]. Применение таких ДК перед подсадкой опухолевых клеток показало, что они способны эффективно предотвращать образование метастазов нейробластомы и аденокарциномы предстательной железы в легкие [79, 80]. Многие процессы, которые приводят к активации противоопухолевого иммунитета вирусом Сендай, представлены на рис. 5.

Подавление регуляторных клеток. Эксперименты на животных моделях показали, что некоторые штаммы вируса Сендай даже после УФ-инактивации способны подавлять опосредованную Т-клетками регуляторную иммуносупрессию посредством секреции интерлейкина-6 зрелыми ДК [27].

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клинические испытания вируса Сендай несомненно представляют интерес. В настоящий момент в Японии проходит первая фаза испытаний эффективности УФ-облученного вируса на больных меланомой [81]. Планируется улучшить системную доставку инактивированного вируса в опухоль и метастазы, связав его предварительно с тромбоцитами крови. Подобный подход был проверен на животных. Оказалось, что связывание с тромбоцитами значительно улучшает доставку вируса, вызывая подавление роста опухолей на мышинных моделях меланомы [82].

В Германии изучают модифицированный вирус Сендай с измененными методами генной инженерии спектром активирующих его протеаз [83]. Эксперименты на животных показали, что такой ви-

рус может легче активироваться в злокачественных клетках.

Интерес представляет также изучение других онколитических вирусов, совместное применение которых с вирусом Сендай будет оказывать положительный синергический терапевтический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящее время известен целый ряд механизмов, посредством которых может реализоваться онколитическое действие парамиксовирусов и, в частности, вируса Сендай. Степень онколитического действия и выбор механизма могут зависеть от ряда факторов. Парамиксовирусы могут непосредственно убивать злокачественные клетки, размножаясь в них и вызывая образование клеточного синцития. Клетки, слившиеся в синцитий, более не могут делиться и обречены на коллективную синхронную гибель. Кроме того, парамиксовирусы вызывают опосредованное иммунной системой уничтожение злокачественных клеток, происходящее за счет сильной противоопухолевой активации натуральных киллеров, а также благодаря усилению противоопухолевой цитотоксической активности Т-клеток, стимуляции антигенпредставляющих дендритных клеток и подавлению иммуносупрессорной активности Т-клеток. Содержащаяся в капсидной оболочке парамиксовирусов нейраминидаза способна отщеплять сиаловые кислоты с поверхности злокачественных клеток, демаскируя присутствующие на клеточной мембране опухолевые антигены. При этом раковые клетки становятся более заметными для иммунной системы. Кроме того, вирусная нейраминидаза может обеспечивать большое специфическое сродство вируса к полимерам сиаловых кислот, представленным в избытке на мембранах раковых клеток. За счет этого увеличивается специфичность вируса в отношении клеток первичных опухолей и метастазов, но не нормальных клеток. Возможно, эти механизмы обуславливают противоопухолевую активность вируса Сендай, обнаруженную на животных и людях. Таким образом, имеются объективные предпосылки к активной дальнейшей разработке противоопухолевых препаратов на основе парамиксовирусов и, в частности, на основе вируса Сендай. ●

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки (RFMEFI60714X0014), а также РФФ (грант № 14-15-01073).

Авторы благодарны С.А. Шабалиной (Национальный институт здоровья США) за построение филогенетического дерева парамиксовирусов, приведенного на рис. 1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Svejda J. // *Lek. List.* 1950. V. 5. P. 688–689.
2. Arnesen K. // *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1951. V. 71. P. 232–235.
3. Higgins G.K., Pack G.T. // *Bull. Hosp. Joint Dis.* 1951. V. 12. P. 379–382.
4. Локтев В.Б., Иванькина Т.Ю., Нетесов С.В., Чумаков П.М. // *Вестник РАМН.* 2012. С. 42–47.
5. Святченко В.А., Тарасова М.В., Нетесов С.В., Чумаков П.М. // *Молекуляр. биология.* 2012. Т. 46. С. 556–569.
6. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Юдина К.В., Бабкин И.В., Чумаков П.М., Нетесов С.В. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.* 2012. № 1. С. 8–15.
7. Чумаков П.М., Морозова В.В., Бабкин И.В., Байков И.К., Нетесов С.В., Тикунова Н.В. // *Молекуляр. биология.* 2012. Т. 46. С. 712–725.
8. Kim M., Chung Y.H., Johnston R.N. // *J. Microbiol. (Seoul, Korea).* 2007. V. 45. P. 187–192.
9. Lech P.J., Russell S.J. // *Expert Rev. Vaccines.* 2010. V. 9. P. 1275–1302.
10. Russell S.J., Peng K.W. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009. V. 330. P. 213–241.
11. Schirrmacher V., Fournier P. // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 542. P. 565–605.
12. Кешелава В.В., Добровольская Н.Ю., Чазова Н.Л., Берщанская А.М., Подольская М.В., Гармарник Т.В., Мельникова Н.В. // *Вопросы онкологии.* 2009. Т. 55. С. 433–435.
13. Fournier P., Schirrmacher V. // *Biology.* 2013. V. 2. P. 936–975.
14. Iwata S., Schmidt A.C., Titani K., Suzuki M., Kido H., Gotoh B., Hamaguchi M., Nagai Y. // *J. Virol.* 1994. V. 68. P. 3200–3206.
15. Tashiro M., Yokogoshi Y., Tobita K., Seto J.T., Rott R., Kido H. // *J. Virol.* 1992. V. 66. P. 7211–7216.
16. Sakai K., Kohri T., Tashiro M., Kishino Y., Kido H. // *Europ. Resp. J.* 1994. V. 7. P. 686–692.
17. Sakai K., Kawaguchi Y., Kishino Y., Kido H. // *J. Histochem. Cytochem. Official J. Histochem. Soc.* 1993. V. 41. P. 89–93.
18. Nagai Y. // *Microbiol. Immunol.* 1995. V. 39. P. 1–9.
19. Scheid A., Choppin P.W. // *Virology.* 1974. V. 57. P. 475–490.
20. *Infectious diseases of mice and rats.* Washington, DC: Nat. Acad. Press, 1991.
21. Slobod K.S., Shenep J.L., Lujan-Zilbermann J., Allison K., Brown B., Scroggs R.A., Portner A., Coleclough C., Hurwitz J.L. // *Vaccine.* 2004. V. 22. P. 3182–3186.
22. Kinoh H., Inoue M., Washizawa K., Yamamoto T., Fujikawa S., Tokusumi Y., Iida A., Nagai Y., Hasegawa M. // *Gene Ther.* 2004. V. 11. P. 1137–1145.
23. Iwadata Y., Inoue M., Saegusa T., Tokusumi Y., Kinoh H., Hasegawa M., Tagawa M., Yamaura A., Shimada H. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 3821–3827.
24. Kinoh H., Inoue M. // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 2327–2334.
25. Tatsuta K., Tanaka S., Tajiri T., Shibata S., Komaru A., Ueda Y., Inoue M., Hasegawa M., Suita S., Sueishi K., Taguchi T., Yonemitsu Y. // *Gene Ther.* 2009. V. 16. P. 240–251.
26. Yonemitsu Y., Ueda Y., Kinoh H., Hasegawa M. // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 1892–1898.
27. Kurooka M., Kaneda Y. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 227–236.
28. Kawano H., Komaba S., Kanamori T., Kaneda Y. // *BMC Med.* 2007. V. 5. P. 28.
29. Kawano H., Komaba S., Yamasaki T., Maeda M., Kimura Y., Maeda A., Kaneda Y. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008. V. 61. P. 973–978.
30. Fujihara A., Kurooka M., Miki T., Kaneda Y. // *Cancer Immunol. Immunotherapy: CII.* 2008. V. 57. P. 73–84.
31. Kawaguchi Y., Miyamoto Y., Inoue T., Kaneda Y. // *Int. J. Cancer.* 2009. V. 124. P. 2478–2487.
32. Wheelock E.F., Dingle J.H. // *N. Engl. J. Med.* 1964. V. 271. P. 645–651.
33. Сенин В., Сенина А., Матвеева О. // *Патент РФ RU2519763.* 2014.
34. Senin V., Senina A., Matveeva O. // *Patent application PCT/RU2013/001043, WO2014081346 A3.* 2014.
35. Lamb R.A., Parks G.D. // *Fields Virology / Eds Knipe D.M., Howley P.M. Lippincott. Philadelphia: Williams & Wilkins,* 2007. P. 1449–1496.
36. Bossart K.N., Fusco D.L., Broder C.C. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013. V. 790. P. 95–127.
37. Bitzer W., Lauer U., Baumann C., Spiegel M., Gregor M., Neubert W.J. // *J. Virol.* 1997. V. 71. P. 5481–5486.
38. Chawla-Sarkar M., Lindner D.J., Liu Y.F., Williams B.R., Sen G.C., Silverman R.H., Borden E.C. // *Apoptosis: Internat. J. Programmed Cell Death.* 2003. V. 8. P. 237–249.
39. Kotredes K.P., Gamero A.M. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2013. V. 33. P. 162–170.
40. Iqney F.H., Krammer P.H. // *Nat. Rev. Cancer.* 2002. V. 2. P. 277–288.
41. Rawling J., Cano O., Garcin D., Kolakofsky D., Melero J.A. // *J. Virol.* 2011. V. 85. P. 2771–2780.
42. Ebert O., Shinozaki K., Kournioti C., Park M.S., Garcia-Sastre A., Woo S.L. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 3265–3270.
43. Nakamori M., Fu X., Meng F., Jin A., Tao L., Bast R.C., Jr., Zhang X. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 2727–2733.
44. Gainey M.D., Manuse M.J., Parks G.D. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 9369–9380.
45. Altomonte J., Marozin S., Schmid R.M., Ebert O. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. P. 275–284.
46. Bateman A., Bullough F., Murphy S., Emiliusen L., Lavillette D., Cosset F.L., Cattaneo R., Russell S.J., Vile R.G. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 1492–1497.
47. Galanis E., Bateman A., Johnson K., Diaz R.M., James C.D., Vile R., Russell S.J. // *Hum. Gene Ther.* 2001. V. 12. P. 811–821.
48. Lin E.H., Salon C., Brambilla E., Lavillette D., Szecsi J., Cosset F.L., Coll J.L. // *Cancer Gene Ther.* 2010. V. 17. P. 256–265.
49. Pearlstein E., Salk P.L., Yogeewaran G., Karpatkin S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. P. 4336–4339.
50. Yogeewaran G., Salk P.L. // *Science.* 1981. V. 212. P. 1514–1516.
51. Benedetto A., Elia G., Sala A., Belardelli F. // *Int. J. Cancer.* 1989. V. 43. P. 126–133.
52. Collard J.G., Schijven J.F., Bikker A., La Riviere G., Bolscher J.G., Roos E. // *Cancer Res.* 1986. V. 46. P. 3521–3527.
53. Passaniti A., Hart G.W. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 7591–7603.
54. Bresalier R.S., Rockwell R.W., Dahiya R., Duh Q.Y., Kim Y.S. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. P. 1299–1307.
55. Hsu C.C., Lin T.W., Chang W.W., Wu C.Y., Lo W.H., Wang P.H., Tsai Y.C. // *Gynecol. Oncol.* 2005. V. 96. P. 415–422.
56. Chang W.W., Yu C.Y., Lin T.W., Wang P.H., Tsai Y.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 341. P. 614–619.
57. Chiang C.H., Wang C.H., Chang H.C., More S.V., Li W.S., Hung W.C. // *J. Cell. Physiol.* 2010. V. 223. P. 492–499.
58. Cohen M., Elkabets M., Perlmutter M., Porgador A., Voronov E., Apte R.N., Lichtenstein R.G. // *J. Immunol.* 2010. V. 185. P. 5869–5878.
59. Powell L.D., Whiteheart S.W., Hart G.W. // *J. Immunol.* 1987. V. 139. P. 262–270.

60. Tyagarajan K., Forte J.G., Townsend R.R. // *Glycobiology*. 1996. V. 6. P. 83–93.
61. Drzeniek R., Gauhe A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970. V. 38. P. 651–656.
62. Brostrom M.A., Bruening G., Bankowski R.A. // *Virology*. 1971. V. 46. P. 856–865.
63. Hua J., Liao M.J., Rashidbaigi A. // *J. Leukoc. Biol.* 1996. V. 60. P. 125–128.
64. Nyman T.A., Tolo H., Parkkinen J., Kalkkinen N. // *Biochem. J.* 1998. V. 329. P. 295–302.
65. Costas M.A., Mella D., Criscuolo M., Diaz A., Finkielman S., Nahmod V.E., Arzt E. // *J. Interferon Res.* 1993. V. 13. P. 407–412.
66. Cantell K., Hirvonen S., Kauppinen H.L., Myllyla G. // *Methods Enzymol.* 1981. V. 78. P. 29–38.
67. Suzuki H., Kurooka M., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y., Kaneda Y. // *FEBS Lett.* 2008. V. 582. P. 1325–1329.
68. Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002. V. 13. P. 95–109.
69. Dunn G.P., Bruce A.T., Sheehan K.C., Shankaran V., Uppaluri R., Bui J.D., Diamond M.S., Koebel C.M., Arthur C., White J.M., Schreiber R.D. // *Nat. Immunol.* 2005. V. 6. P. 722–729.
70. Borden E.C., Sen G.C., Uze G., Silverman R.H., Ransohoff R.M., Foster G.R., Stark G.R. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007. V. 6. P. 975–990.
71. Jarahian M., Watzl C., Fournier P., Arnold A., Djandji D., Zahedi S., Cerwenka A., Paschen A., Schirmmacher V., Momburg F. // *J. Virol.* 2009. V. 83. P. 8108–8121.
72. Arnon T.I., Lev M., Katz G., Chernobrov Y., Porgador A., Mandelboim O. // *Eur. J. Immunol.* 2001. V. 31. P. 2680–2689.
73. Schirmmacher V., Haas C., Bonifer R., Ertel C. // *Clin. Cancer Res.* 1997. V. 3. P. 1135–1148.
74. Harada Y., Yonemitsu Y. // *Front. Biosci.* 2011. V. 16. P. 2233–2242.
75. Shibata S., Okano S., Yonemitsu Y., Onimaru M., Sata S., Nagata-Takeshita H., Inoue M., Zhu T., Hasegawa M., Moroi Y., Furue M., Sueishi K. // *J. Immunol.* 2006. V. 177. P. 3564–3576.
76. Okano S., Yonemitsu Y., Shirabe K., Kakeji Y., Maehara Y., Harada M., Yoshikai Y., Inoue M., Hasegawa M., Sueishi K. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. P. 1828–1839.
77. Sugiyama M., Kakeji Y., Tsujitani S., Harada Y., Onimaru M., Yoshida K., Tanaka S., Emi Y., Morita M., Morodomi Y., et al. // *Mol. Cancer Ther.* 2011. V. 10. P. 540–549.
78. Yoneyama Y., Ueda Y., Akutsu Y., Matsunaga A., Shimada H., Kato T., Kubota-Akizawa M., Okano S., Shibata S., Sueishi K., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 355. P. 129–135.
79. Komaru A., Ueda Y., Furuya A., Tanaka S., Yoshida K., Kato T., Kinoh H., Harada Y., Suzuki H., Inoue M., et al. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. P. 4211–4219.
80. Kato T., Ueda Y., Kinoh H., Yoneyama Y., Matsunaga A., Komaru A., Harada Y., Suzuki H., Komiya A., Shibata S., et al. // *Neoplasia*. 2010. V. 12. P. 906–914.
81. Tanemura A., Kiyohara E., Katayama I., Kaneda Y. // *Cancer Gene Ther.* 2013. V. 20. P. 599–605.
82. Nishikawa T., Tung L.Y., Kaneda Y. // *Mol. Ther.* 2014. V. 22. № 12. P. 2046–2055.
83. Zimmermann M., Armeanu-Ebinger S., Bossow S., Lampe J., Smirnow I., Schenk A., Lange S., Weiss T.S., Neubert W., Lauer U.M., Bitzer M. // *PLoS One*. 2014. V. 9. e90508.

УДК 576.32/.36:616-006.6-018

Инвазия опухолевых эпителиальных клеток: механизмы и проявления

Н. В. Крахмаль¹, М. В. Завьялова^{1,2,3}, Е. В. Денисов^{2,3*}, С. В. Вторушин^{1,2}, В. М. Перельмутер^{1,2}¹Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Томск, Московский тракт, 2²Томский научно-исследовательский институт онкологии, 634050, Томск, Кооперативный пер., 5³Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 36

*E-mail: d_evgeniy@oncology.tomsk.ru

Поступила в редакцию 20.09.2014

После доработки 27.02.2015

РЕФЕРАТ Изучение инвазивных свойств опухолевой ткани, способности злокачественно измененных клеток к направленному движению и формированию вторичных метастатических очагов в отдаленных органах и тканях остается актуальным на протяжении многих лет. Многочисленные исследования подтверждают существование в рамках инвазивного роста двух основных моделей клеточной миграции, посредством которых опухолевые клетки преодолевают структурные барьеры и распространяются в окружающие ткани. Среди них выделяют коллективную (групповую) и индивидуальную миграции. Каждому варианту клеточного движения свойственны определенные морфологические характеристики, а также биохимические и молекулярно-генетические особенности тех механизмов, которые лежат в их основе. В пределах каждого варианта клеточного движения обнаружены опухолевые клетки, осуществляющие миграцию двумя различными способами – мезенхимальным (фибробластоподобным) и амебоидным. В представленном обзоре рассмотрены ключевые параметры, определяющие различия между разновидностями инвазивного роста, описана роль эпителиально-мезенхимального, коллективно-амебоидного, мезенхимально-амебоидного и амебоидно-мезенхимального переходов в процессе инвазии, а также значение различных опухолевых факторов и молекул микроокружения. Рассмотрена взаимосвязь опухолевой инвазии, опухолевой прогрессии и эффективности терапии злокачественных новообразований. Представлены убедительные доказательства того, что проявления инвазии характеризуются большим разнообразием тканевых структур. Приведены полученные нами результаты изучения особенностей течения рака молочной железы в зависимости от внутриопухолевой морфологической гетерогенности новообразования, представляющей, вероятно, частное проявление разнообразия инвазивного роста опухоли и обусловленной специфической активностью молекул межклеточной адгезии в опухолевых клетках различных морфологических структур.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА инвазия, индивидуальная миграция, клеточная миграция, коллективная миграция, опухоль.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход.

ИНВАЗИВНЫЙ РОСТ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ В ПРОЯВЛЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ КАРЦИНОМ

Результаты многочисленных экспериментально-клинических исследований злокачественных новообразований позволяют считать инвазивный рост и метастазирование главными проявлениями опухолевой прогрессии, представляющими два тесно связанных процесса.

Злокачественную опухоль характеризует возможность реализации такого биологического феномена, как метастатический каскад – уникальной много-

ступенчатой «программы», в которой клеточная инвазия является пусковым ключом и основополагающим фактором для дальнейшего прогрессирования рака и образования метастазов в отдаленных органах и тканях. Массивное метастатическое поражение приводит к развитию тяжелой органной недостаточности и соответственно к смерти пациента [1–3]. Между «крайними» точками сложного инвазивно-метастатического процесса – инвазией первичной опухоли в окружающие ткани и формированием метастатических фокусов – существует несколько

этапов, прохождение которых строго обязательно для успешного развития и последующей прогрессии опухолевого роста: интравасация, выживание и циркуляция в системном кровотоке, экстравазация с последующей колонизацией органов опухолевыми клетками и формирование определяемого клинически метастаза [1, 4–6]. Рост злокачественной опухоли сопровождается увеличением давления на структуры внеклеточного матрикса, при этом тканевое микроокружение стремится сохранить свою функционально-анатомическую целостность, повышая давление на опухолевые клетки. Среди факторов, ограничивающих рост злокачественного новообразования, выделяют базальную мембрану и различные компоненты окружающей стромы, повышенное интерстициальное давление, ограничение поступления к опухолевым клеткам кислорода и образование его активных форм, возникновение условий гипоксии, постоянное воздействие клеток иммунной системы. Учитывая гетерогенность строения опухоли, в условиях выживания часть опухолевых клеток может подвергаться регрессии и гибели, в то время как другие клетки, сопротивляясь мощным противодействующим факторам микроокружения, приобретают агрессивный фенотип и способность к метастатической прогрессии [7]. Инвазивный рост опухоли становится возможным в результате того, что злокачественно измененные клетки отделяются от опухолевого массива по причине снижения или полной потери молекул межклеточной адгезии и, как следствие, приобретают способность к аномально высокой подвижности, позволяющей преодолевать жесткие структурные элементы окружающей стромы [8]. При этом в процесс инвазии активно включаются различные молекулярные и клеточные механизмы, которые, согласно опубликованным данным, зависят непосредственно от другого биологического феномена – эпителиально-мезенхимальной трансформации, описанной впервые в 1995 году E.D. Nau. Впоследствии для уточнения обратимости данного процесса стали использовать термин «эпителиально-мезенхимальный переход» (ЭМП) [9]. В настоящее время известно, что ЭМП лежит в основе процессов эмбриогенеза, воспаления и регенерации тканей и, несомненно, играет ключевую роль в механизмах канцерогенеза [10, 11].

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОТОТИПЫ ИНВАЗИВНОГО РОСТА

Известно, что опухолевые клетки, распространяясь в окружающие ткани и отдаленные органы, воспроизводят механизмы и типы миграции, свойственные нормальным, неопухолевым клеткам при протекании физиологических процессов. Клетки опухоли,

как и нормальные клетки, способны активировать эти механизмы для изменения своей формы, создания условий для перемещения, а также ремоделирования окружающих тканей с целью формирования путей, по которым происходит миграция. Главная проблема заключается в том, что опухолевые клетки, в отличие от нормальных, не имеют физиологических «стоп-сигналов» для остановки этих процессов. Вероятнее всего, это и приводит к закреплению механизмов миграции и способствует прогрессированию и распространению опухоли [12–14].

Установлено, что злокачественно измененные клетки для реализации процессов, определяющих инвазивный рост и возможность метастазирования, используют генетически заложенные в организме программы. Так, передвижение одиночных клеток наблюдается в ходе эмбрионального развития, при воспалении, например, при миграции лейкоцитов. Такой же механизм распространения характерен для раковых клеток при прогрессии опухоли и развитии метастазов [13].

Наряду с одиночной миграцией возможна коллективная клеточная миграция, когда мигрируют группы прочно соединенных между собой опухолевых клеток [15, 16]. Такой вариант движения указывает на тканевую перестройку, он лежит в основе процессов, происходящих во время эмбрионального морфогенеза, а также представляет собой неотъемлемый компонент при заживлении раневых поверхностей [17, 18].

Таким образом, ключевым является то, что в процессах инвазивного роста и метастазирования злокачественно измененные опухолевые клетки активно используют механизмы как коллективной, так и одиночной клеточной миграции в качестве физиологических прототипов.

ВАРИАНТЫ ИНВАЗИВНОГО РОСТА

В настоящее время на основании комплекса определенных морфологических и молекулярно-генетических параметров выделяют два принципиально различных вида инвазивного роста: коллективную (групповую) клеточную миграцию и миграцию одиночными клетками (индивидуальная миграция; *рис. 1*) [1, 2, 15, 19, 20]. При этом способ миграции во многом определяется особенностями тканевого микроокружения и зависит от молекулярных изменений в самих опухолевых клетках [21].

Определение механизма инвазии, используемого одиночно мигрирующими клетками в процессе продвижения, представляет собой сложную задачу. К сожалению, исследования, посвященные изучению этого вопроса на молекулярном и морфологическом уровнях, малочисленны и в своем большинстве про-

водятся *in vitro* с использованием специфичных клеточных линий [22].

Однако в настоящее время заметно увеличивается число работ, в которых прослеживается возрастающий интерес к изучению молекулярно-генетических особенностей опухолевых клеток, определяющих основные различия между мезенхимальным и амёбодным вариантами инвазивного роста при индивидуальной миграции, а также при коллективной миграции.

Коллективная миграция

Коллективная миграция, представляя собой один из вариантов инвазивного роста, характеризуется миграцией целых групп клеток, соединенных между собой посредством молекул адгезии и коммуникационных контактов (рис. 1). Сразу стоит отметить, что этот признак является основной особенностью данного варианта инвазии, поскольку на клеточном уровне механизмы, лежащие в его основе, опираются на те же ключевые процессы, которые во многом определяют такой вариант миграции одиночными клетками, как мезенхимальный [15, 20, 23, 24].

Коллективную клеточную миграцию наблюдали при развитии и прогрессировании рака молочной железы и эндометрия, рака предстательной железы, колоректального рака, крупноклеточного рака легкого, рабдомиосаркомы, меланомы, а также большинства плоскоклеточных карцином [1, 17, 20, 25, 26].

При коллективной миграции клетки злокачественного новообразования, сохраняя связь с опухолевым массивом либо отделяясь от него в виде многоклеточных групп, проникают в окружающие ткани, формируя тонкие короткие тяжи, кластеры, полосы и широкие поля, а также структуры с просветами в центре, указывая тем самым на большое разнообразие структурных элементов, вовлеченных в процесс опухолевой инвазии [1, 2, 15, 20, 27].

Как уже было отмечено, коллективная миграция характеризуется миграцией целых клеточных групп, соединенных между собой с помощью кадгеринов и межклеточных щелевых связей. У движущейся клеточной группы имеется «ведущий край», или «лидирующий фронт», который использует интегрины и протеазы (рис. 1). Исследователи указывают на отчетливые различия в экспрессии генов и морфологии клеток, формирующих ведущий край, и клеток, располагающихся позади них, на «заднем фронте». Первые по своей морфологии зачастую напоминают мезенхимальные клетки и характеризуются менее выраженной упорядоченностью и структурной организацией, в то время как располагающиеся позади лидирующего фронта клетки стремятся к формированию более плотно упакованных розеткоподобных,

тубулярных структур, сохраняя при этом плотные межклеточные контакты [17, 28].

При коллективной миграции опухолевые клетки в области ведущего края формируют выступы – псевдоподии, используют интегрины для образования фокальных контактов с актиновым цитоскелетом, осуществляют протеолитическое разрушение внеклеточного матрикса, создавая в нем пространство для инвазии опухолевой ткани, активно вовлекая в работу актин-миозиновый сократительный аппарат с целью успешной миграции [15, 20].

Различия в полярности у коллективно движущихся групп клеток объясняются особенностями экспрессии поверхностных рецепторов, таких, как рецепторы хемокинов CXCR4 и CXCR7, на клетках ведущего края [29]. Факторы роста и хемокины, вырабатываемые стромальными клетками, посредством градиента диффузии обеспечивают внеклеточную индукцию клеточной поляризации. Обсуждается участие в этих процессах таких хемокинов, как SDF1 (CXCL12), фактор роста фибробластов (FGF) и трансформирующий фактор роста β (TGF- β) [17, 30].

Многое известно об участии TGF- β в канцерогенезе, причем его роль двояка. Taylor и соавт. [31] обращают внимание на то, что TGF- β , действуя в эпителиальных клетках молочной железы как мощный опухолевый супрессор на ранних стадиях развития рака, способен влиять на процесс развития опухоли посредством взаимодействия с онкогенными цитокинами. Повышение экспрессии TGF- β связывают с прогрессированием опухолевого процесса, что зачастую отмечают, например, уже на более поздних стадиях при развитии рака молочной железы [32, 33]. Роль TGF- β в миграции «эпителий-stroma» во время опухолевой прогрессии изучена недостаточно. Предполагают, что во взаимодействии опухоли и стромы TGF- β служит ключевым регулятором, который способствует коллективной клеточной миграции при раке молочной железы [34].

Установлено, что в клетках-лидерах, формирующих ведущий край коллективной миграции, экспрессируется подопланин [2] – трансмембранный гликопротеин, в обычных условиях экспрессирующийся в подоцитах почки, альвеолярных клетках легких типа I, клетках скелетных мышц, плаценте и т.д. Экспрессия подопланина в клетках рака молочной железы индуцирует клеточную миграцию и инвазию с формированием филоподий и одновременным сохранением экспрессии E-кадгерина [2, 35].

Опубликованы данные, указывающие на то, что коллективно мигрирующие раковые клетки могут использовать способность соседних мезенхимальных клеток изменять структуру матрикса и перестраивать его, а затем следовать по их «следам».

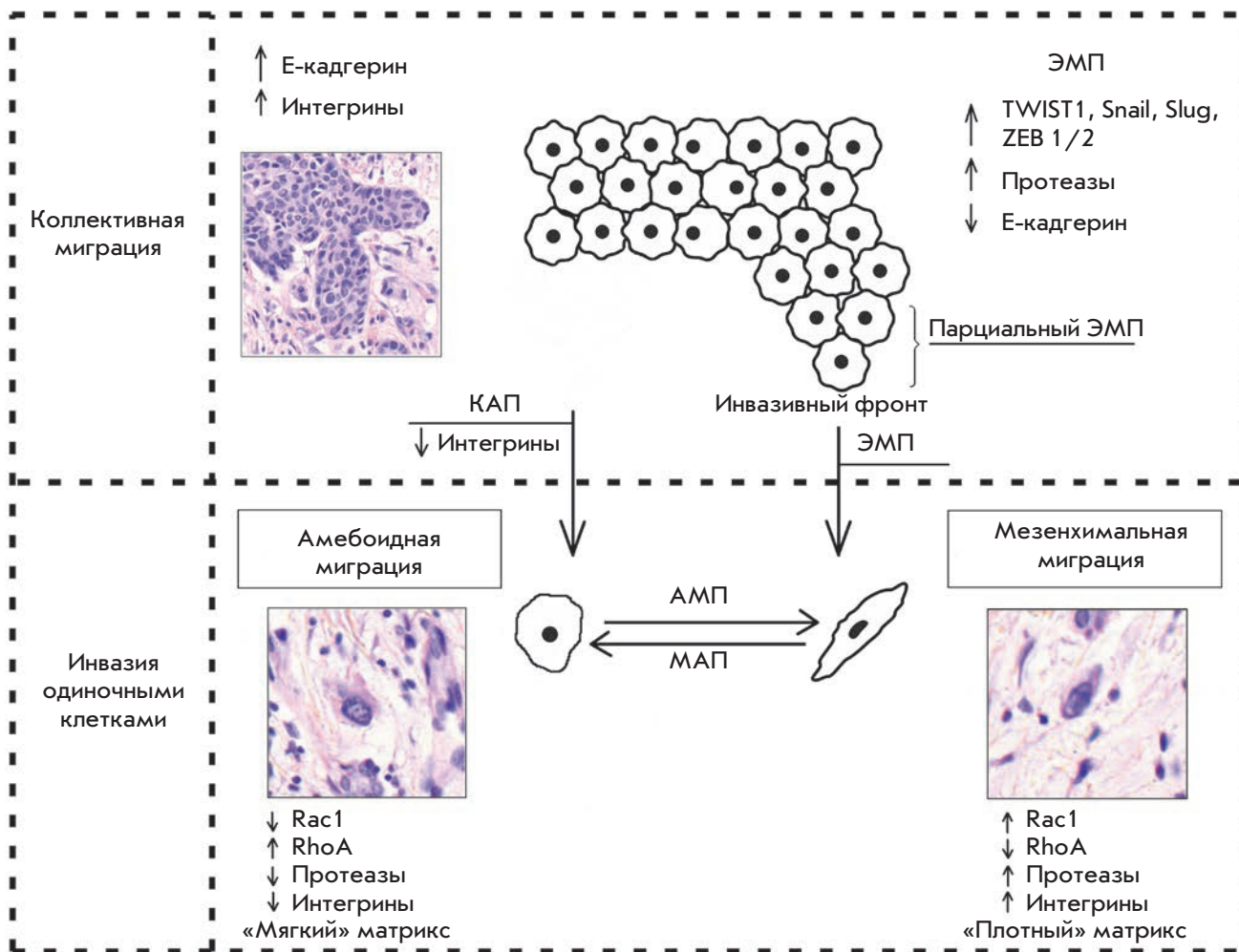


Рис. 1. Варианты инвазивного роста опухоли. На схеме представлены два варианта инвазии: коллективная (групповая) и индивидуальная миграция. Коллективная миграция характеризуется высокой экспрессией E-кадгерина и интегринов. Показано, что опухолевые клетки могут переходить от коллективной миграции к миграции одиночными клетками посредством двух механизмов: эпителиально-мезенхимального (ЭМП) и коллективно-амебоидного (КАП) переходов. ЭМП происходит в результате активации транскрипционных факторов TWIST1, Snail, Slug, ZEB1/2 и характеризуется высоким уровнем экспрессии протеаз и снижением экспрессии E-кадгерина. В процессе полного ЭМП опухолевые клетки отделяются от опухолевого массива и движутся по мезенхимальному типу миграции. Установлено существование в области инвазивного фронта парциального (или частичного) ЭМП, при котором клетки, сохраняя межклеточные связи, уже приобретают свойства, необходимые для успешной миграции. Такой фенотип назван гибридным «эпителиально-мезенхимальным» фенотипом. Другой вариант перехода от коллективной миграции к миграции одиночными клетками (КАП) возможен при условии снижения функциональной активности интегринов семейства $\beta 1$. Опухолевые клетки при этом переходят с группового варианта миграции на движение одиночных клеток по амебоидному принципу. Амебоидная миграция характеризуется снижением экспрессии протеаз и интегринов, а также изменением активности белков семейства малых GTP-аз – повышением уровня RhoA и снижением Rac1. Данный вариант миграции свойствен клеткам при наличии «мягкого» окружающего матрикса. В свою очередь, мезенхимальная миграция имеет противоположные характеристики. Считается, что этот тип миграции доминирует в средах с «плотным» матриксом. Схематично показано, что при изменении активности определенных клеточных молекул существует возможность перехода с одного вида миграции на другой в рамках миграции одиночными клетками, а именно амебоидно-мезенхимальный переход (АМП) и мезенхимально-амебоидный (МАП) [1, 13, 22, 47, 68, 73, 74]

В опытах *in vitro* внесение фибробластов в культуру индуцировало коллективную миграцию клеток опухоли в подлежащий матрикс в виде цепочек. Таким образом, фибробласты служили «проводником» для инвазирующих опухолевых клеток, ремоделируя окружающий внеклеточный матрикс в треки с толстыми коллагеновыми пучками по сторонам и отсутствием матрикса в центре [36, 37].

Определенную роль в развитии коллективной миграции опухолевых клеток играет представитель одного из семейств белковых молекул – LIM-киназа. Известно, что этот белок принимает участие в регуляции образования инвадоподий – структур, характерных для злокачественных опухолевых клеток и ответственных за разрушение окружающего межклеточного матрикса. При раке молочной железы обнаруживается чрезмерная активация LIM-киназы. Клетки опухоли молочной железы, в которых подавлена экспрессия гена LIM-киназы, теряют способность к инвазии в результате потери способности разрушать внеклеточный матрикс [38, 39].

Инвазия одиночными клетками, или индивидуальная клеточная миграция

Такой вариант инвазивного роста, как инвазия одиночными клетками, выделяют на основании обнаружения при морфологическом исследовании отдельных опухолевых клеток, проникающих в окружающие их ткани независимо друг от друга [2]. При подобном типе опухолевой инвазии миграция одиночных клеток может происходить посредством двух различных вариантов: мезенхимального и амeboидного [1, 2, 15, 22]. Стоит отметить, что ряд исследователей указывают на возможность «переключения» в рамках инвазии одиночными клетками с одного типа миграции на другой (с мезенхимального на амeboидный и наоборот, *рис. 1*). Такие переходы обычно возникают при изменении активности определенных клеточных молекул в условиях, когда опухолевым клеткам приходится адаптироваться к особенностям тканевого микроокружения [22, 40].

Мезенхимальная (фибробластоподобная) клеточная миграция

Мезенхимальные механизмы инвазивного клеточного роста, в противоположность амeboидному варианту движения, характеризуются протеканием более сложных процессов и потребностью в большом количестве клеточных молекул, принимающих участие в его реализации (*рис. 1*).

Этот вариант миграции свойствен кератиноцитам в условиях репаративной регенерации и эндотелиоцитам, клеткам гладкомышечной ткани и фибробластам. В связи с тем, что злокачественные клетки, исполь-

зующие мезенхимальный вариант движения, теряют эпителиальную полярность и приобретают вытянутую веретеновидную форму, напоминая по внешнему строению фибробласты, этот тип инвазии называют также «фибробластоподобным» [1, 2, 22, 23, 41]. Мезенхимальная инвазия обнаружена при развитии меланомы, фибросаркомы, глиобластомы и других злокачественных новообразований [1, 42–44].

Известно, что большая часть раковых клеток, отделившихся от опухолевого массива и распространяющихся в окружающие ткани, претерпевает определенные изменения, приобретая морфологический фенотип и свойства, характерные для мезенхимальных клеток [2, 15]. Подобная трансформация злокачественно измененной эпителиальной клетки с появлением у нее новых молекулярных и морфологических признаков получила название «эпителиально-мезенхимальный переход». Как уже упоминалось, этот биологический феномен впервые был описан E.D. Nau в 1995 году [9]. В настоящее время на существование данного феномена указывают результаты большого количества работ, в которых изучали механизмы инвазии и метастазирования злокачественных опухолей [1, 2, 15, 45]. Полагают, что мезенхимальный механизм инвазии является следствием ЭМП, при котором активно происходит дедифференцировка злокачественной эпителиальной опухоли, и многоклеточные группы начинают разъединяться до одиночных опухолевых клеток, приобретающих мезенхимальный фенотип [13].

Ряд исследователей подчеркивают, что опухолевые клетки при мезенхимальном варианте движения проходят через ряд определенных последовательных шагов, представляющих собой пятиступенчатую модель миграции. Этот цикл включает следующие изменения: 1) формирование на одном из полюсов клетки протрузионного выступа – ламеллиподии или филоподии за счет сокращений актинового цитоскелета под контролем малых GTP-аз Rac1 и Cdc42 с быстрым привлечением интегринов семейства $\beta 1$; 2) возникновение в области контакта клетки и внеклеточного матрикса фокальной адгезии с участием интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$; 3) сборку фокальных контактов, основанную на интегрин-опосредованных взаимодействиях и активацию протеолитических ферментов (матриксных металлопротеиназ, сериновых и треониновых протеаз, катепсинов) на границе «клетка–матрикс», приводящую к разрушению и ремоделированию окружающего внеклеточного матрикса; 4) изменение поляризации актинового цитоскелета под опосредованным миозином II контролем, возникновение сокращений тела клетки и 5) «подтягивание» заднего края клетки в направлении движения по вновь образовавшимся дефектам в структуре ма-

трикса [1, 13, 22]. Поскольку клетки, использующие фибробластоподобный механизм инвазии, выполняют рассмотренные шаги миграции, скорость их движения невелика и составляет около 0.1–2 мкм/мин [1, 22, 40].

Возможность протеолиза и ремоделирования тканевых структур объясняет тот факт, что мезенхимальное перемещение опухолевой клетки сопровождается незначительным в сравнении с амебоидным вариантом миграции изменением клеточной формы и минимально выраженной деформацией ядра [46]. Определенный интерес вызывают результаты работ, указывающие на то, что поведение опухолевых клеток во время индивидуальной миграции зависит от жесткости окружающего их матрикса. Так, мезенхимальная, или же протеолитическая модель миграции доминирует в условиях «жесткого» («плотного») окружающего матрикса. Высокая эффективность перемещения одиночных клеток, использующих мезенхимальный механизм, в плотных тканях объясняется протеолизом, обусловленным секрецией различных протеаз, и способностью к образованию фокальных контактов с элементами стромы [47, 48].

Таким образом, стоит отметить, что основными ключевыми моментами фибробластоподобного механизма инвазивного роста являются высокие силы сцепления на обоих полюсах клетки, а также между клетками и компонентами внеклеточного матрикса, выраженная экспрессия интегринов (семейства $\beta 1$ и $\beta 3$), протеолиз с разрушением и последующим ремоделированием тканей с образованием дефектов в структуре матрикса и движение по ним одиночных клеток или цепочек клеток. Деформация клеточного ядра выражена минимально, наблюдается медленная скорость миграции клеток.

С использованием подавления экспрессии соответствующих генов с помощью малых интерферирующих РНК показано, что характерной особенностью мезенхимального варианта инвазии является специфическая активность GTP-аз Rac1 и Cdc42. Подавление GTP-азы Rac1 посредством сигнальной активации GTP-азы RhoA и ее эффектора киназы ROCK ведет к блокированию мезенхимальной миграции опухолевых клеток [49–52].

Амебоидная клеточная миграция

Амебоидный механизм инвазивного роста – наиболее примитивный и одновременно наиболее эффективный способ миграции одиночных опухолевых клеток, по совокупности своих черт сходен с поведением и передвижением такого одноклеточного организма, как амеба *Dictyostelium discoideum* [40, 53].

Использование в клинических испытаниях антигенов, блокирующих интегрины, или ингибиторов

протеаз приводит к появлению опухолевых клеток с амебоидным вариантом миграции [1]. Аналогичные результаты получены при изучении злокачественных опухолей в условиях *in vivo*. Выявлена взаимосвязь между применением в терапии злокачественных опухолей лекарственных средств на основе ингибиторов матриксных металлопротеиназ и прогрессированием опухолевого процесса. Объяснить эту взаимосвязь стало возможным, только обнаружив опухолевые клетки, способные к амебоидной миграции [54]. Эти данные, вероятнее всего, могут свидетельствовать о том, что в условиях снижения или полной потери способности к распространению в окружающие ткани с использованием основных молекул, осуществляющих адгезию и разрушение внеклеточного матрикса, опухолевые клетки переходят на амебоидный механизм инвазии, который становится единственным и самым эффективным способом миграции.

Этот вариант движения описан у циркулирующих стволовых клеток, лейкоцитов и некоторых типов опухолевых клеток [2, 14]. По данным Zijl и соавт. амебоидный тип инвазивного роста наблюдается при раке молочной железы, лимфомах, мелкоклеточном раке легкого и раке предстательной железы, а также при меланоме [1, 42, 55].

Показано, что злокачественные опухолевые клетки при амебоидном варианте миграции имеют округлую или же эллипсоидную форму (рис. 1) [1, 22, 23, 40]. При амебоидном механизме инвазии для клеток характерны быстрая деформируемость, адаптация формы к уже сформированным структурам окружающего внеклеточного матрикса и проникновение по ним через узкие пространства в сжатом состоянии. Движение и перемещение осуществляются посредством сменяющих друг друга с высокой скоростью циклов расширений и сокращений тела клетки с возникновением «пузыреподобных» выпячиваний (выступов) клеточной мембраны [22, 56–58]. Эти выступы позволяют исследовать микроокружение для поиска наиболее приемлемого маршрута движения в обход различного рода препятствий, вследствие чего опухолевые клетки способны распространяться сквозь очень узкие щелевидные пустоты во внеклеточном матриксе [1, 2, 15, 22]. Возникающие при этом изменения клеточной формы генерируются кортикальным актиновым цитоскелетом, контроль над которым, в свою очередь, осуществляет малая GTP-аза RhoA и ее эффектор – киназа ROCK [1, 2, 15, 59]. Эта GTP-аза входит в суперсемейство малых GTP-гидролаз, члены которого занимают ключевые позиции при амебоидном варианте инвазии, поскольку участвуют в передаче сигналов и тем самым в регуляции самых

разнообразных процессов, происходящих в клетке, в том числе в реорганизации актинового цитоскелета в ходе миграции [51, 60, 61].

Стоит отметить, что при амебоидном механизме инвазии в процессе миграции изменяется форма не только клетки, но и клеточного ядра, его ориентации и внутреннего расположения относительно других органелл. Ядро, самый крупный и более жесткий, чем окружающий цитоскелет органоид, механически прочно стабилизировано за счет развитой сети структурных белков и, вероятнее всего, по этой причине его форма зачастую не претерпевает значительных изменений. Однако именно амебоидный вариант миграции характеризуется наиболее выраженной ядерной деформацией, поскольку отсутствует протеолитическая деградация окружающего матрикса. В связи с тем, что опухолевыми клеткам приходится перемещаться через минимально узкие, щелевидные пространства и поры, ядро также будет при этом находиться в максимально сжатом состоянии [46, 62, 63]. Предполагают, что подобно лейкоцитам, перемещающимся амебоидно, ядра внутри одиночно мигрирующих злокачественных опухолевых клеток движутся вперед по направлению к лидирующему краю [46].

В противоположность мезенхимальному механизму движения одиночных опухолевых клеток амебоидная миграция, или же непротеолитическая модель перемещения, превалирует, когда окружающий матрикс характеризуется относительно низкой жесткостью – «мягкий» матрикс. Например, амебоидную миграцию опухолевых клеток в лимфатической и кровеносной системах рассматривают как распространение в матриксе с низкой плотностью [47, 48].

На примере двух различных опухолевых линий – МТС и МТLн3 – Condeelis и Segall [64] в условиях *in vitro* выявили некоторые особенности клеточной миграции. Клетки МТLн3, обладающие высоким метастатическим потенциалом и осуществляющие миграцию, по-видимому, при помощи амебоидного механизма инвазивного роста, отличаются более высоким уровнем экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), чем клетки линии МТС, имеющие низкий метастатический потенциал. Их миграция ассоциирована с наличием в окружающем матриксе кровеносных сосудов и коллагенсодержащих волокон. Полагают, что хемотаксис опухолевых клеток в направлении кровеносных сосудов опосредуется сигнальными путями EGFR [64].

Амебоидный механизм инвазии имеет ряд отличительных особенностей, он характеризуется слабым взаимодействием между клетками и окружающим матриксом, а также полным отсутствием либо наличием слабых фокальных контактов. Отмечается

возможность сохранения быстрой и нефокальной сборки рецепторов в местах контактов клетки с внеклеточным субстратом. В данном варианте инвазивного роста интегрины не играют существенной роли. Важным является отсутствие протеолиза в участках взаимодействия клеток с матриксом, не регистрируется и экспрессия протеолитических ферментов, разрушающих внеклеточный матрикс [1, 2, 15, 62, 65]. Исследования *in vitro* показали, что при амебоидном варианте инвазивного роста, вероятнее всего, именно за счет этих свойств опухолевые клетки способны передвигаться в культурах с наибольшей скоростью (20 мкм/мин) [1, 20, 21].

Амебоидно-мезенхимальный и мезенхимально-амебоидный переходы

Нами уже было отмечено существование в процессе инвазивного роста определенной пластичности и возможности «переключения» в рамках индивидуальной клеточной инвазии с одного типа миграции на другой (с мезенхимального на амебоидный и наоборот). Данные события, по всей видимости, обусловлены возникновением изменений в активности определенных клеточных молекул и необходимостью адаптироваться к условиям тканевого микроокружения (рис. 1).

Эти изменения описывают как амебоидно-мезенхимальный и мезенхимально-амебоидный переходы [2, 22]. Опухолевые клетки, использующие мезенхимальный вариант миграции, могут определенным образом изменяться и переходить на амебоидный тип движения в условиях, когда ослабевают сигнальные и механические пути, принимающие непосредственное участие в стабилизации взаимодействий между структурами внеклеточного матрикса и злокачественно измененными клетками [22, 40, 47, 66]. Однако имеющиеся данные получены преимущественно экспериментальным путем. Описываются следующие механизмы, которые ведут к переходу клеток с мезенхимального на амебоидный вариант инвазивного роста (мезенхимально-амебоидный переход): 1) снижение или полная отмена околоклеточного протеолиза в результате применения ингибиторов протеаз; 2) снижение активности интегриновых рецепторов и их взаимодействий с элементами окружающей стромы при помощи их антагонистов; 3) повышение и стабилизация активности малой GTP-азы RhoA и ее эффектора ROCK [16, 40]. В работе группы исследователей во главе с S. Berton представлен интересный факт, указывающий на то, что белок p27, несмотря на большое разнообразие функций, играет важную роль в процессах контроля клеточной подвижности. В частности, в условиях *in vitro* отсутствие данного белка индуцирует разви-

тие мезенхимально-амебоидного перехода в клетках 3D-матрикса [66].

Некоторые авторы, изучающие механизмы инвазивного роста в рамках индивидуальной клеточной миграции, указывают на возможность амебоидно-мезенхимального перехода – процесса, обратного мезенхимально-амебоидному переходу. Обсуждается гипотеза, согласно которой механизм амебоидно-мезенхимального перехода имеет, вероятнее всего, те же молекулярные основы, и достоверно единственным процессом, определяющим возможность описываемой трансформации, является нарушение равновесия в активности представителей семейства малых GTP-аз и преобладание активности Rac над RhoA. Стоит отметить, что механизмы, в результате которых могли бы происходить описываемые изменения, остаются не ясными [47].

КОЛЛЕКТИВНО-ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ПЕРЕХОДЫ

В пределах одной опухоли опухолевые клетки могут одновременно двигаться как коллективно, так и индивидуально. При этом переход от коллективной миграции к индивидуальной представляет собой важнейший этап на пути повышения инвазивного и метастатического потенциала злокачественных новообразований. Например, в опухолях молочной железы клетки, отделившиеся от основного массива, приобретают способность к инвазии в лимфатические сосуды [26]. В настоящее время выделяют два механизма – эпителиально-мезенхимальный и коллективно-амебоидный переходы, посредством которых могут появляться индивидуально мигрирующие опухолевые клетки (*рис. 1*) [13, 67]. В свою очередь последние, в частности клетки, прошедшие ЭМП, способны в определенных условиях приобретать эпителиальный фенотип и образовывать многоклеточные опухолевые комплексы. Такая инверсия фенотипа получила название «мезенхимально-эпителиальный переход» [15, 17].

Эпителиально-мезенхимальный переход

В последнее время широко обсуждается вопрос об эпителиально-мезенхимальном переходе как о механизме, в процессе которого опухолевая клетка отделяется от эпителиального пласта и приобретает подвижность (*рис. 1*), так называемый «локомоторный фенотип», что способствует инвазивному росту и метастазированию [68–71]. Развитие данного процесса как ключевого фактора прогрессии рака показано *in vitro* с использованием специфических опухолевых линий, а также экспериментальных моделей, однако установление факта развития ЭМП и идентификация опухолевых клеток и их основных характеристик в условиях *in vivo* представляет сложную задачу [72].

ЭМП представляет собой основу многих процессов морфогенеза [71]. Считается, что в норме (в процессе эмбриогенеза) индуцировать ЭМП может HGF (фактор роста гепатоцитов), секретируемый фибробластами. HGF связывается со специфическими рецепторами c-Met, расположенными на мембране эпителиальных клеток. Связывание с рецепторами активирует сигнальный путь, в котором участвуют некоторые белки системы малых GTP-аз (Cdc42, Rac, RhoA, RhoC), регулирующих интенсивность полимеризации актиновых микрофиламентов и сократимость актин-миозиновых пучков, что определяет интенсивность образования ламеллиподий и натяжение прикрепленной к матриксу клетки. При этом происходит значительная перестройка всего актин-миозинового цитоскелета и исчезновение E-кадгериновых межклеточных контактов. В процессе канцерогенеза эпителиальные клетки подвергаются морфологической трансформации, фенотипически сходной с ЭМП, но возникающей в отсутствие соответствующего лиганда HGF. Подобную трансформацию в злокачественных опухолях можно вызвать трансфекцией разнообразных онкогенов. В процессе трансформации опухолевые клетки могут выходить из эпителиального пласта и двигаться наподобие фибробластов, приобретая, таким образом, способность к инвазии и метастазированию [73].

В процессе ЭМП происходят следующие основные события: злокачественно измененные эпителиальные клетки теряют апикально-базальную полярность вследствие разрушения плотных межклеточных соединений, щелевых контактов и утраты молекул клеточной адгезии (таких, как E-кадгерин, интегрины); изменяется актиновый цитоскелет клетки, который ремоделируется с образованием стрессовых волокон, которые собираются в определенных клеточных областях вблизи цитолеммы, где впоследствии начинают формироваться специфические клеточные выступы; наблюдается деградация подлежащей базальной мембраны эпителия, в результате чего лишенные межклеточных контактов опухолевые клетки становятся способными к инвазивному росту, проникновению в окружающий стромальный матрикс и начинают активный процесс миграции [69, 71].

Установлено, что ЭМП редко бывает одинаково выраженным в ткани всей опухоли. Скорее, этот процесс характеризуется различной степенью выраженности перехода клеток от эпителиального к мезенхимальному фенотипу. В связи с этим ряд исследователей описывают так называемый парциальный, или частичный ЭМП, которому подвергается большинство клеток в области инвазивного фронта (*рис. 1*). Парциальный ЭМП представляет собой состояние, при котором клетки уже приобре-

тают свойства, необходимые для успешной миграции, но при этом продолжают сохранять межклеточные связи. Такой фенотип получил название гибридного «эпителиально-мезенхимального» фенотипа, и был отнесен к признакам, характерным для коллективно перемещающихся опухолевых клеток [69, 74, 75].

Taddei и соавт. указывают на то, что ЭМП развивается вследствие индукции программ, связанных с активацией таких ключевых факторов транскрипции, как TWIST1, Snail, Slug и ZEB1/2 [76, 77]. В итоге происходит разрыв прочных межклеточных соединений по типу кадгеринов, активация полярного клеточного движения и протеолиза компонентов внеклеточного матрикса различными секретруемыми протеазами, при этом сохраняются функции рецепторов интегринов [10, 17, 77, 78]. В условиях эксперимента установлена роль фактора транскрипции Prrx1, который определяет способность клеток рака молочной железы к инвазивному росту [79].

Идентифицированы ZEB1 и ZEB2 – белки с доменом «цинковые пальцы», способные напрямую связываться с промоторами, индуцируя экспрессию генов мезенхимальных маркеров и подавляя экспрессию E-кадгерина и некоторых других маркеров эпителиальной ткани [80, 81].

Аналогичным образом Snail и Slug способны подавлять экспрессию гена E-кадгерина, прямо связываясь с его промотором, а также продукцию таких эпителиальных белков, как десмоплакин и клаудин, активировать экспрессию виментина и матриксных металлопротеиназ, повышая тем самым клеточную миграцию [82]. Группа исследователей во главе с Sanchez-Tillo выяснили, что фактор транскрипции Snail не встречается в нормальных эпителиальных клетках, а его обнаружение в клетках инвазивного фронта опухоли может считаться прогностическим маркером плохой выживаемости онкологических больных [83]. Существует мнение, что ZEB1/2, Snail и Slug индуцируются TGF- β , воспалительными цитокинами и гипоксией [84].

Коллективно-амебоидный переход

Ряд исследователей, опираясь на экспериментальные данные, указывает на возможность существования так называемого коллективно-амебоидного перехода (рис. 1), при котором опухолевые массы, инвазирующие окружающие ткани в виде коллективных многоклеточных групп, диссоциируют на одиночно мигрирующие клетки, использующие для перемещения амебоидный механизм инвазивного роста [40]. Показано, что это событие становится возможным в результате использования ингибиторов интегриновых рецепторов семейства $\beta 1$, поскольку именно эти молекулы играют ключевую роль как при образова-

нии межклеточных контактов, так и при взаимодействиях между опухолевыми клетками и компонентами окружающих тканей [16, 40, 85].

Мезенхимально-эпителиальный переход

Работы, посвященные изучению механизмов, лежащих в основе мезенхимально-эпителиального перехода, практически отсутствуют. Однако подчеркивается возможность существования такого феномена. При этом говорят о том, что зачастую, например, при раке молочной и предстательной железы строение опухолевой ткани в отдаленных метастатических очагах аналогично строению опухоли первичного узла [15, 86]. По мнению Friedl и Gilmour [17], из этих данных можно сделать несколько предположений. Во-первых, инвазия и метастазирование могут происходить без ЭМП. Во-вторых, обнаружение одиночных диссеминированных клеток в ходе рутинного патоморфологического исследования образцов опухолевой ткани представляется довольно сложной задачей и идентифицировать такие клетки в процессе ЭМП практически невозможно. И, в-третьих, опухолевые клетки временно используют механизмы ЭМП для интравазации и распространения в отдаленные органы и ткани, где, прочно укоренившись, возвращаются к эпителиальным программам роста. Такую трансформацию описывают как мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП) [15, 17]. МЭП экспериментально индуцировали, при этом индивидуально движущиеся клетки формировали многоклеточные комплексы, однако молекулярные механизмы реализации МЭП в физиологических условиях остаются не известными [17]. Nguyen и соавт. [5] показали, что селективный ингибитор PD173074 рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1) ингибирует сигнальный путь MAPK, который регулирует активность белка AP-1, что, в свою очередь, индуцирует развитие МЭП. Изучение возможности применения ингибитора PD173074 в качестве лекарственного средства, проведенное на специфических опухолевых клеточных линиях, выявило отчетливое подавление опухолевого роста, миграционной способности и инвазии. При этом наблюдалось снижение экспрессии гена *Snail*, матриксных металлопротеиназ 3, 10, 12 и 13 и усиление экспрессии гена E-кадгерина [5].

КЛАССИФИКАЦИЯ ВАРИАНТОВ ИНВАЗИВНОГО РОСТА НА ПРИМЕРЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Нашим коллективом на протяжении многих лет изучаются особенности течения рака молочной железы в зависимости от внутриопухолевой гетерогенности новообразования. Особое внимание уделяется фенотипическому разнообразию строения первичного опухолевого узла при инвазивной карци-

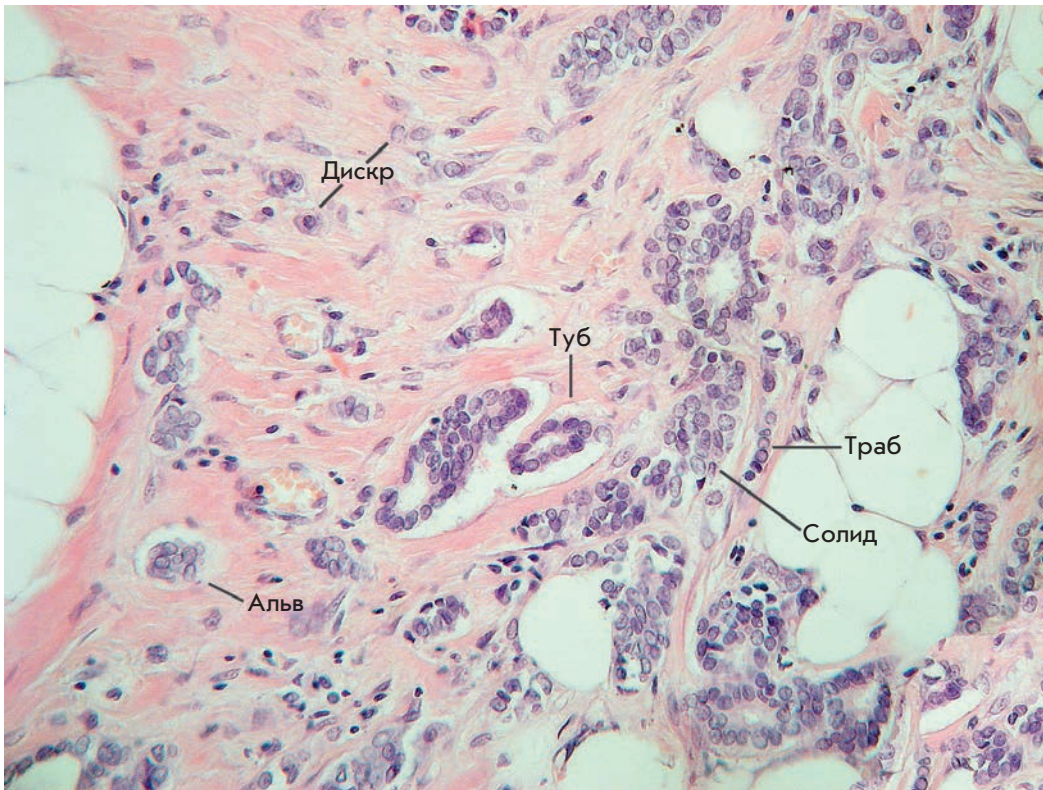


Рис. 2. Внутритропухолевая морфологическая гетерогенность инвазивного рака молочной железы. Представление многообразия инвазивного роста опухоли молочной железы, приводящее к формированию пяти основных типов морфологических структур: альвеолярные (Альв), трабекулярные (Траб), тубулярные (Туб), солидные (Солид) структуры и дискретные (Дискр) группы опухолевых клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

номе неспецифического типа, составляющей основной массив (до 80%) всех гистологических форм злокачественных новообразований молочной железы.

Несмотря на значительное разнообразие структуры инфильтративного компонента рака молочной железы, все же удастся выделить пять основных типов: альвеолярные, трабекулярные, тубулярные, солидные структуры и дискретные группы опухолевых клеток (рис. 2). Альвеолярные структуры представляют собой скопления опухолевых клеток округлой либо немного неправильной формы. Морфология клеток, образующих данный вид структур, варьирует от мелких клеток с умеренно выраженной цитоплазмой и округлыми ядрами до крупных с гиперхромными ядрами неправильной формы и умеренной цитоплазмой. Трабекулярные структуры – это либо короткие линейные объединения, образованные одним рядом мелких достаточно мономорфных клеток, либо широкие клеточные кластеры, состоящие из двух рядов клеток среднего размера с умеренно выраженной цитоплазмой, с округлыми нормохромными или гиперхромными ядрами. Тубулярные структуры образованы одним-двумя рядами достаточно мономорфных клеток с нормохромными округлыми ядрами. Солидные структуры представляют собой поля различного размера и формы, состоящие либо из мелких клеток с умеренно выраженной цито-

плазмой и мономорфными ядрами, либо из крупных клеток с обильной цитоплазмой и полиморфными ядрами. Дискретно расположенные группы клеток встречаются в виде скоплений из одной-четырёх клеток, вариабельных по своей морфологии [87, 88].

В соответствии со сведениями, накопившимися на сегодняшний день, можно предположить, что разные морфологические структуры опухолей молочной железы соответствуют определенным вариантам инвазии. Таким образом, к морфологическим проявлениям коллективной миграции можно отнести альвеолярные, трабекулярные и солидные структуры, характеризующиеся наличием межклеточных контактов, а к проявлениям индивидуальной миграции – дискретные группы опухолевых клеток. Интересно, что первые данные, полученные при изучении экспрессии генов клеточной адгезии, полностью подтверждают высказанные предположения. Так, замечено уменьшение активности генов кадгеринов, ответственных за межклеточные связи, в ряду солидные–альвеолярные и трабекулярные структуры–дискретные группы опухолевых клеток. При этом количество экспрессирующихся генов интегринов, участвующих в адгезии опухолевых клеток к внеклеточному матриксу, снижалось в ряду солидные и альвеолярные–трабекулярные структуры–дискретные группы опухолевых клеток [89].

ВАРИАНТЫ ИНВАЗИВНОГО РОСТА В ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ И В ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

Инвазивный рост и формирование лекарственной резистентности – взаимосвязанные процессы, играющие важнейшую роль в опухолевой прогрессии, в частности в метастазировании. Весьма вероятно, что одни и те же сигнальные пути вовлечены в точную миграцию и возникновение устойчивости опухолей к терапии [67, 90].

Мигрирующие опухолевые клетки (независимо от типа движения) более устойчивы к химио- и лучевой терапии, чем не движущиеся клетки [90]. Во многом это обусловлено тем, что клетки в состоянии миграции на время теряют способность к делению. Доказано также, что в движущихся опухолевых клетках повышена активность антиапоптотических генов, что вызывает их устойчивость к химиопрепаратам, направленным на индукцию запрограммированной клеточной гибели [91]. Помимо этого, известно, что клетки в состоянии ЭМП также проявляют химиорезистентность [92]. Подобная лекарственная устойчивость обусловлена индукцией в процессе ЭМП синтеза белков семейства ABC, осуществляющих выброс химиопрепаратов из клетки. Среди основных факторов транскрипции, запускающих ЭМП и в то же время положительно регулирующих активность ABC-транспортеров, выделяют TWIST1, Snail и др. [92–94].

Последние данные говорят о строгой ассоциации коллективной миграции с резистентностью к лучевой и химиотерапии [67, 90]. Согласно собственным исследованиям опухоли молочной железы, содержащие как альвеолярные, так и трабекулярные структуры, а также демонстрирующие значительное морфологическое разнообразие, характеризуются повышенной лекарственной устойчивостью [95, 96]. Интересно, что вклад трабекулярных структур в химиорезистентность, вероятно, объясняется высокой активностью ABC-транспортеров в опухолевых клетках данных морфологических объединений. Напротив, устойчивость опухолей молочной железы, содержащих альвеолярные структуры, объясняется другими, пока не установленными причинами [96].

Инвазивный рост и его фенотипическое многообразие как напрямую, так и через формирование лекарственной резистентности связаны с метастазированием. Циркулирующие опухолевые клетки, ответственные за возникновение будущих метастазов, являются результатом инвазии и последующего проникновения опухолевых клеток в лимфатические или кровеносные сосуды. Способностью к интравазации могут обладать не только одиночно мигрирующие опухолевые клетки, но и группы клеток. Существует предположение, что коллективная

миграция намного чаще приводит к метастазированию, чем индивидуальная. Пионерные исследования на животных моделях показали, что метастазы чаще формировались при внутривенном введении опухолевых кластеров, а не одиночных опухолевых клеток [97–99]. Более того, циркулирующие кластеры опухолевых клеток найдены в крови больных различными онкологическими заболеваниями [100, 101]. Было предположено, что коллективная интравазация связана с VEGF-зависимым формированием развитой сосудистой сети и сосредоточением в пределах нее опухолевых кластеров [102]. Кроме того, группы опухолевых клеток могут попадать в циркуляцию через поврежденные сосуды [103] или посредством кооперации с клетками в состоянии ЭМП и с опухоль-ассоциированными фибробластами, разрушающими внеклеточный матрикс с помощью протеаз [14, 104]. Зависимость метастазирования от коллективной миграции находит подтверждение в результатах наших собственных исследований. Так, у постменопаузальных больных раком молочной железы наличие альвеолярных структур в опухолях связано с высокой частотой лимфогенного метастазирования, тогда как у женщин, находящихся в пременопаузе, риск прогрессии данного типа возрастал с увеличением количества различных типов морфологических структур [87, 105]. Последняя закономерность имела и количественное значение: лимфогенные метастазы чаще выявлялись при большем числе альвеолярных структур в опухолях молочной железы [87, 106]. Более того, больные, в опухолях которых представлены альвеолярные структуры, имели низкую безметастатическую выживаемость (собственные неопубликованные данные).

Обнаруженная нами сопряженность альвеолярных структур как одного из проявлений коллективной миграции с частотой лимфогенного и гематогенного метастазирования позволяет сделать следующие предположения. По-видимому, клеточные элементы альвеолярных структур могут отличаться от опухолевых клеток других структур совокупностью биологических свойств, определяющих метастатический фенотип. Более отчетливая выраженность связи альвеолярных структур с лимфогенным метастазированием в менопаузальном периоде предполагает определенную роль изменения синтеза эстрогенов, включая и их образование *in situ*, в приобретении опухолевыми клетками в составе альвеолярных структур фенотипа метастазирования лимфогенным путем [107].

Таким образом, имеющиеся на настоящий момент времени сведения об особенностях инвазивного роста при карциномах разной локализации и, в частности, при раке молочной железы, открывают новые воз-

возможности для изучения закономерностей опухолевой прогрессии и поиска дополнительных ключевых параметров прогноза, а возможно, и «управления» течением заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность изучения морфологических проявлений и молекулярно-генетических механизмов инвазии и метастазирования злокачественных опухолей не вызывает сомнений. Результаты многочисленных работ отчетливо показывают, что в процессе инвазивного роста миграция опухолевых клеток может осуществляться как одиночными клетками, так и скоплениями групп клеток. Подобное разнообразие вариантов клеточной миграции, вероятно, приводит к развитию внутриопухолевой гетерогенности, представленной, например, при раке молочной железы разными морфологическими структурами: альвеолярными, трабекулярными, солидными структурами и дискретными группами опухолевых клеток. Известен и ряд биохимических, а также молекулярно-генетических механизмов, посредством которых злокачественно измененные клетки проникают

в окружающие ткани и приобретают способность распространяться далеко за пределы первичного опухолевого узла, давая начало развитию вторичных метастатических очагов в отдаленных органах и тканях. Однако, несмотря на достигнутый прогресс, неизученными остаются вопросы, касающиеся возможной взаимосвязи между различными вариантами инвазивного клеточного роста и параметрами лимфогенного и гематогенного метастазирования, особенностями течения заболевания, а также эффективностью назначаемой терапии. Решение этих проблем могло бы оказать существенную помощь в определении прогноза заболевания и, возможно, разработать новые подходы к тактике ведения онкологических больных. ●

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 14-15-00318 (обзор собственных данных) и в рамках программы повышения конкурентоспособности ТГУ. Часть работ была выполнена на оборудовании Томского регионального центра коллективного пользования (соглашение 14.594.21.0001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- van Zijl F., Krupitza G., Mikulits W. // *Mutat Res.* 2011. V. 728. № 1–2. P. 23–34.
- Spano D., Heck C., De Antonellis P., Christofori G., Zollo M. // *Semin. Cancer Biol.* 2012. V. 22. № 3. P. 234–249.
- Santibanez J.F. // *ISRN Dermatol.* 2013. V. 2013. P. 597927.
- Mehlen P., Puisieux A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2006. V. 6. № 6. P. 449–458.
- Nguyen D.X., Bos P.D., Massague J. // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. V. 9. № 4. P. 274–284.
- Monteiro J., Fodde R. // *Eur. J. Cancer.* 2010. V. 46. № 7. P. 1198–1203.
- Ковалев А.А. // *Онкология. Здоровье Украины.* 2011. Т. 4. № 17. С. 26–28.
- Ковалев А.А., Грудинская Т.П., Кузнецова Т.П., Ковалев К.А. // *Онкология.* 2012. Т. 14. № 2. С. 126–129.
- Hay E.D. // *Acta Anat. (Basel).* 1995. V. 154. № 1. P. 8–20.
- Kalluri R., Weinberg R.A. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 6. P. 1420–1428.
- Tam W.L., Weinberg R.A. // *Nat. Med.* 2013. V. 19. № 11. P. 1438–1449.
- Cox E.A., Sastry S.K., Huttenlocher A. // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. № 2. P. 265–277.
- Friedl P., Hegerfeldt Y., Tusch M. // *Int. J. Dev. Biol.* 2004. V. 48. № 5–6. P. 441–449.
- Friedl P., Alexander S. // *Cell.* 2011. V. 147. № 5. P. 992–1009.
- Friedl P., Locker J., Sahai E., Segall J.E. // *Nat. Cell Biol.* 2012. V. 14. № 8. P. 777–783.
- Hernandez-Caballero M.E. // *Carcinogenesis / Ed. Tonissen K. Intech,* 2013. P. 165–194.17.
- Friedl P., Gilmour D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 7. P. 445–457.
- Ulrich F., Heisenberg C.P. // *Traffic.* 2009. V. 10. № 7. P. 811–818.
- Khalil A.A., Friedl P. // *Integr. Biol. (Cambridge).* 2010. V. 2. № 11–12. P. 568–574.
- Yilmaz M., Christofori G. // *Mol. Cancer Res.* 2010. V. 8. № 5. P. 629–642.
- Friedl P., Wolf K. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 188. № 1. P. 11–19.
- Pankova K., Rosel D., Novotny M., Brabek J. // *Cell Mol. Life Sci.* 2010. V. 67. № 1. P. 63–71.
- Scott R.W., Crighton D., Olson M.F. // *J. Vis. Exp.* 2011. V. 58. e3525.
- Cheung K.J., Gabrielson E., Werb Z., Ewald A.J. // *Cell.* 2013. V. 155. № 7. P. 1639–1651.
- Kitamura T., Kometani K., Hashida H., Matsunaga A., Miyoshi H., Hosogi H., Aoki M., Oshima M., Hattori M., Takabayashi A., et al. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. № 4. P. 467–475.
- Giampieri S., Manning C., Hooper S., Jones L., Hill C.S., Sahai E. // *Nat. Cell Biol.* 2009. V. 11. № 11. P. 1287–1296.
- Sanz-Moreno V., Marshall C.J. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010. V. 22. № 5. P. 690–696.
- Lecaudey V., Cakan-Akdogan G., Norton W.H., Gilmour D. // *Development.* 2008. V. 135. № 16. P. 2695–2705.
- Aman A., Piotrowski T. // *Dev. Cell.* 2008. V. 15. № 5. P. 749–761.
- Vitorino P., Meyer T. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 23. P. 3268–3281.
- Taylor M.A., Parvani J.G., Schiemann W.P. // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2010. V. 15. № 2. P. 169–190.
- Barcellos-Hoff M.H., Akhurst R.J. // *Breast Cancer Res.* 2009. V. 11. № 1. P. 202.
- Lebrun J.J. // *ISRN Mol. Biol.* 2012. V. 2012. P. 381428.
- Matise L.A., Palmer T.D., Ashby W.J., Nashabi A., Chytil A., Aakre M., Pickup M.W., Gorska A.E., Zijlstra A., Moses H.L. // *Breast Cancer Res.* 2012. V. 14. № 4. P. R98.
- Wicki A., Christofori G. // *Br. J. Cancer.* 2007. V. 96. № 1. P. 1–5.

36. Gaggioli C., Hooper S., Hidalgo-Carcedo C., Grosse R., Marshall J.F., Harrington K., Sahai E. // *Nat. Cell Biol.* 2007. V. 9. № 12. P. 1392–1400.
37. Friedl P., Wolf K. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 18. P. 7247–7249.
38. Scott R.W., Hooper S., Crighton D., Li A., Konig I., Munro J., Trivier E., Wickman G., Morin P., Croft D.R., et al. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 191. № 1. P. 169–185.
39. Schoumacher M., Goldman R.D., Louvard D., Vignjevic D.M. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 189. № 3. P. 541–556.
40. Friedl P. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004. V. 16. № 1. P. 14–23.
41. Madsen C.D., Sahai E. // *Dev Cell.* 2010. V. 19. № 1. P. 13–26.
42. Sanz-Moreno V., Gadea G., Ahn J., Paterson H., Marra P., Pinner S., Sahai E., Marshall C.J. // *Cell.* 2008. V. 135. № 3. P. 510–523.
43. Carragher N.O., Walker S.M., Scott Carragher L.A., Harris F., Sawyer T.K., Brunton V.G., Ozanne B.W., Frame M.C. // *Oncogene.* 2006. V. 25. № 42. P. 5726–5740.
44. Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T. // *Oncogene.* 2009. V. 28. № 13. P. 1570–1583.
45. Siletz A., Schnabel M., Kniazeva E., Schumacher A.J., Shin S., Jeruss J.S., Shea L.D. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 4. e57180.
46. Friedl P., Wolf K., Lammerding J. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2011. V. 23. № 1. P. 55–64.
47. Чикина А.С., Александрова А.Ю. // *Молекуляр. биология.* 2014. Т. 48. № 2. С. 195–213.
48. Ehrbar M., Sala A., Lienemann P., Ranga A., Mosiewicz K., Bittermann A., Rizzi S.C., Weber F.E., Lutolf M.P. // *Biophys. J.* 2011. V. 100. № 2. P. 284–293.
49. Abreu-Blanco M.T., Verboon J.M., Parkhurst S.M. // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. № 2. P. 144–155.
50. Li H., Peyrollier K., Kilic G., Brakebusch C. // *Biofactors.* 2014. V. 40. № 2. P. 226–235.
51. Lash L.L., Wallar B.J., Turner J.D., Vroegop S.M., Kilkuskie R.E., Kitchen-Goosen S.M., Xu H.E., Alberts A.S. // *Cancer Res.* 2013. V. 73. № 22. P. 6793–6803.
52. Militello R., Colombo M.I. // *Commun. Integr. Biol.* 2013. V. 6. № 5. e25460.
53. Bloomfield G., Skelton J., Ivens A., Tanaka Y., Kay R.R. // *Science.* 2010. V. 330. № 6010. P. 1533–1536.
54. Sabeh F., Shimizu-Hirota R., Weiss S.J. // *J. Cell Biol.* 2009. V. 185. № 1. P. 11–19.
55. Gadea G., Sanz-Moreno V., Self A., Godi A., Marshall C.J. // *Curr. Biol.* 2008. V. 18. № 19. P. 1456–1465.
56. Chaussepied M., Janski N., Baumgartner M., Lizundia R., Jensen K., Weir W., Shiels B.R., Weitzman J.B., Glass E.J., Werling D., et al. // *PLoS Pathog.* 2010. V. 6. № 11. e1001197.
57. Tozluoglu M., Tournier A.L., Jenkins R.P., Hooper S., Bates P.A., Sahai E. // *Nat. Cell Biol.* 2013. V. 15. № 7. P. 751–762.
58. Miyazawa Y., Uekita T., Ito Y., Seiki M., Yamaguchi H., Sakai R. // *Mol. Cancer Res.* 2013. V. 11. № 6. P. 628–637.
59. Razidlo G.L., Schroeder B., Chen J., Billadeau D.D., McNiven M.A. // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. № 1. P. 86–93.
60. Bakal C. // *J. Cell Biol.* 2013. V. 203. № 3. P. 378–379.
61. Synek L., Sekeres J., Zarsky V. // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 4. P. 543.
62. Pinner S.E., Sahai E. // *F1000 Biol. Rep.* 2009. V. 1. P. 67.
63. Gerlitz G., Bustin M. // *Trends Cell Biol.* 2011. V. 21. № 1. P. 6–11.
64. Condeelis J., Segall J.E. // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. № 12. P. 921–930.
65. Ewald P.W., Swain Ewald H.A. // *Evol. Appl.* 2013. V. 6. № 1. P. 70–81.
66. Berton S., Belletti B., Wolf K., Canzonieri V., Lovat F., Vecchione A., Colombatti A., Friedl P., Baldassarre G. // *Mol. Cell Biol.* 2009. V. 29. № 18. P. 5031–5045.
67. Häger A., Alexander S., Friedl P. // *Eur. J. Cancer Suppl.* 2013. V. 11. № 2. P. 291–293.
68. Васильев Ю.М., Гельфанд И.М. // *Биохимия.* 2006. Т. 71. № 8. С. 1013–1020.
69. Micalizzi D.S., Farabaugh S.M., Ford H.L. // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2010. V. 15. № 2. P. 117–134.
70. Said N.A., Williams E.D. // *Cells Tissues Organs.* 2011. V. 193. № 1–2. P. 85–97.
71. Kim S., Lee J.W. // *Genomics Inform.* 2014. V. 12. № 1. P. 12–20.
72. Tsai J.H., Yang J. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 20. P. 2192–2206.
73. Gotte M., Kersting C., Radke I., Kiesel L., Wulfiging P. // *Breast Cancer Res.* 2007. V. 9. № 1. P. R8.
74. Savagner P. // *Ann. Oncol.* 2010. V. 21 Suppl 7. P. vii89–92.
75. Lu M., Jolly M.K., Levine H., Onuchic J.N., Ben-Jacob E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 45. P. 18144–18149.
76. Tsai J.H., Donaher J.L., Murphy D.A., Chau S., Yang J. // *Cancer Cell.* 2012. V. 22. № 6. P. 725–736.
77. Taddei M.L., Giannoni E., Morandi A., Ippolito L., Ramazzotti M., Callari M., Gandellini P., Chiarugi P. // *Cell Commun. Signal.* 2014. V. 12. P. 24.
78. Giannoni E., Parri M., Chiarugi P. // *Antioxid. Redox Signal.* 2012. V. 16. № 11. P. 1248–1263.
79. Ocana O.H., Corcoles R., Fabra A., Moreno-Bueno G., Aclouque H., Vega S., Barrallo-Gimeno A., Cano A., Nieto M.A. // *Cancer Cell.* 2012. V. 22. № 6. P. 709–724.
80. Bindels S., Mestdagt M., Vandewalle C., Jacobs N., Volders L., Noel A., van Roy F., Berx G., Foidart J.M., Gilles C. // *Oncogene.* 2006. V. 25. № 36. P. 4975–4985.
81. Vandewalle C., Van Roy F., Berx G. // *Cell Mol. Life Sci.* 2009. V. 66. № 5. P. 773–787.
82. Samatov T.R., Tonevitsky A.G., Schumacher U. // *Mol. Cancer.* 2013. V. 12. № 1. P. 107.
83. Sanchez-Tillo E., Liu Y., de Barrios O., Siles L., Fanlo L., Cuatrecasas M., Darling D.S., Dean D.C., Castells A., Postigo A. // *Cell Mol. Life Sci.* 2012. V. 69. № 20. P. 3429–3456.
84. De Craene B., Berx G. // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. V. 13. № 2. P. 97–110.
85. Friedl P., Wolf K. // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. № 5. P. 362–374.
86. Tsuji T., Ibaragi S., Hu G.F. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. № 18. P. 7135–7139.
87. Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Denisov E.V., Litvyakov N.V., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. // *Diagn. Cytopathol.* 2013. V. 41. № 3. P. 279–282.
88. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. // *Биохимия.* 2013. Т. 78. № 11. С. 1531–1549.
89. Denisov E.V., Geraschenko T.S., Zavyalova M.V., Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Kaigorodova E.V., Slonimskaya E.M., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. // *Neoplasma.* 2015. doi: 10.4149/neo_2015_041 [Epub ahead of print].
90. Alexander S., Friedl P. // *Trends Mol. Med.* 2012. V. 18. № 1. P. 13–26.
91. Goswami S., Wang W., Wyckoff J.B., Condeelis J.S. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 21. P. 7664–7667.
92. Mallini P., Lennard T., Kirby J., Meeson A. // *Cancer Treat. Rev.* 2014. V. 40. № 3. P. 341–348.
93. Chen W.J., Wang H., Tang Y., Liu C.L., Li H.L., Li W.T. // *Chin. J. Cancer.* 2010. V. 29. № 2. P. 151–157.
94. Li Q.Q., Xu J.D., Wang W.J., Cao X.X., Chen Q., Tang F., Chen Z.Q., Liu X.P., Xu Z.D. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. № 8. P. 2657–2665.

95. Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Вторушин С.В., Стахеева М.Н., Савенкова О.В., Крицкая Н.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. // Сиб. онкол. журн. 2008. № 6. С. 30–34.
96. Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Gerashchenko T.S., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4709.
97. Watanabe S. // *Cancer.* 1954. V. 7. № 2. P. 215–223.
98. Fidler I.J. // *Eur. J. Cancer.* 1973. V. 9. № 3. P. 223–227.
99. Liotta L.A., Saidel M.G., Kleinerman J. // *Cancer Res.* 1976. V. 36. № 3. P. 889–894.
100. Yu M., Stott S., Toner M., Maheswaran S., Haber D.A. // *J. Cell Biol.* 2011. V. 192. № 3. P. 373–382.
101. Greene B.T., Hughes A.D., King M.R. // *Front. Oncol.* 2012. V. 2. P. 69.
102. Kusters B., Kats G., Roodink I., Verrijp K., Wesseling P., Ruiter D.J., de Waal R.M., Leenders W.P. // *Oncogene.* 2007. V. 26. № 39. P. 5808–5815.
103. Hou J.M., Krebs M.G., Lancashire L., Sloane R., Backen A., Swain R.K., Priest L.J., Greystoke A., Zhou C., Morris K., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2012. V. 30. № 5. P. 525–532.
104. Tsuji T., Ibaragi S., Shima K., Hu M.G., Katsurano M., Sasaki A., Hu G.F. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 24. P. 10377–10386.
105. Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю., Глущенко С.А. // Сиб. онкол. журн. 2006. № 1. С. 32–35.
106. Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., Gerashchenko T.S., Litviakov N.V., Skryabin N.A., Vtorushin S.V., Telegina N.S., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V., et al. // *BioRes. Open Access.* 2013. V. 2. № 2. P. 148–154.
107. Perel'muter V.M., Zav'ialova M.V., Vtorushin S.V., Slonimskaya E.M., Kritskaia N.G., Garbukov E., Litviakov N.V., Stakheeva M.N., Babyshkina N.N., Malinovskaia E.A., et al. // *Adv. Gerontol. (Russian).* 2008. V. 21. № 4. P. 643–653.

УДК 579.61:616-092

Лектины *Pseudomonas aeruginosa* как мишени для новых антибактериальных соединений

А. В. Гришин^{1,2*}, М. С. Кривоzubов¹, А. С. Карягина^{1,2,3}, А. Л. Гинцбург¹¹ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18²ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: grishin-a1@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.09.2014

После доработки 27.02.2015

РЕФЕРАТ Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* – один из наиболее распространенных и проблемных оппортунистических патогенов, способный колонизировать различные органы и ткани человека и зачастую обладающий устойчивостью ко многим применяемым в клинической практике антибиотикам. Эта устойчивость может быть связана с появлением специфических генов устойчивости, с присущей данному патогену способностью противостоять попаданию антибиотиков внутрь клетки, а также образовывать биопленки. В связи с этим в настоящий момент активно исследуется возможность создания соединений, отличающихся по механизму действия от обычных антибиотиков (подавляющих рост микроорганизмов или вызывающих их гибель), направленных на снижение способности патогена колонизировать и повреждать человеческие ткани за счет ингибирования факторов вирулентности и подавления образования биопленок. Среди наиболее изученных белков *P. aeruginosa* – мишеней для подобного рода соединений – можно выделить лектины LecA и LecB, связывающие остатки галактозы и фукозы и олиго- и полисахариды, содержащие эти остатки. В представленном обзоре суммированы результаты экспериментов, свидетельствующих о важности этих белков для патогенности *P. aeruginosa*, приведены данные об ингибиторах лектинов и их эффективности в различных экспериментальных моделях. Особое внимание уделено ингибированию лектинов LecA и LecB в экспериментальных моделях инфекции на лабораторных животных и в клинической практике. Приведенная информация свидетельствует о том, что ингибирование лектинов можно рассматривать как перспективное направление борьбы с синегнойной палочкой. Однако, несмотря на наличие ингибиторов, чрезвычайно эффективных *in vitro*, для перехода к стадии доклинических исследований требуются дальнейшие эксперименты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биопленки, ингибиторы, лектин, резистентность, синегнойная палочка, устойчивость, *Pseudomonas aeruginosa*, LecA, LecB.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактозид; PQS – *Pseudomonas* quinolone signal, хинолоновый сигнал псевдомонад; IFN-γ – интерферон-γ; Le^a, Le^x – антигены системы групп крови Льюиса; TNFα – tumor necrosis factor α, фактор некроза опухолей α; ITC – isothermal titration calorimetry, изотермическая титрационная калориметрия; ELLA – enzyme-linked lectin assay, лектин-ферментный анализ; SPR – surface plasmon resonance, поверхностный плазмонный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ

Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* – широко распространенная бактерия, способная вести как сапротрофный, так и паразитический образ жизни. Синегнойная палочка может колонизировать практически любые ткани человека, благодаря чему вызывает множество разнообразных острых и хронических заболеваний. В их число входят острая

пневмония, бактериемия, инфекции мочевыводящих путей, наружный отит, дерматит, раневой и ожоговый сепсис, кератит, менингит, абсцесс головного мозга, эндокардит, различные инфекции костей и суставов. *P. aeruginosa* – оппортунистический патоген, который поражает, в первую очередь, людей с ослабленным иммунитетом, будучи одним из наиболее проблемных госпитальных патогенов. По со-

временным данным не менее 10–15% всех внутрибольничных инфекций вызвано *P. aeruginosa* [1, 2]. Кроме того, *P. aeruginosa* часто колонизирует легкие больных муковисцидозом – наследственным заболеванием, связанным с дефектом хлоридных каналов и накоплением вязкого секрета в легких, что приводит к снижению функции легких и продолжительности жизни больного [2].

Одна из основных проблем, связанных с терапией инфекций *P. aeruginosa*, – невосприимчивость этого патогена ко многим антимикробным препаратам. Устойчивость синегнойной палочки к антибиотикам складывается из нескольких аспектов. Во-первых, при необходимости патоген регулирует количество поринов и, следовательно, проницаемость мембраны для антибиотиков, а также экспрессирует большое количество белков, активно выводящих молекулы антибиотиков из клетки. Во-вторых, *P. aeruginosa*, как и многие другие патогены, легко приобретает гены специфической устойчивости к различным антибиотикам, например, гены β-лактамаз и ферментов, инактивирующих аминогликозиды [2]. Наконец хронические инфекции *P. aeruginosa* сопровождаются образованием биопленок. Биопленки представляют собой организованные сообщества микроорганизмов, погруженных во внеклеточный полимерный матрикс, который состоит из синтезированных этими же микроорганизмами полисахаридов, белков и ДНК [3, 4]. В составе биопленок бактерии становятся значительно более устойчивыми к неблагоприятным условиям среды, а также к антимикробным агентам и факторам иммунной системы человека [3]. При этом синегнойная палочка образует трудно устранимые биопленки не только в органах и тканях больных, но также на имплантируемых устройствах и катетерах [3, 5]. Один из популярных подходов, направленных на исправление этой ситуации, предполагает разработку соединений, не убивающих патогенные бактерии за счет подавления биосинтеза, но ингибирующих или инактивирующих их факторы вирулентности: токсины, адгезины, эффекторные белки, модулирующие метаболизм и иммунный ответ организма-хозяина, и системы секреции, доставляющие эти белки к месту действия, а также факторы, способствующие коммуникации бактерий друг с другом и образованию ими биопленок [6]. Иначе говоря, стратегия заключается в том, чтобы «не убить, а разоружить» патоген. Предполагается, что устойчивость к таким антивирулентным соединениям будет вырабатываться медленнее, поскольку они не будут влиять непосредственно на жизнеспособность бактерий, но будут действовать только на их способность инфицировать человека.

В качестве одной из мишеней для подобных антивирулентных соединений рассматриваются лектины *P. aeruginosa* LecA и LecB – растворимые белки, связывающие остатки галактозы (LecA) и фукозы (LecB) как отдельно, так и в составе олиго- и полисахаридов. Считается, что эти белки участвуют в прикреплении патогена к клеткам человека, вызывают повреждение эпителиальных тканей, а также играют значительную роль в образовании биопленок *P. aeruginosa*, действуя, таким образом, как важные факторы вирулентности. В настоящем обзоре мы постарались суммировать результаты исследований, раскрывающих роль лектинов LecA и LecB в патогенезе и формировании биопленок, описать ингибиторы этих белков, известные на настоящий момент, а также оценить перспективы использования этих белков в качестве мишеней для терапии инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

ЛЕКТИНЫ *P. aeruginosa*: ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Лектины LecA и LecB (также часто встречаются названия PA-II и PA-III) были выделены из *P. aeruginosa* в 1970-х годах как белки, способные вызывать агглютинацию эритроцитов человека и различных животных [7–9]. Оба лектина представляют собой небольшие белки размером 121 (LecA) и 115 (LecB) аминокислотных остатков (12.8 и 11.9 кДа соответственно) [10, 11]. LecA связывает *D*-галактозу, а также, с меньшей аффинностью, *N*-ацетил-*D*-галактозамин. Наибольшим сродством к LecB обладает *L*-фукоза, но он связывает также маннозу и некоторые другие сахара. Несмотря на отсутствие какого-либо сходства аминокислотных последовательностей, четвертичная организация LecA и LecB сходна: оба лектина образуют гомотетрамерные комплексы, где каждый из мономеров имеет свой сайт связывания лигандов. Таким образом, один тетрамер способен связывать четыре молекулы соответствующего углевода [12, 13] (рис. 1). Среди бактерий рода *Pseudomonas* гены *lecA* и *lecB* уникальны для *P. aeruginosa*, однако их гомологи встречаются у некоторых других бактерий, таких, как *Burkholderia* и *Phototrhabus*.

Регуляция синтеза лектинов, в первую очередь LecA, изучена достаточно подробно. Синтез обоих лектинов индуцируется при достижении культурой бактерий стационарной фазы роста и регулируется *rhl* и хинолоновым сигналом (PQS), компонентами системы «quorum sensing» [14, 15]. Работа этой системы основана на выделении бактериями в среду низкомолекулярных соединений различной природы (в частности, ацилгомосеринлактонов и хинолонов), позволяющих сигнализировать другим бактериям того же вида о своем присутствии. Таким образом бактерии «чувствуют», когда их популяция достига-

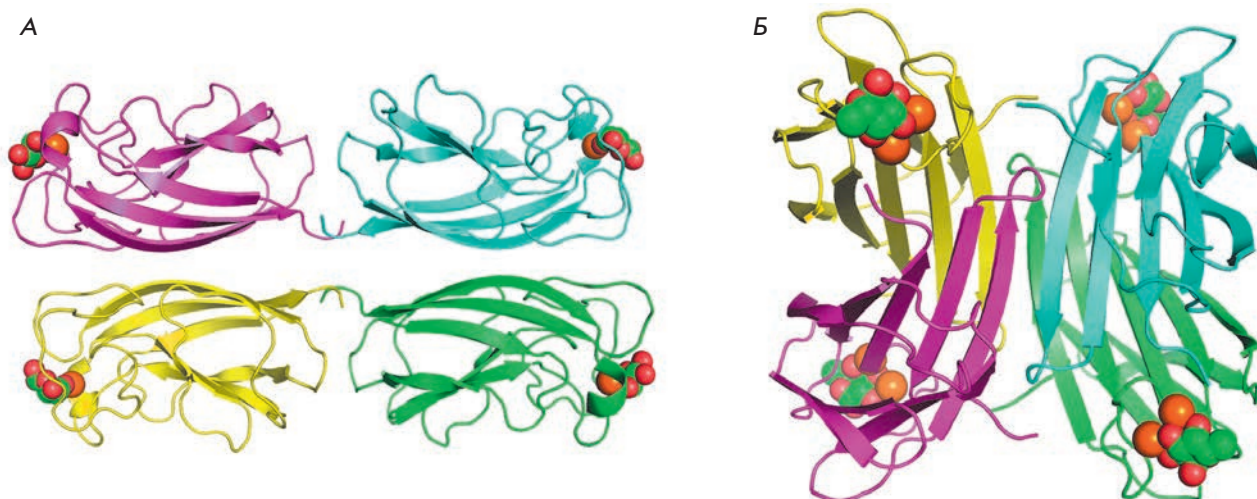


Рис. 1. Общий вид тетрамеров LecA (А) и LecB (Б). Отдельные мономеры показаны разными цветами в виде схематического изображения полипептидной цепи, в которой плоскими стрелками выделены β-тяжи в соответствующей ориентации. Оранжевыми сферами показаны ионы кальция, связанные галактоза и фукоза показаны зелеными (атомы углерода) и красными (атомы кислорода) сферами

ет определенной плотности, и запускают экспрессию факторов вирулентности, таких, как протеазы LasA и LasB, экзотоксин А, щелочная протеаза и др., а также процесс образования биопленки [16]. Характер регуляции экспрессии LecA более всего совпадает с регуляцией синтеза пиоцианина – важного токсина, способствующего развитию окислительного стресса и связанных с ним повреждений клеток организма-хозяина [14, 15, 17–20]. Интересно, что количество продуцируемого LecA, как и других факторов вирулентности, увеличивается при контакте патогена с некоторыми молекулами организма-хозяина, сигнализирующими о его стрессовом состоянии, такими, как норадреналин, IFN-γ, аденозин и κ-опиоидный пептид динорфин [19, 21–23].

В клетке лектины *P. aeruginosa* локализуются, в первую очередь, в цитоплазме, а также в некотором количестве на поверхности наружной мембраны [24, 25]. LecB на наружной мембране, вероятнее всего, связывается с остатками фукозы гликолипидов или гликопротеинов [25, 26]. Например, показано, что LecB взаимодействует с одним из основных поринов наружной мембраны *P. aeruginosa* OprF и не обнаруживается на мембране бактерий, мутантных по гену *oprF* [26]. Впрочем, учитывая, что мутации в гене *oprF* приводят к значительному изменению свойств наружной мембраны *P. aeruginosa* в целом [27], не исключено, что в закреплении LecB на мембране могут участвовать и другие белки. Локализация LecA, в отличие от LecB, практически не изучена.

РОЛЬ ЛЕКТИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ

Роль лектинов LecA и LecB в патогенезе заболеваний, сопровождающихся инфекцией *P. aeruginosa*, в настоящий момент не определена однозначно. Существуют данные, свидетельствующие о том, что эти лектины способствуют адгезии бактерий к субстрату, например, клеткам человека, участвуют в агрегации бактериальных клеток и образовании биопленок, а также во взаимодействии бактерии с тканями организма-хозяина, приводящем к повреждению тканей. Предполагаемая роль лектинов схематично суммирована на *рис. 2*.

Адгезия

Лектины LecA и LecB связывают олигосахариды многих гликопротеинов человека и других млекопитающих [28–34], что естественным образом приводит к предположению о непосредственном участии лектинов в адгезии *P. aeruginosa* к тканям человека [35]. Адгезия является важным этапом патогенеза, именно с адгезии бактериальных клеток на поверхности эпителиальной ткани начинается колонизация, что затем может привести к образованию биопленки или инвазии патогена. Однако экспериментальные данные о роли лектинов LecA и LecB в адгезии *P. aeruginosa* противоречивы. Вентворт и соавт. [36] изучали прикрепление бактерий к культуре клеток эпителия роговицы кролика. Было показано, что добавление лизата бактериальных клеток способствует увеличению количества прикрепившихся интактных бактерий, и этот эффект частично подавляется до-

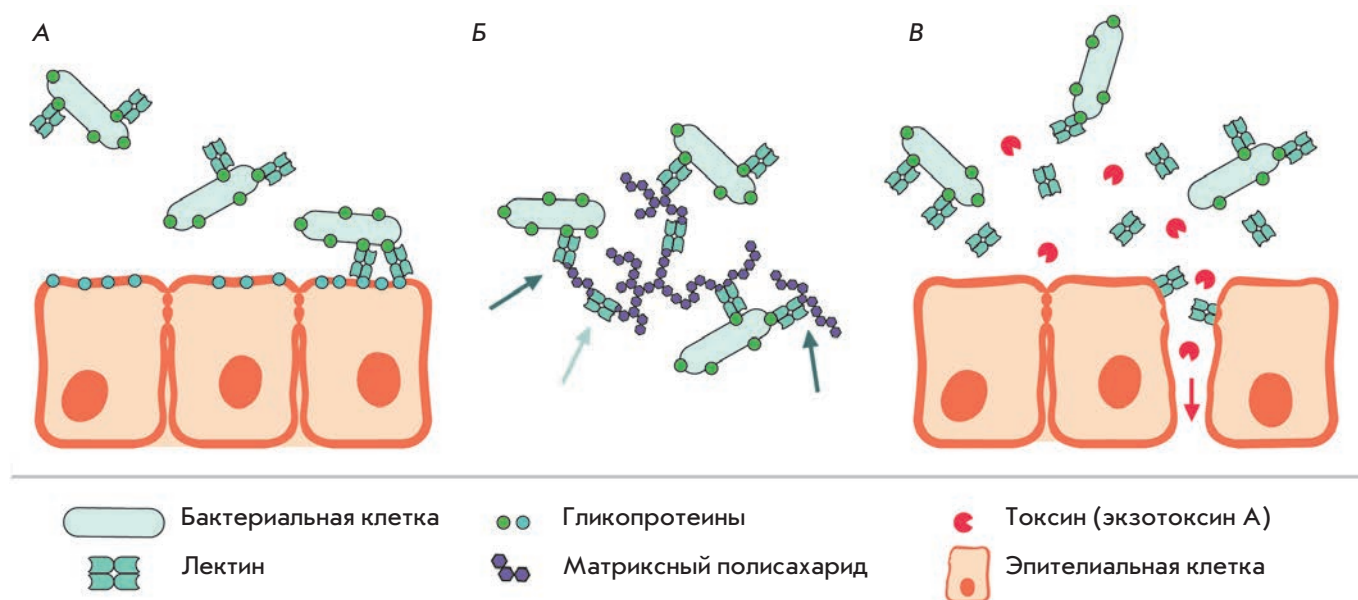


Рис. 2. Предполагаемые функции лектинов *P. aeruginosa*: адгезия к эпителиальным клеткам организма-хозяина (А); прикрепление бактериальных клеток к полисахаридам матрикса биопленок и «сшивание» цепочек полисахаридов друг с другом (Б); нарушение барьерной функции и повышение проницаемости эпителиального слоя для других факторов патогенности (В). Светло-серой стрелкой отмечен пример сшивания полисахаридов лектином, темно-серыми стрелками – прикрепление полисахарида к гликопротеинам бактериальной клетки, красной стрелкой обозначено проникновение токсинов через эпителий

бавлением галактозы, маннозы и фукозы. Сделан вывод, что стимуляция адгезии связана с высвобождением лектинов, находившихся в цитоплазме лизированных бактериальных клеток. Прикрепление бактерий к фибронектину – одному из наиболее распространенных гликопротеинов человека, также подавлялось при добавлении сахаров, в первую очередь сиаловой кислоты, N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина, в меньшей степени – галактозы и фукозы [37]. Однако, в отличие от предыдущей работы, добавление LecA не повышало, а наоборот, снижало количество прикрепившихся к иммобилизованному фибронектину бактериальных клеток. Штаммы *P. aeruginosa*, мутантные по генам *lecA* и *lecB*, сохраняют свою способность связываться с муцинами – гликопротеинами, секретруемыми эпителиальными клетками [38], но значительно хуже прикрепляются к клеткам линии A549 эпителия дыхательных путей человека [39, 40]. Также было показано, что прикрепление к клеткам A549 дозозависимо подавляется лигандами лектинов метил-β-галактозидом и метил-α-фукозидом [40], а прикрепление к иммортализованным клеткам легочного эпителия линий NuLi (здорового человека) и CuFi (больного муковисцидозом) – добавлением антител к LecB, но не контрольных неспецифических анти-

тел [41]. При этом в работе Айерхоффа и соавт. [42], напротив, показано, что взаимодействие лектина LecA с глоботриаозилцерамидом (Gb3) необходимо для проникновения *P. aeruginosa* внутрь клеток легочного эпителия человека линии H1299, а также внутрь искусственных везикул, но не играет роли в адгезии. Бактерии, мутантные по гену *lecA*, прикрепляются к клеткам H1299 и искусственным везикулам так же, как и бактерии дикого типа. Эти противоречия, вероятно, объясняются разными субстратами, которые используются при изучении адгезии (изолированные гликопротеины, эпителиальные клетки различного происхождения), и то, будут ли лектины влиять на прикрепление к конкретному субстрату, зависит от спектра имеющихся на его поверхности олигосахаридов.

Необходимо также отметить, что, помимо лектинов, адгезия *P. aeruginosa* к клеткам организма-хозяина обеспечивается и другими факторами, такими, как флагеллы и пили типа IV [43, 44], и отделить эффекты, связанные с наличием разных адгезинов, достаточно проблематично. Кроме того, известно, что функциональный LecB необходим для нормальной сборки пилей *P. aeruginosa* и секреции некоторых белков [38]. Таким образом, хотя лектины *P. aeruginosa* важны для прикрепления патогена к некоторым

типам клеток человека, конкретный механизм этого процесса остается не до конца понятным, его важность для инфекции *in vivo* – неопределенной, а роль лектинов в нем может быть как прямой (взаимодействие с гликановыми структурами на поверхности клеток), так и косвенной (участие в сборке, секреции и функционировании других адгезинов, таких, как пили типа IV).

Биопленки

Оба лектина участвуют не только в адгезии, но и в образовании биопленок *P. aeruginosa*. Независимыми группами исследователей на разных экспериментальных моделях было показано, что штаммы *P. aeruginosa*, мутантные по генам *lecA* и *lecB*, формируют менее развитые биопленки, лишенные выраженной архитектуры, присущей биопленкам штаммов дикого типа [25, 38, 45, 46]. Кроме того, при выращивании биопленок *P. aeruginosa* на стальных пластинках добавление изопропил-β-D-тиогаалактозида (ИПТГ) или нитрофенилгалактозида (производных галактозы, способных связываться с LecA с более высокой аффинностью, чем галактоза) подавляло образование биопленок до уровня *lecA*-мутанта (площадь поверхности биопленки уменьшалась в 2 раза по сравнению с биопленками дикого типа в отсутствие ИПТГ), а добавление галактозидов к уже сформированным биопленкам приводило к их разрушению. При этом галактозиды не влияли на формирование и разрушение биопленок штаммом, мутантным по *lecA* [45]. Аналогичным образом биопленки, образованные на предметных стеклах *P. aeruginosa*, мутантным по *lecB*, были значительно тоньше и меньше по площади, чем биопленки дикого типа [25, 46]. Как и галактозиды, лиганд LecB нитрофенилфукозид препятствовал образованию биопленок и частично разрушал биопленки дикого типа, но не *lecB*-мутанта. Интересно, что нитрофенилфукозид подавлял образование биопленок не только лабораторным штаммом PAO1, но и тремя клиническими изолятами [46].

К сожалению, хотя эти работы и указывают на необходимость функциональных генов лектинов для образования полноценных биопленок, непосредственная функция лектинов в этом процессе остается не выясненной. Возможно, роль лектинов заключается в агрегации бактериальных клеток и формировании микроколоний. По крайней мере, Диггл и соавт. не наблюдали формирования микроколоний *lecA*-мутантом [45]. Лектин LecB необходим для правильной сборки пилей типа IV, которые, в свою очередь, требуются для образования биопленок [38]. Возможно, лектины способствуют прикреплению полисахаридов внеклеточного матрикса биопленок к бактериальным клеткам или необхо-

димы для сшивки отдельных цепочек этих полисахаридов между собой. Такая сшивка полисахаридных цепей с помощью мультивалентных лектинов могла бы способствовать образованию более плотных и устойчивых к физическим воздействиям биопленок. Интересно, что в состав внеклеточного полисахарида Psl, абсолютно необходимого для образования биопленок *P. aeruginosa*, входит манноза и, по некоторым данным, галактоза – лиганды лектинов LecB и LecA соответственно [47, 48]. Прикрепление этого полисахарида к бактериальным клеткам необходимо для инициации процесса образования биопленки [49].

Влияние на эпителиальные клетки

В нескольких работах изучено непосредственное влияние лектинов на эпителиальные клетки дыхательных путей и кишечника человека. Так показано, что добавление LecA существенно замедляет рост эпителиальных клеток носовых полипов, а также способствует снижению количества клеток, несущих реснички. Кроме того, LecA вызывал образование в клетках крупных вакуолей, а при больших концентрациях – отслаивание клеток [50]. Показано также значительное снижение частоты биения ресничек мерцательного эпителия при инкубации с LecA [51, 52]. Влияние LecA на частоту биения ресничек устранялось добавлением D-галактозы. Наблюдали блокирование биения ресничек при добавлении LecB, и этот эффект снимался добавлением фукозы [51–54]. В норме движение ресничек эпителия дыхательных путей способствует удалению из легких слизи и задержанных ею чужеродных частиц, в том числе бактериальных клеток. Вероятнее всего, ингибирование функции ресничек вызвано связыванием лектинов с гликопротеинами на поверхности эпителиальных клеток и ответом эпителиальных клеток на это событие либо непосредственно за счет «склеивания» отдельных ресничек друг с другом [51]. Описанные эффекты, однако, показаны только в моделях *in vitro*, а то, насколько они важны при инфекции дыхательных путей *in vivo*, остается не ясным.

Лектин LecA также оказывает негативное влияние на эпителий кишечника. В частности, добавление LecA к культурам клеток Caco-2 и T-84 значительно снижает трансэпителиальное электрическое сопротивление клеточного монослоя, а также повышает проницаемость монослоя для маннита, причем N-ацетилгалактозамин аттенюирует этот эффект [21, 55, 56]. Вероятнее всего, это связано с нарушением лектином плотных межклеточных контактов [55]. Повышение проницаемости кишечного эпителия наблюдали *in vivo* на мышинной модели кишечной инфекции [21, 55, 56]. При инъекции LecA вместе с эк-

зотоксином А или эластазой в слепую кишку мышей, перенесших гепатэктомию 30% печени, смертность достигала 100% через 48 ч, чего не было при инъекции только ЛесА, экзотоксина А или эластазы. Аналогично, к 100% смертности приводила инъекция клинического изолята *P. aeruginosa*, но не мутанта, лишенного способности экспрессировать ЛесА. Учитывая, что внутривенная инъекция экзотоксина А смертельна для мышей, вероятнее всего, инъекция ЛесА в слепую кишку обеспечивает проницаемость эпителия для экзотоксина А, который за счет этого попадает в кровотоки.

ЛИГАНДЫ И ИНГИБИТОРЫ ЛЕКТИНОВ

Свои функции лектины выполняют за счет связывания олиго- и полисахаридов, будь то олигосахариды гликопротеинов человека или бактерий или матричные полисахариды биопленок *P. aeruginosa*. Определяющую роль в этом процессе играет специфичность лектинов по отношению к связываемым сахарам.

Лектин ЛесА предпочтительно связывается с α -D-галактозой и олиго- и полисахаридами, содержащими концевые невосстанавливающие остатки α -D-галактозы, такими, как антигены групп крови В, Р^k и Р₁, мелибиоза и галактобиоза, растительные галак-

томаннаны и др. [28–30, 57]. Как и у многих других лектинов, в сайте связывания галактозы ЛесА находится ион кальция, фиксированный координационными связями с карбоксильными группами белка. Молекула галактозы располагается в сайте связывания в своей наиболее стабильной ⁴C₁-конформации, при этом атомы О3 и О4 участвуют в координационных связях с фиксированным ионом кальция, атомы О2, О3 и О4 образуют дополнительные водородные связи с аминокислотными остатками белка, а атом О6 – с молекулой воды, прочно удерживаемой в сайте двумя водородными связями [12, 58] (рис. 3А). Константа диссоциации комплекса ЛесА с галактозой равна 88 мкМ [59]. В связывании лектином ЛесА олигосахаридов основную роль играет именно концевой остаток α -D-галактозы, тогда как другие остатки олигосахаридов образуют достаточно малочисленные контакты с белком [31, 58]. В связи с этим в зависимости от состава олигосахаридов и деталей гликозидной связи, соединяющей концевой остаток галактозы со следующим остатком в олигосахариде, аффинность олигосахаридов к ЛесА хотя и может отличаться, но в достаточно узких пределах: константы диссоциации, как правило, составляют от 30 до 130 мкМ [31, 58]. Помимо α -D-галактозы, ЛесА может связывать N-ацетил-D-галактозамин, хотя и с меньшей аффин-

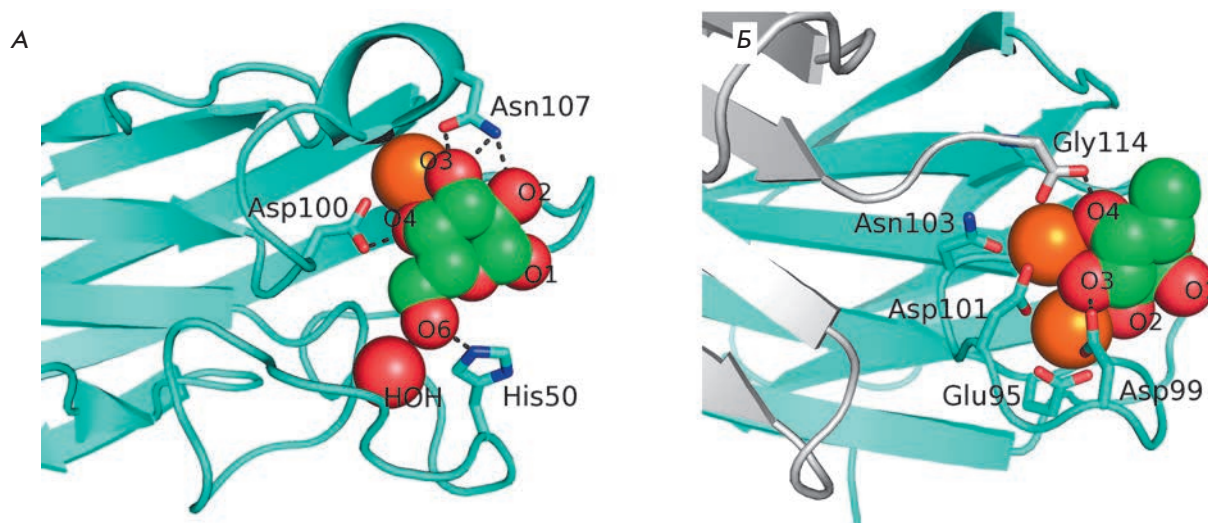


Рис. 3. Детальное изображение сайтов связывания сахаров ЛесА (А) и ЛесВ (Б). Лектины показаны в виде схематического изображения полипептидной цепи, в которой плоскими стрелками выделены β -тяжи в соответствующей ориентации. Ионы кальция показаны оранжевыми сферами, связанные галактоза и фукоза – зелеными (атомы углерода) и красными (атомы кислорода) сферами. Молекула воды, участвующая в связывании галактозы ЛесА, показана в виде сферы красного цвета, некоторые аминокислотные остатки, участвующие в связывании сахаров или координации ионов кальция, показаны в виде скелетной модели; черными пунктирными линиями показаны водородные связи атомов сахара с боковыми цепями аминокислотных остатков лектинов. Серым цветом (Б) показан еще один мономер ЛесВ, С-концевой глицин (Gly114) которого участвует в формировании сайта связывания соседнего мономера

ностью [7, 60], а также аденин и ацилгомосеринлактоны, однако, это взаимодействие реализуется с помощью независимого сайта связывания [61, 62].

ЛесВ обладает более широкой специфичностью и большей аффинностью к своим лигандам. Он способен связывать *L*-фукозу и *L*-фукозиламин, *L*-галактозу, *D*-арабинозу, *D*-маннозу и *D*-фруктозу [63–65]. Константа диссоциации комплекса ЛесВ с *L*-фукозой равна 2.9 мкМ, взаимодействие с другими сахарами несколько слабее [65]. Столь высокая для лектина аффинность объясняется тем, что в сайте связывания лигандов ЛесВ находятся сразу два фиксированных иона кальция, координационные взаимодействия с которыми определяют связывание сахаров с ЛесВ (рис. 3). Оптимальное расположение гидроксильных групп сахара для координации двух ионов кальция ЛесВ соответствует двум гидроксилам в экваториальном и одному в аксиальном положении. Это вносит решающий вклад в специфичность ЛесВ – все связываемые ЛесВ сахара имеют указанное расположение гидроксильных групп в своих наиболее энергетически выгодных конформациях [63, 65]. Как и ЛесА, ЛесВ взаимодействует с олигосахаридами, имеющими концевые невосстанавливающие остатки соответствующих моносахаридов, в частности *L*-фукозы. Так, показано, что ЛесВ способен связывать олигосахариды групп крови А, В и Н, а также Le^a и Le^x [28, 32, 66, 67]. Основной вклад в энергию взаимодействия олигосахаридов с ЛесВ вносит концевой остаток фукозы, хотя за счет состава и расположения других остатков моносахаридов аффинности олигосахарида можно повысить в 14 раз по сравнению с фукозой, что показано для Le^a [32].

За последнее десятилетие предложено множество различных ингибиторов как ЛесА, так и ЛесВ. За исключением пептидов-гликомиметиков [52] все они так или иначе содержат в своем составе остатки соответствующих сахаров в качестве аффинных групп. К таким ингибиторам относятся производные моносахаридов, мультивалентные гликокластеры и дендримеры различной химической природы, а также природные гликопротеины и полисахариды.

Одновалентные производные моносахаридов

Многие производные моносахаридов связываются с лектинами *P. aeruginosa* с большей аффинностью, чем исходные сахара. Например, даже небольшие гидрофобные заместители по первому атому кислорода увеличивают сродство соответствующих сахаров как к ЛесА, так и к ЛесВ. Так, константа диссоциации комплекса ЛесА с ИПТГ почти в 3 раза меньше, чем с *D*-галактозой [59, 60], а комплекса ЛесВ с метил- α -*L*-фукозидом в 7 раз меньше, чем с немодифицированной *L*-фукозой [65].

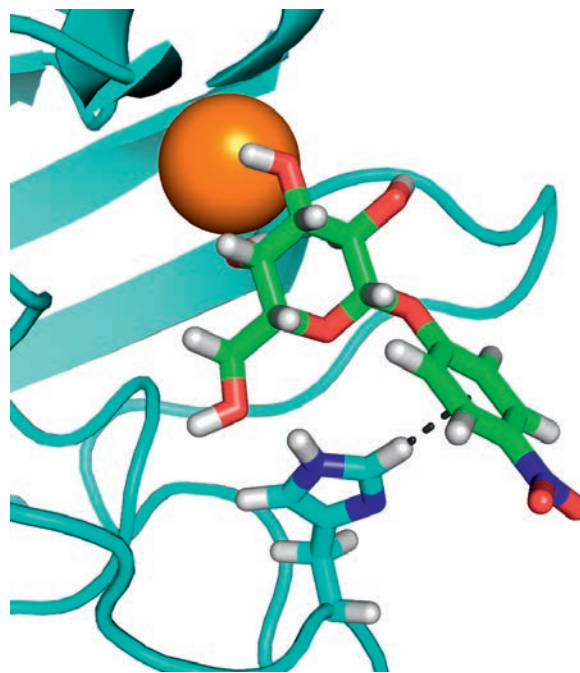


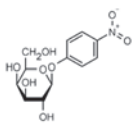
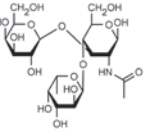
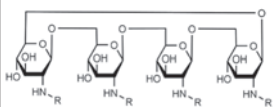
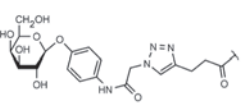

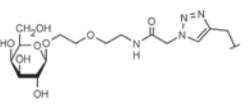
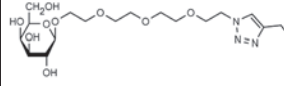
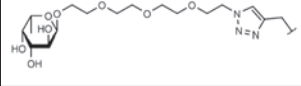
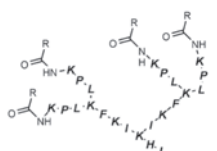
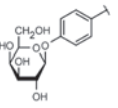
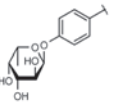
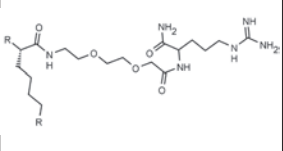
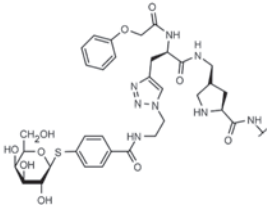

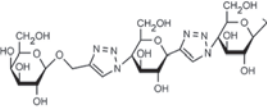
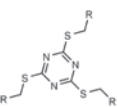
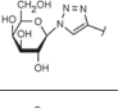
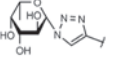
Рис. 4. Комплекс нитрофенилгалактозида с ЛесА. Нитрофенилгалактозид и боковая цепь остатка His50 ЛесА показаны скелетной моделью, черной пунктирной линией показано СН- π -взаимодействие

Еще большего повышения сродства галактозидов к ЛесА можно добиться за счет введения простых ароматических заместителей. У таких соединений, как фенилгалактозид, *n*-нитрофенилгалактозид (таблица, соединение 1), *n*-аминофенилгалактозид, *n*-толилгалактозид, нафтилгалактозид и др., K_d с ЛесА составляет 4–15 мкМ (напомним, K_d незамещенной *D*-галактозы равна почти 90 мкМ) [68]. Это связано с образованием π -системой ароматического кольца контакта с атомом водорода на ϵ -углероде гистидина 50 ЛесА (рис. 4). Такой тип взаимодействия называется СН- π -взаимодействием, его энергия составляет примерно 1 ккал/моль. Для сравнения, энергия взаимодействия ЛесА с *D*-галактозой равна 6.0 ккал/моль. По механизму такое взаимодействие сходно с водородной связью, однако в качестве акцептора водорода выступает не электроотрицательный атом с неподеленной электронной парой, а ароматическая система π -электронов [68]. Введение алифатических заместителей либо ароматических заместителей, отделенных от галактозы алифатическим линкером, препятствующим образованию СН- π -взаимодействия, дает значительно меньший прирост аффинности [68–71].

В случае лектина ЛесВ подобной простой закономерности не обнаружено. Среди одновалентных

ОБЗОРЫ

Некоторые наиболее эффективные ингибиторы лектинов *P. aeruginosa*

Номер	Химическая формула матрицы (для мультивалентных соединений)	Химическая формула функциональной группы	Лектин-мишень, ссылка	Валентность	Аффинность (ITC: K_d ; ELLA: IC ₅₀)	Улучшение аффинности по сравнению с моносахаридом (в скобках – в пересчете на один моносахарид)
1			LecA, [59]	1	ITC: 14.1 мкМ	ITC: 6 (6)
2			LecB, [32]	1	ELLA: 0.51 мкМ; ITC: 0.2 мкМ	ELLA: 12 (12) ITC: 14 (14)
3			LecA, [71]	4	ELLA: 57 нМ; ITC: 79 нМ	ELLA: 1210 (300) ITC: 1114 (278)
4			LecA, [70]	4	ELLA: 7 мкМ; SPR: 1.0 мкМ; ITC: 90 нМ	ELLA: 50 (12) SPR: 58 (14) ITC: 978 (244)
5			LecA, [40,80]	4	SPR: 500 нМ ITC: 176 нМ	SPR: 143 (35) ITC: 500 (125)
6			LecB, [40]	4	ITC: 48 нМ	ITC: 60 (15)
7			LecA, [59]	4	ITC: 0.1 мкМ	ITC: 880 (220)
8			LecB, [46]	4	ELLA: 0.14 мкМ	ELLA: 79 (20)
9			LecA, [91]	2	ITC: 82 нМ	ITC: 1073 (537)
10			LecA, [89]	2	Ингибирование связывания FITC-LecA, IC ₅₀ : 2.7 нМ; ITC: 28 нМ	Ингибирование связывания FITC-LecA: 7407 (3703) ITC: 3143 (1572)
11			LecA, [79]	3	ITC: 1.1 мкМ	ITC: 80 (27)
12			LecB, [79]	3	ITC: 50 мкМ	ITC: 0.6 (0.2)

лигандов наибольшим сродством к LecB обладает олигосахарид Le^a (таблица, соединение 2) [32]. K_d комплекса LecB с Le^a составляет 210 нМ, в то время как у комплекса с *L*-фукозой – 2.9 мкМ. Хотя было предпринято несколько попыток разработать более аффинные, чем Le^a, лиганды, эта цель так и не была достигнута. Так, различные производные дисахарида α -*L*-Fuc-(1→4)- β -*D*-GlcNAc – составной части Le^a – обладали таким же сродством к LecB, как и сам Le^a. Анализ кристаллической структуры комплекса показал, что введенные заместители просто не участвуют в образовании каких-либо контактов с белком [72]. Была создана серия фукозиламидов, где первый атом кислорода фукозы заменен на атом азота амидной группы, несущей различные достаточно большие заместители несахарной природы [73]. Все соединения связывались с LecB с константами диссоциации 0.68–2.1 мкМ, что не дает какого-либо улучшения по сравнению с Le^a и даже метилфукозидом. Это объясняется неспособностью амидной группы взаимодействовать с консервативной молекулой воды, участвующей в связывании лигандов лектином LecB. Наконец Хауком и соавт. [74] создано несколько классов производных метил-*D*-маннозида – другого сахара, связывающегося с LecB с меньшей, чем фукоза, аффинностью ($K_d = 71$ мкМ). Некоторые амидные и сульфонамидные производные по шестому положению маннозы показали значительный прирост аффинности. Так, K_d для одного из сульфонамидов была равна 3.3 мкМ. Хотя это более чем в 20 раз лучше по сравнению с исходным метилманнозидом, никакого улучшения по сравнению с фукозой и, тем более Le^a, добиться не удалось.

Таким образом, на данный момент не существует одновалентных лигандов, более чем на один порядок превосходящих немодифицированные моносахариды по своему сродству к лектинам. Отчасти в связи с этим многие исследователи сосредоточили свое внимание на создании мультивалентных ингибиторов.

Мультивалентные соединения

Как правило, лектины, независимо от растительного, животного или бактериального происхождения, связывают сахара с достаточно низкой аффинностью [75]. Преодолеть это ограничение позволяет мультивалентность как самих лектинов, так и их лигандов. Под мультивалентностью подразумевается наличие в одной молекуле или молекулярном комплексе нескольких одинаковых сайтов связывания. Например, лектины могут быть организованы в гомомультимерные белковые комплексы, а гликопротеины – рецепторы лектинов, могут нести несколько одинаковых гликановых цепей, связываемых лектинами.

Подобная мультивалентность позволяет добиться значительного повышения аффинности и специфичности взаимодействия лектинов с гликанами за счет нескольких механизмов. Во-первых, в некоторых случаях несколько сайтов мультивалентного лектина могут связывать несколько эпитопов мультивалентного лиганда одновременно. Подобное взаимодействие называют хелатирующим, или «bridging». Во-вторых, даже при невозможности одновременного связывания наличие нескольких эпитопов, способных взаимодействовать с лектином, на одной молекуле-лиганде повышает локальную концентрацию этих эпитопов. При диссоциации комплекса лектина с одним эпитопом лектин имеет большую вероятность связаться с другим аналогичным эпитопом, расположенным рядом. Такой механизм «перехватывания» лиганда называется в англоязычной литературе «statistical rebinding» [76, 77]. В последнее время эти эффекты все чаще используются при создании мультивалентных соединений, ингибирующих действие лектинов – гликокластеров, гликодендримеров и гликополимеров [76, 78].

Лектины *P. aeruginosa* не стали исключением. Для обоих лектинов этого патогена, особенно для LecA, создано большое количество соединений, относящихся к разным химическим классам, с разной валентностью, различными линкерами между сахаром и основой мультивалентного соединения. В качестве мультивалентных ингибиторов LecA были предложены гликокластеры на основе тритиоциануровой кислоты [79], каликсаренов и резорцинаренов [40, 70, 80–82], линейных и циклических β -пептоидов, порфирина [81], фуллеренов [83] и циклоолигосахаридов [71], функционализированные остатками галактозы полифенилацетиленовые полимеры [84] и золотые наночастицы [85], дендримеры пептидной [59, 86] и непептидной природы [87, 88] и двухвалентные соединения [89–91]. В качестве ингибиторов LecB – синтетические олигомеры на основе пентаэритритилфосфодиэфиров [92], дендримеры на основе лизинов и циклопептидов [93], на основе *D*- и *L*-олигопептидов [46, 94, 95], гликокластеры на основе тритиоциануровой кислоты [79] и каликсаренов [40], а также двух- и трехвалентные соединения, функционализированные не фукозой, а дисахаридом α -*L*-Fuc-(1→4)- β -*D*-GlcNAc [96].

У многих из этих соединений значительно увеличено сродство к соответствующему лектину (в опытах по ИТС, Isothermal Titration Calorimetry) и эффективность в подавлении связывания лектина с иммобилизованными сахарами (в ELLA, Enzyme-Linked Lectin Assay). Так, галактозилированные гликокластеры на основе циклических олигосахаридов (таблица, соединение 3) [71] и каликсаренов (табли-

ца, соединение 4) [70], олигопептидный дендример (таблица, соединение 7) [59], а также двухвалентный лиганд, отобранный в ходе скрининга библиотеки из 625 соединений (таблица, соединение 9) [91] имели K_d с LecA порядка 80–100 нМ, что почти в 1000 раз меньше K_d галактозы. Наибольшим же сродством к LecA на настоящий момент обладает двухвалентный лиганд, в котором два остатка галактозы соединены жестким линкером длиной порядка 24 Å, его K_d равна 28 нМ (таблица, соединение 10) [90]. Согласно результатам молекулярного моделирования, все эти лиганды способны связывать два мономера одного тетрамера LecA, обеспечивая хелатирующий эффект, которым, вероятно, объясняется столь значительное увеличение аффинности. При этом у тетрамера LecB сайты связывания фукозы соседних мономеров находятся гораздо дальше друг от друга (~26–28 Å у LecA и не менее 35–37 Å у LecB), и увеличение сродства за счет мультивалентности у ингибиторов LecB значительно меньше.

Несмотря на огромное разнообразие синтезированных мультивалентных соединений, изучению их влияния на бактериальные клетки, их адгезию или образование биопленок посвящено сравнительно немного работ. Способностью подавлять образование биопленок обладают олигопептидные дендримеры. Один из таких дендримеров, GalAG2 (таблица, соединение 7) с четырьмя остатками галактозы, практически полностью ингибировал образование биопленок *P. aeruginosa* на стальных пластинках, а также способствовал разрушению уже сформированных биопленок. К сожалению, попытки оптимизировать аминокислотную последовательность олигопептида привели лишь к небольшому улучшению его способности разрушать сформировавшиеся биопленки, но не подавлять их рост [59, 86]. Аналогичные фукозилированные пептидные дендримеры были синтезированы как ингибиторы LecB (таблица, соединение 8) [46, 94]. Четырехвалентный дендример FD2 эффективно подавлял образование биопленок стандартным штаммом PAO1, а также тремя клиническими изолятами, но не штаммом, мутантным по гену *lecB*, и, как и GalAG2, способствовал разрушению уже сформированных биопленок. Способностью подавлять образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 обладали также четырехвалентные гликокластеры на основе каликсаренов, функционализированных галактозой и фукозой (таблица, соединения 5 и 6) [40]. Интересно, что эти гликокластеры подавляли рост биопленок не только штамма PAO1, но и мутантов по генам *lecA* и *lecB*, что говорит о возможном действии этих соединений и на другие мишени. Те же гликокластеры подавляли адгезию бактерий к клеткам линии A549 на 70 и 90% (галактозилированный

и фукозилированный гликокластеры соответственно), и это подавление было более значительным, чем при инактивации генов *lecA* или *lecB*, что также говорит о вероятности воздействия на другие мишени. Трехвалентные гликокластеры на основе тритиоциануровой кислоты, функционализированные как галактозой, так и фукозой (таблица, соединения 11 и 12), также обладают способностью подавлять образование биопленок. Хотя аффинность этих гликокластеров к соответствующим лектинам значительно ниже, их эффективные концентрации, подавляющие образование биопленок, такие же, как и у каликсаренов (5 мМ). В работе же Новои и соавт. [91] показано, что двухвалентный лиганд LecA (таблица, соединение 9) в концентрации 0.05–5 мкМ способен предотвращать проникновение *P. aeruginosa* внутрь клеток H1299 на 50–80%, хотя дозовой зависимости не выявлено.

Природные соединения

Способность связывать лектины *P. aeruginosa* выявлена не только у химически синтезированных соединений, но и у многих природных веществ. К сожалению, большинство этих веществ не были разделены на компоненты, и о природе их активных составляющих можно говорить лишь предположительно. Кроме того, способность взаимодействовать с лектинами была показана, как правило, только методами гемагглютинации и вестерн-блот-гибридизации без использования более надежных количественных методов.

С помощью гемагглютинации и вестерн-блот-гибридизации установлено, что с лектинами *P. aeruginosa* способны взаимодействовать белки голубиных и перепелиных яиц [97, 98], компоненты меда и маточного молочка [99], молока человека и некоторых других млекопитающих [66, 100], экстракты семян нескольких съедобных растений [101].

Двумя независимыми группами показано, что гемагглютинация, вызванная лектином LecA, подавляется галактоманнами – полисахаридами растительного происхождения, состоящими из линейных цепочек поли-(1→4)-маннозы, с остатками галактозы, присоединенными к некоторым остаткам маннозы 1→6-гликозидной связью [57, 102]. Кроме того, галактоманнан гуара, но не глюкан овса и некоторые другие растительные полисахариды, подавляли образование биопленок клиническим изолятом *P. aeruginosa* [102]. Предположительно, действие галактоманнана, как и пептидных дендримеров, основано на эффекте мультивалентности.

ИНГИБИРОВАНИЕ ЛЕКТИНОВ *IN VIVO*

Положительный эффект ингибирования лектинов LecA и LecB показан не только в экспериментах *in*

vitro: применение моносахаридов, специфичных к лектинам, а также синтетических ингибиторов изучали в животных моделях инфекции. Кроме того, описаны единичные случаи применения моносахаридов в клинической практике.

Так, в вышеописанных экспериментах на модели кишечной инфекции у мышей, подвергнутых гепатэктомии 30% печени, инъекция 10^7 КОЕ *P. aeruginosa* в слепую кишку приводила к 100% смертности, как и инъекция комбинации лектина LecA и экзотоксина А. Однако добавление к инъекционной смеси 13% N-ацетилгалактозамина снижало в обоих случаях смертность практически до нуля [55]. Эффект от добавления простых сахаров – лигандов лектинов, наблюдали и в мышинной модели легочной инфекции [39]. Внутритрахеальная инъекция *P. aeruginosa* PAO1 приводила к повышенной проницаемости легочного эпителия, накоплению в легких жидкости, а также диссеминации бактерий по организму. При этом заражение штаммами, мутантными по *lecA* или *lecB*, в значительно меньшей степени влияло на проницаемость легких, а также приводило к меньшей обсемененности как легких, так и крови зараженных мышей, хотя и не улучшало выживаемость по сравнению с мышами, зараженными штаммом дикого типа. Добавление сахаров, связывающихся с LecA (N-ацетилгалактозамина и метил- α -галактозида) или LecB (метил- α -фукозида) в концентрациях 15–50 мМ, но не глюкозы, уменьшало негативные эффекты, вызванные инъекцией бактерий, и обсемененность легких и крови. Более того, метил- α -галактозид и N-ацетилгалактозамин способствовали улучшению выживаемости инфицированных мышей. В той же модели острой легочной инфекции у мышей исследовали эффективность синтетических ингибиторов лектинов – четырехвалентных галактозилированных и фукозилированных гликокластеров на основе каликсаренов (таблица, соединения 5 и 6) [40]. Как и следовало ожидать, гликокластеры оказались значительно более эффективными, чем моносахариды в тех же концентрациях (1–5 мМ), как в сохранении барьерной функции легких, так и в снижении обсемененности легких и селезенки. Так, проницаемость легких для меченого альбумина при добавлении гликокластеров оказалась такой же, как при инфекции штаммами, мутантными по генам лектинов [39], а обсемененность легких и селезенки снижалась на 1–3 порядка, при этом фукозилированный гликокластер был более эффективным. К сожалению, данные по выживаемости мышей не приводятся.

Описано также несколько случаев применения растворов сахаров для терапии инфекции *P. aeruginosa* у людей. Штойер и соавт. [103] показали эффектив-

ность применения раствора D-галактозы, D-маннозы и сиаловой кислоты при наружном отите, вызванном *P. aeruginosa*, хотя в данном случае эффект мог проявляться за счет ингибирования не только лектинов, но и других адгезинов. В другой работе описан случай излечения инфекции дыхательных путей у ребенка, перенесшего химиотерапию [104]. Применение антибиотиков не помогало устранению инфекции, в то время как добавление ингаляций раствора галактозы и фукозы способствовало полной элиминации патогена. Наконец Хаубер и соавт. проводили ингаляцию растворов тех же сахаров больным муковисцидозом, чьи легкие были хронически колонизированы *P. aeruginosa* [105]. Ингаляция раствора сахаров дважды в день в течение 21 дня приводила к значимому снижению количества бактерий в мокроте больных, а также подавляло экспрессию TNF α . К сожалению, значимого улучшения показателей функции легких не наблюдалось, что связывают с недостаточным размером выборки.

Хотя эффект от применения моносахаров в рассмотренных работах зачастую невелик, последние данные показывают, что применение мультивалентных соединений может позволить обойти это ограничение, и результаты этих работ убедительно подтверждают возможность достижения положительного результата за счет ингибирования лектинов *P. aeruginosa in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лектины LecA и LecB входят, по-видимому, в число факторов вирулентности *P. aeruginosa*, внося свой вклад в способность этого организма колонизировать ткани и органы человека и персистировать на них в составе биопленок, приводя к развитию хронических заболеваний, трудно поддающихся лечению. Оба лектина влияют на способность бактерий прикрепляться к эпителиальным клеткам человека, являются важным компонентом бактериальных биопленок, а также могут подавлять движение ресничек мерцательного эпителия и нарушать барьерные функции эпителиальной ткани. К сожалению, остается неясным, насколько каждая из этих функций лектинов важна при инфекции *in vivo*. Учитывая различную специфичность лектинов, нельзя исключить и того, что LecA и LecB *P. aeruginosa* выполняют разные функции при инфицировании организма человека. Однако вне зависимости от того, какова настоящая функция лектинов, применение соответствующих моносахаридов и мультивалентных гликокластеров в животных моделях инфекции *P. aeruginosa* убедительно показывает положительный эффект ингибирования обоих лектинов, что подтверждается и клиническими данными.

Среди множества ингибиторов лектинов наиболее перспективными представляются соединения, использующие эффект мультивалентности для достижения более высокого сродства к своей мишени. Отчасти это связано с мультивалентностью самих лектинов – соединения, несущие несколько аффинных групп, могли бы связывать два мономера из одного тетрамера одновременно. С помощью молекулярного моделирования показано, что такой способностью в принципе могут обладать некоторые соединения. Обнаружена способность нескольких классов таких мультивалентных соединений подавлять развитие биопленок *P. aeruginosa* и/или препятствовать адгезии бактерий к эпителиальным клеткам, а также положительный эффект четырехвалентных гликокластеров на основе каликсаренов в модели острой легочной инфекции *in vivo*.

Большая часть мультивалентных ингибиторов лектинов представлена синтетическими гликодендимерами и гликокластерами. Стоимость и сложность синтеза многих из них может оказаться существенным препятствием для дальнейшего продвижения по пути к доклиническим и, тем более, клиническим испытаниям. Кроме того, велика вероятность проявления нежелательных токсических эффектов, а также неоптимальных фармакокине-

тических свойств. С этой точки зрения более перспективными представляются природные нейтральные полисахариды, такие, как галактоманнан, либо олигосахариды, получаемые при их гидролизе. Растительные галактоманнаны широко применяются в пищевой промышленности, безопасны и исключительно дешевы. Однако эффективность природных полисахаридов, как и большинства синтетических гликокластеров и гликодендимеров, к настоящему времени не подтверждена на животных моделях инфекции. На наш взгляд, учитывая обнадеживающие результаты, полученные в экспериментах с каликсаренами, первостепенной задачей стоит считать дальнейшую проверку эффективности природных и синтетических мультивалентных соединений *in vivo* в различных моделях инфекции, возможно, в сочетании с традиционными антибиотиками. ●

Авторы благодарят Веру Гусакову за помощь в подготовке иллюстраций, а также Анну Ершову за внимательное прочтение рукописи и полезные замечания.

Работа частично поддержана грантом Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-2038.2014.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blanc D.S., Petignat C., Janin B., Bille J., Francioli P. // Clin. Microbiol. Infect. 1998. V. 4. № 5. P. 242–247.
2. Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., van Eldere J., Glupczynski Y., van Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., et al. // Clin. Microbiol. Infect. 2007. V. 13. № 6. P. 560–578.
3. Donlan R.M., Costerton J.W. // Clin. Microbiol. Rev. 2002. V. 15. № 2. P. 167–193.
4. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. № 2. P. 95–108.
5. Costerton J.W. // Science. 1999. V. 284. № 5418. P. 1318–1322.
6. Clatworthy A.E., Pierson E., Hung D.T. // Nat. Chem. Biol. 2007. V. 3. № 9. P. 541–548.
7. Gilboa-Garber N. // FEBS Lett. 1972. V. 20. № 2. P. 242–244.
8. Gilboa-Garber N., Mizrahi L., Garber N. // Can. J. Biochem. 1977. V. 55. № 9. P. 975–981.
9. Gilboa-Garber N. // Methods Enzymol. 1982. V. 83. № 1980. P. 378–385.
10. Avichezer D., Katcoff D.J., Garber N.C., Gilboa-Garber N. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 32. P. 23023–23027.
11. Gilboa-Garber N., Katcoff D.J., Garber N.C. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000. V. 29. P. 53–57.
12. Cioci G., Mitchell E.P., Gautier C., Wimmerová M., Sudakevitz D., Pérez S., Gilboa-Garber N., Imberty A. // FEBS Lett. 2003. V. 555. № 2. P. 297–301.
13. Mitchell E., Houles C., Sudakevitz D., Wimmerova M., Gautier C., Pérez S., Wu A.M., Gilboa-Garber N., Imberty A. // Nat. Struct. Biol. 2002. V. 9. № 12. P. 918–921.
14. Winzer K., Falconer C., Garber N.C., Diggle S.P., Camara M., Williams P. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 22. P. 6401–6411.
15. Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Cámara M., Williams P. // Mol. Microbiol. 2003. V. 50. № 1. P. 29–43.
16. Bjarnsholt T., Tolker-Nielsen T., Høiby N., Givskov M. // Expert Rev. Mol. Med. 2010. V. 12. e11.
17. Pessi G., Williams F., Hindle Z., Heurlier K., Holden M.T., Cámara M., Haas D., Williams P. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 22. P. 6676–6683.
18. Diggle S.P., Winzer K., Lazdunski A., Williams P., Camara M. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 10. P. 2576–2586.
19. Wu L., Estrada O., Zaborina O., Bains M., Shen L., Kohler J.E., Patel N., Musch M.W., Chang E.B., Fu Y.-X., et al. // Science. 2005. V. 309. № 5735. P. 774–777.
20. Kipnis E., Sawa T., Wiener-Kronish J. // Médecine Mal. Infect. 2006. V. 36. № 2. P. 78–91.
21. Alverdy J., Holbrook C., Rocha F., Seiden L., Wu R.L., Musch M., Chang E., Ohman D., Suh S. // Ann. Surg. 2000. V. 232. № 4. P. 480–489.
22. Kohler J.E., Zaborina O., Wu L., Wang Y., Bethel C., Chen Y., Shapiro J., Turner J.R., Alverdy J.C. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2005. V. 288. № 5. P. G1048–1054.
23. Zaborina O., Lepine F., Xiao G., Valuckaite V., Chen Y., Li T., Ciancio M., Zaborin A., Petrof E.O., Petroff E., et al. // PLoS Pathog. 2007. V. 3. № 3. e35.
24. Glick J., Garber N. // J. Gen. Microbiol. 1983. V. 129. № 10. P. 3085–3090.
25. Tielker D., Hacker S., Loris R., Strathmann M., Wingender J., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K.-E. // Microbiology. 2005. V. 151. Pt 5. P. 1313–1323.
26. Funken H., Bartels K.-M., Wilhelm S., Bocker M., Bott M.,

- Bains M., Hancock R.E.W., Rosenau F., Jaeger K.-E. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 10. e46857.
27. Fito-Boncompte L., Chapalain A., Bouffartigues E., Chaker H., Lesouhaitier O., Gicquel G., Bazire A., Madi A., Connil N., Véron W., et al. // *Infect. Immun.* 2011. V. 79. № 3. P. 1176–1186.
28. Gilboa-Garber N., Sudakevitz D., Sheffi M., Sela R., Levene C. // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11. № 5. P. 414–417.
29. Lanne B., Ciopraga J., Bergström J., Motas C., Karlsson K.A. // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11. № 4. P. 292–298.
30. Chen C.P., Song S.C., Gilboa-Garber N., Chang K.S., Wu A.M. // *Glycobiology*. 1998. V. 8. № 1. P. 7–16.
31. Blanchard B., Nurisso A., Hollville E., Tétaud C., Wiels J., Pokorná M., Wimmerová M., Varrot A., Imberty A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 383. № 4. P. 837–853.
32. Perret S., Sabin C., Dumon C., Pokorná M., Gautier C., Galanina O., Ilia S., Bovin N., Nicaise M., Desmadril M., et al. // *Biochem. J.* 2005. V. 389. Pt 2. P. 325–332.
33. Kirkeby S., Hansen A.K., d'Apice A., Moe D. // *Microb. Pathog.* 2006. V. 40. № 5. P. 191–197.
34. Kirkeby S., Wimmerová M., Moe D., Hansen A.K. // *Microbes Infect.* 2007. V. 9. № 5. P. 566–573.
35. Imberty A., Wimmerová M., Mitchell E.P., Gilboa-Garber N. // *Microbes Infect.* 2004. V. 6. № 2. P. 221–228.
36. Wentworth J.S., Austin F.E., Garber N., Gilboa-Garber N., Paterson C.A., Doyle R.J. // *Biofouling*. 1991. V. 4. № 1–3. P. 99–104.
37. Rebiere-Huët J., Di Martino P., Hulen C. // *Can. J. Microbiol.* 2004. V. 50. № 5. P. 303–312.
38. Sonawane A., Jyot J., Ramphal R. // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. № 12. P. 7035–7039.
39. Chemani C., Imberty A., de Bentzmann S., Pierre M., Wimmerová M., Guery B.P., Faure K. // *Infect. Immun.* 2009. V. 77. № 5. P. 2065–2075.
40. Boukerb A.M., Rousset A., Galanos N., Méar J.-B., Thépaut M., Grandjean T., Gillon E., Cecioni S., Abderrahmen C., Faure K., et al. // *J. Med. Chem.* 2014. V. 57. № 24. P. 10275–10289.
41. Nosková L., Kubíčková B., Vašková L., Bláhová B., Wimmerová M., Stiborová M., Hodek P. // *Sensors*. 2015. V. 15. № 1. P. 1945–1953.
42. Eierhoff T., Bastian B., Thuenauer R., Madl J., Audfray A., Aigal S., Juillot S., Rydell G.E., Müller S., de Bentzmann S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 35. P. 12895–12900.
43. Scharfman A., Arora S.K., Delmotte P., van Brussel E., Mazurier J., Ramphal R., Roussel P. // *Infect. Immun.* 2001. V. 69. № 9. P. 5243–5248.
44. Hahn H.P. // *Gene*. 1997. V. 192. № 1. P. 99–108.
45. Diggle S.P., Stacey R.E., Dodd C., Cámara M., Williams P., Winzer K. // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8. № 6. P. 1095–1104.
46. Johansson E.M.V., Cruz S.A., Kolomiets E., Buts L., Kadam R.U., Cacciarini M., Bartels K.-M., Diggle S.P., Cámara M., Williams P., et al. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. № 12. P. 1249–1257.
47. Ma L., Lu H., Sprinkle A., Parsek M.R., Wozniak D.J. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 22. P. 8353–8356.
48. Byrd M.S., Sadovskaya I., Vinogradov E., Lu H., Sprinkle A.B., Richardson S.H., Ma L., Ralston B., Parsek M.R., Anderson E.M., et al. // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 73. № 4. P. 622–638.
49. Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M.R., Bayles K., Wozniak D.J. // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. № 3. e1000354.
50. Bajolet-Laudinat O., Girod-De Bentzmann S.G., Tournier J.M., Madoulet C., Plotkowski M.C., Chippaux C., Puchelle E. // *Infect. Immun.* 1994. V. 62. № 10. P. 4481–4487.
51. Mewe M., Tielker D., Schönberg R., Schachner M., Jaeger K.-E., Schumacher U. // *J. Laryngol. Otol.* 2005. V. 119. № 8. P. 595–599.
52. Gustke H., Kleene R., Loers G., Nehmann N., Jaehne M., Bartels K.-M., Jaeger K.-E., Schachner M., Schumacher U. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. V. 31. № 2. P. 207–215.
53. Adam E.C., Mitchell B.S., Schumacher D.U., Grant G., Schumacher U. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997. V. 155. № 6. P. 2102–2104.
54. Adam E.C., Schumacher D.U., Schumacher U. // *J. Laryngol. Otol.* 1997. V. 111. № 8. P. 760–762.
55. Laughlin R.S., Musch M.W., Hollbrook C.J., Rocha F.M., Chang E.B., Alverdy J.C. // *Ann. Surg.* 2000. V. 232. № 1. P. 133–142.
56. Wu L., Holbrook C., Zaborina O., Ploplys E., Rocha F., Pelham D., Chang E., Musch M., Alverdy J. // *Ann. Surg.* 2003. V. 238. № 5. P. 754–764.
57. Zinger-Yosovich K.D., Gilboa-Garber N. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. № 15. P. 6908–6913.
58. Nurisso A., Blanchard B., Audfray A., Rydner L., Oscarson S., Varrot A., Imberty A. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 26. P. 20316–20327.
59. Kadam R.U., Bergmann M., Hurley M., Garg D., Cacciarini M., Swiderska M.A., Nativi C., Sattler M., Smyth A.R., Williams P., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011. V. 50. № 45. P. 10631–10635.
60. Garber N., Guempel U., Belz A., Gilboa-Garber N., Doyle R.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992. V. 1116. № 3. P. 331–333.
61. Stoitsova S.R., Boteva R.N., Doyle R. // *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 2003. V. 1619. № 2. P. 213–219.
62. Boteva R.N., Bogoeva V.P., Stoitsova S.R. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1747. № 2. P. 143–149.
63. Loris R., Tielker D., Jaeger K.-E., Wyns L. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 331. № 4. P. 861–870.
64. Garber N., Guempel U., Gilboa-Garber N., Doyle R. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1987. V. 48. № 3. P. 331–334.
65. Sabin C., Mitchell E.P., Pokorná M., Gautier C., Utile J.-P., Wimmerová M., Imberty A. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. № 3. P. 982–987.
66. Lesman-Movshovich E., Lerrer B., Gilboa-Garber N. // *Can. J. Microbiol.* 2003. V. 49. № 3. P. 230–235.
67. Wu A.M., Wu J.H., Singh T., Liu J.-H., Tsai M.-S., Gilboa-Garber N. // *Biochimie*. 2006. V. 88. № 10. P. 1479–1492.
68. Kadam R.U., Garg D., Schwartz J., Visini R., Sattler M., Stocker A., Darbre T., Reymond J.-L. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 9. P. 1925–1930.
69. Rodrigue J., Ganne G., Blanchard B., Saucier C., Giguère D., Shiao T.C., Varrot A., Imberty A., Roy R. // *Org. Biomol. Chem.* 2013. V. 11. № 40. P. 6906–6918.
70. Cecioni S., Praly J.-P., Matthews S.E., Wimmerová M., Imberty A., Vidal S. // *Chemistry*. 2012. V. 18. № 20. P. 6250–6263.
71. Gening M.L., Titov D.V., Cecioni S., Audfray A., Gerbst A.G., Tsvetkov Y.E., Krylov V.B., Imberty A., Nifantiev N.E., Vidal S. // *Chemistry*. 2013. V. 19. № 28. P. 9272–9285.
72. Marotte K., Sabin C., Prévile C., Moumé-Pymbock M., Wimmerová M., Mitchell E.P., Imberty A., Roy R. // *ChemMedChem*. 2007. V. 2. № 9. P. 1328–1338.
73. Andreini M., Anderluh M., Audfray A., Bernardi A., Imberty A. // *Carbohydr. Res.* 2010. V. 345. № 10. P. 1400–1407.
74. Hauck D., Joachim I., Frommeyer B., Varrot A., Philipp B., Möller H.M., Imberty A., Exner T.E., Titz A. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 8. P. 1775–1784.
75. Dam T.K., Brewer C.F. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 2. P. 387–429.
76. Wittmann V., Pieters R.J. // *Chem. Soc. Rev.* 2013. V. 42. № 10. P. 4492–4503.

77. Dam T.K., Brewer C.F. // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 2010. V. 63. № 10. P. 139–164.
78. Imberty A., Chabre Y.M., Roy R. // *Chemistry*. 2008. V. 14. № 25. P. 7490–7499.
79. Smadhi M., de Bentzmann S., Imberty A., Gingras M., Abderrahim R., Goekjian P.G. // *Beilstein J. Org. Chem.* 2014. V. 10. P. 1981–1990.
80. Cecioni S., Lalor R., Blanchard B., Praly J.-P., Imberty A., Matthews S.E., Vidal S. // *Chemistry*. 2009. V. 15. № 47. P. 13232–13240.
81. Cecioni S., Faure S., Darbost U., Bonnamour I., Parrot-Lopez H., Roy O., Taillefumier C., Wimmerová M., Praly J.-P., Imberty A., et al. // *Chemistry*. 2011. V. 17. № 7. P. 2146–2159.
82. Soomro Z.H., Cecioni S., Blanchard H., Praly J.-P., Imberty A., Vidal S., Matthews S.E. // *Org. Biomol. Chem.* 2011. V. 9. № 19. P. 6587–6597.
83. Cecioni S., Oerthel V., Iehl J., Holler M., Goyard D., Praly J.-P., Imberty A., Nierengarten J.-F., Vidal S. // *Chemistry*. 2011. V. 17. № 11. P. 3252–3261.
84. Otsuka I., Blanchard B., Borsali R., Imberty A., Kakuchi T. // *ChemBioChem*. 2010. V. 11. № 17. P. 2399–2408.
85. Reynolds M., Marradi M., Imberty A., Penadés S., Pérez S. // *Chemistry*. 2012. V. 18. № 14. P. 4264–4273.
86. Kadam R.U., Bergmann M., Garg D., Gabrieli G., Stocker A., Darbre T., Reymond J.-L. // *Chemistry*. 2013. V. 19. № 50. P. 17054–17063.
87. Chabre Y.M., Giguère D., Blanchard B., Rodrigue J., Rocheleau S., Neault M., Rauthu S., Papadopoulos A., Arnold A.A., Imberty A., et al. // *Chemistry*. 2011. V. 17. № 23. P. 6545–6562.
88. Gerland B., Goudot A., Ligeour C., Pourceau G., Meyer A., Vidal S., Gehin T., Vidal O., Souteyrand E., Vasseur J.J., et al. // *Bioconjug. Chem.* 2014. V. 25. P. 379–392.
89. Pertici F., Pieters R.J. // *Chem. Commun. (Camb.)*. 2012. V. 48. № 33. P. 4008–4010.
90. Pertici F., de Mol N.J., Kemmink J., Pieters R.J. // *Chemistry*. 2013. V. 19. № 50. P. 16923–16927.
91. Novoa A., Eierhoff T., Topin J., Varrot A., Barluenga S., Imberty A., Römer W., Winssinger N. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V. 53. № 34. P. 8885–8889.
92. Morvan F., Meyer A., Jochum A., Sabin C., Chevolut Y., Imberty A., Praly J.-P., Vasseur J.-J., Souteyrand E., Vidal S. // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. № 5. P. 1637–1643.
93. Berthet N., Thomas B., Bossu I., Dufour E., Gillon E., Garcia J., Spinelli N., Imberty A., Dumy P., Renaudet O. // *Bioconjug. Chem.* 2013. V. 24. № 9. P. 1598–1611.
94. Kolomiets E., Swiderska M.A., Kadam R.U., Johansson E.M.V., Jaeger K.-E., Darbre T., Reymond J.-L. // *ChemMedChem*. 2009. V. 4. № 4. P. 562–569.
95. Johansson E.M.V., Kadam R.U., Rispoli G., Crusz S.A., Bartels K.-M., Diggle S.P., Cámara M., Williams P., Jaeger K.-E., Darbre T., et al. // *Med. Chem. Commun.* 2011. V. 2. № 5. P. 418–420.
96. Marotte K., Préville C., Sabin C., Moumé-Pymbock M., Imberty A., Roy R. // *Org. Biomol. Chem.* 2007. V. 5. № 18. P. 2953–2961.
97. Lerrer B., Gilboa-Garber N. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001. V. 32. № 1. P. 33–36.
98. Lerrer B., Gilboa-Garber N. // *Electrophoresis*. 2002. V. 23. № 1. P. 8–14.
99. Gilboa-Garber N., Zinger-Yosovich K., Lerrer B. // *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* 2009. V. 1. № 3. P. 82–89.
100. Zinger-Yosovich K.D., Iluz D., Sudakevitz D., Gilboa-Garber N. // *J. Dairy Sci.* 2010. V. 93. № 2. P. 473–482.
101. Rachmaninov O., Zinger-Yosovich K.D., Gilboa-Garber N. // *Nutr. J.* 2012. V. 11. № 1. P. 10.
102. Grishin A., Karyagina A.S., Tiganova I.G., Dobrynina O.Y., Bolshakova T.N., Boksha I.S., Alexeyeva N.V., Stepanova T.V., Lunin V.G., Chuchalin A.G., et al. // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2013. V. 42. № 5. P. 471–472.
103. Steuer M.K., Herbst H., Beuth J., Steuer M., Pulverer G., Matthias R. // *Oto-Rhino-Laryngologia Nov.* 1993. V. 3. № 1. P. 19–25.
104. von Bismarck P., Schneppenheim R., Schumacher U. // *Klin. Pädiatrie*. 2001. V. 213. № 5. P. 285–287.
105. Hauber H.-P., Schulz M., Pforte A., Mack D., Zabel P., Schumacher U. // *Int. J. Med. Sci.* 2008. V. 5. № 6. P. 371–376.

УДК 612.398:611.018.82

NeuN – нейрональный ядерный антиген и маркер дифференцировки нервных клеток

В. В. Гусельникова*, Д. Э. Коржевский

Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

*E-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.01.2015

РЕФЕРАТ Белок NeuN локализуется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме большинства нейронов центральной нервной системы млекопитающих. Моноклональные антитела к белку NeuN уже более 20 лет активно используются в иммуногистохимических исследованиях нейрональной дифференцировки для оценки состояния нервных клеток в норме и при патологии, а в последнее время и в дифференциальной морфологической диагностике онкологических заболеваний. При этом структура белка, выявляемого антителами к NeuN, до недавнего времени оставалась неизвестной, а функции этого белка не вполне понятны и на сегодняшний день. В представленном мини-обзоре обобщены и проанализированы сведения о белке NeuN: приведены данные о структуре и свойствах белка, его изоформах, внутриклеточной локализации и предполагаемых функциях, подробно описано применение метода иммуноцитохимической детекции белка NeuN в научных и клинических исследованиях, а также трудности, возникающие при интерпретации экспериментальных данных, и их возможные причины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА нейроны, нейрон-специфический маркер, ядерный белок NeuN.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИГХ – иммуногистохимический анализ; NeuN – neuronal nuclei (ядерный белок нервных клеток); shRNA – small hairpin RNA (малые РНК, образующие шпильки); MAP-2 – microtubule-associated protein 2 (белок, ассоциированный с микротрубочками 2); GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein (глиальный фибриллярный кислый белок); TUNEL – Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP (2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate) Nick-End Labeling (метод регистрации свободных 3'-концов ДНК); BrdU – bromodeoxyuridine (5-бромо-2'-дезоксисуридин).

ВВЕДЕНИЕ

В результате изучения протеома нервной ткани и иммуноцитохимических исследований органов нервной системы установлено, что нейроны содержат ряд специфических белков, появление которых в постмитотических клетках указывает на их нейрональную дифференцировку. Часть этих белков характерна только для определенных нейрональных типов. Так, тирозингидроксилаза, фермент, участвующий в синтезе катехоламинов, обнаруживается в популяциях собственно катехоламинергических нейронов и моноферментных нервных клетках, принимающих участие в синтезе катехоламинов [1, 2], а холин-ацетилтрансфераза позволяет маркировать холинергические нейроны [3]. Другие специфические белки присутствуют в подавляющем большинстве нейронов. Один из них – ядерный белок нервных клеток NeuN, который благодаря ряду свойств (прежде всего, ядерной локализации) часто применяется как маркер постмитотических нейронов [4–7]. Моноклональные антитела к белку NeuN уже более

20 лет активно используются в иммуногистохимических исследованиях нейрональной дифференцировки, для оценки состояния нервных клеток в норме и при патологии, а в последнее время и в дифференциальной морфологической диагностике онкологических заболеваний [8–10]. Однако до недавнего времени структура белка, выявляемого широко используемыми антителами к NeuN, оставалась неизвестной, а функции этого белка и сейчас не вполне понятны.

Цель нашей работы состояла в обобщении и анализе накопленных к настоящему времени сведений о белке NeuN. В обзоре приведены данные о структуре и свойствах белка, его изоформах, внутриклеточной локализации и предполагаемых функциях. Подробно описаны области применения метода иммуноцитохимической детекции белка NeuN в научных и клинических исследованиях, а также трудности, возникающие при интерпретации экспериментальных данных, и их возможные причины.

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА NeuN В КЛЕТКАХ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Ядерный белок нервных клеток – NeuN – был обнаружен в 1992 г., когда группе исследователей удалось получить моноклональные антитела (клон А60) к неизвестному до этого ядерному белку [11]. Всесторонний иммуногистохимический (ИГХ) анализ, показал, что экспрессия белка NeuN на протяжении всего онтогенеза связана исключительно с нервной тканью – этот маркер не выявлялся в других тканях, помимо нервной. Более того, данный белок никогда не обнаруживался в клетках глии, что позволило считать его специфическим маркером нейронов. Последующие исследования показали, что антитела к NeuN выявляют большинство типов нейронов во всей нервной системе за редким исключением. Так, клетки Кахаля–Ретциуса в неокортексе, ряд клеток мозжечка (включая клетки Пуркинье), нейроны нижних олив, клетки внутреннего ядерного слоя сетчатки, γ -мотонейроны в спинном мозге и клетки ганглиев симпатического ствола не окрашиваются иммуногистохимически антителами к NeuN. Имеются также противоречивые данные об экспрессии NeuN в клетках черного вещества головного мозга [12–14]. Причины отсутствия NeuN-иммунореактивности в определенных типах нервных клеток не установлены. Например, нейроны нижних олив, как считается, имеют общее происхождение с нейронами основания моста, но последние обнаруживают при этом высокую иммунореактивность к NeuN на протяжении практически всего онтогенеза, в то время как нейроны нижних олив NeuN-иммунонегативны как в эмбриональном, так и в постнатальном периоде развития [15]. Таким образом, иммунореактивность по NeuN, по-видимому, отражает какую-то другую сторону биологии клетки, нежели близкое родство в эмбриональном нейрогенезе.

Считается, что NeuN появляется на ранних этапах эмбрионального развития в постмитотических нейробластах и сохраняется в дифференцирующихся и терминально дифференцированных нейронах на протяжении всего последующего онтогенеза. Связывание антител к белку NeuN приурочено преимущественно к ядрам клеток и в меньшей степени – к области перинуклеарной цитоплазмы [11]. Показано, что две предполагаемые изоформы белка NeuN – 46 и 48 кДа – присутствуют в обеих локализациях, но различаются по относительной концентрации в ядре и в цитоплазме. Так, в ядре приблизительно в равной степени представлены обе изоформы белка и лишь иногда преобладает изоформа с молекулярной массой 46 кДа, в то время как в цитоплазме преобладающей всегда оказывается изоформа с мо-

лекулярной массой 48 кДа. Предполагают, что изоформы NeuN различаются короткой аминокислотной последовательностью, ответственной за локализацию различных вариантов этого белка в клетке [16].

В ядре NeuN располагается преимущественно в областях с низкой плотностью хроматина и отсутствует в местах с плотной упаковкой ДНК [16]. Большая часть внутриядерного NeuN связана с ядерным матриксом [17]. Данные хроматографии ядерных белков мозга свидетельствуют о способности белка NeuN связываться с ДНК [11]. Остается не до конца понятным, насколько специфично это связывание, и связывается ли NeuN с ДНК в условиях *in vivo*. Ядерная локализация белка NeuN, его ДНК-связывающие свойства, показанные *in vitro*, а также растворимость этого белка позволили предположить, что NeuN является нейроспецифической регуляторной молекулой, функционирующей на уровне клеточного ядра [11]. Более поздние исследования [17] подтвердили правомерность сделанного предположения, однако более важным свойством NeuN сейчас считается способность связываться не с ДНК, а с РНК [18]. Тем не менее тот факт, что экспрессия NeuN связана с нейрональной дифференцировкой и сохраняется в течение всей жизни клетки, может указывать на NeuN как на постоянный регулятор общих проявлений нейронального фенотипа. В этом случае отсутствие экспрессии NeuN в отдельных нейрональных популяциях предполагает наличие у таких клеток альтернативных, но функционально сходных с NeuN регуляторных молекул. Подобное допущение согласуется с общими представлениями о том, что в столь сложно организованной системе, как нервная система позвоночных животных, должно быть представлено разнообразие альтернативных регуляторных механизмов, обеспечивающих многосторонний контроль процессов дифференцировки нервных элементов и формирования органов нервной системы.

Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о том, что интенсивность иммуногистохимической реакции на NeuN в ядре и цитоплазме может различаться как в пределах нервных клеток одного типа, так и между нейронами разного типа. Так, при исследовании распределения белка NeuN в клетках черного вещества головного мозга крысы было обнаружено, что в части нейронов он слабо экспрессирован, а в части нервных клеток полностью отсутствует [12]. У человека популяция нейронов черного вещества также неоднородна по распределению NeuN. Отмечено присутствие как слабо иммунопозитивных, так и иммунонегативных клеток [13]. Нейроны черного вещества различаются как по способности окрашиваться при постановке иммуногистохимической реакции на NeuN,

так и по содержанию в их цитоплазме нейромеланина. Выявлены нейроны, содержащие нейромеланин и белок NeuN, нейроны, содержащие нейромеланин, но не дающие реакцию на белок NeuN, и нейроны, не содержащие нейромеланин, но содержащие NeuN. Интересно, что концентрация белка NeuN в нейронах черного вещества значительно ниже, чем в нейронах анатомически близко расположенных к черному веществу красного ядра и других областях головного мозга человека [13].

Несмотря на подробное определение экспрессии NeuN в нейронах черного вещества у лабораторных животных и человека, можно констатировать, что, в целом, четкая корреляция между интенсивностью NeuN-иммунореактивности и определенным типом нервных клеток не выявлена. Очевидно, что различия в интенсивности реакции на NeuN отражают различия в экспрессии данного белка в клетке, связанные как с конститутивными особенностями нейрона, так и с его функциональным состоянием. Так, интенсивность иммуноцитохимической реакции на NeuN закономерно изменяется в ходе стимуляции клеток первичной нейрональной культуры [19]. Различное влияние на экспрессию белка NeuN в клетке могут оказывать повреждения нервной системы. Например, аксональное повреждение приводит к почти полной потере NeuN-иммунореактивности в мотонейронах ядра лицевого нерва, в то время как транссекция руброспинального тракта приводит только к небольшому снижению иммунореактивности NeuN в нейронах красного ядра [20]. В последнем случае менее выраженные изменения могут быть обусловлены более дистальной перерезкой аксонов, имеющих достаточно коллатералей.

Сложность интерпретации результатов иммуноцитохимического окрашивания на белок NeuN состоит в том, что отрицательный результат реакции может объясняться несколькими причинами. С одной стороны, это может быть следствием отсутствия экспрессии белка NeuN в клетке или синтезом белка в столь малом количестве, что он не может быть определен методами иммуногистохимии. С другой стороны, имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о влиянии фосфорилирования белка NeuN на его способность к связыванию с известными антителами к NeuN [16]. Показано, что существует семь посттрансляционных модификаций (форм) белка NeuN, фосфорилированных в разной степени. В экспериментах по ферментативному дефосфорилированию показано, что антитела к белку NeuN (клон А60) распознают только фосфорилированные формы белка, и необходимо присутствие по меньшей мере одной фосфатной группы в молекуле NeuN для надлежащего формирования антигенной детерминанты, рас-

познаваемой этими антителами [16]. В дальнейшем было высказано предположение о том, что эпитоп для связывания антител в нефосфорилированном белке NeuN участвует в белок-белковых взаимодействиях, вследствие чего он оказывается замаскированным и не способен связываться с антителами [21]. Косвенным подтверждением этой гипотезы служит тот факт, что упомянутый эпитоп имеет богатые пролином аминокислотные последовательности, которые принято считать главными участниками белок-белковых взаимодействий в клетке [22].

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА БЕЛКА NeuN/Fox-3

Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок NeuN, долгое время оставалась неизвестной. В 2009 г. группой исследователей из США [23] был проведен масс-спектрометрический анализ пептидов, полученных в результате трипсинизации белка, реагирующего с антителами к NeuN (клон А60). В результате была установлена первичная структура белка Fox-3, состоящего из 374 аминокислот, который может существовать в четырех изоформах, образующихся при альтернативном сплайсинге мРНК. Kim и соавт. [23] показали, что белок, реагирующий с антителами к Fox-3, взаимодействует с тканевыми антигенами так же, как известные антитела к NeuN. Характер окрашивания внутриклеточных структур при проведении реакции с антителами к Fox-3 полностью совпадает с результатами иммуноцитохимической реакции на NeuN. Было также показано, что экспрессия белка NeuN уменьшается при использовании малых РНК, образующих шпильки (shRNA) против Fox-3. Наконец оказалось, что Fox-3, как и NeuN, экспрессируется только в нервной ткани. Основываясь на этих экспериментальных данных, авторы сделали вывод о том, что белок NeuN является продуктом гена Fox-3, который принадлежит семейству генов Fox-1. Эта работа [23], выполненная на высоком методическом уровне с использованием современных молекулярно-генетических, цитологических и гистологических методов, внесла существенный вклад в понимание молекулярной природы антигенной детерминанты, с которой связываются антитела А60. Большинство авторов, изучающих NeuN, разделяют точку зрения Kim об идентичности антигена NeuN и белка Fox-3, о чем свидетельствуют и многочисленные ссылки на эту работу (89 на декабрь 2014 г.) из статей, реферируемых в базах данных, входящих в состав сервиса Web of Science (Thomson Reuters).

Существенно, что та же группа исследователей [23] сообщила об обнаружении перекрестной реактивности антител А60 к белку NeuN с синапсином I – членом семейства нейрон-специфических фосфобел-

ков, ассоциированных с синаптическими везикулами, играющих роль в синаптогенезе и модуляции выделения нейротрансмиттеров. Перекрестная реактивность обусловлена, по-видимому, наличием у Fox-3 и синапсина I фрагмента из 14 гомологичных аминокислотных остатков. Вероятно, часть этого фрагмента принимает участие в формировании эпитопа, распознаваемого антителами клона A60. Важно, что перекрестная реактивность эпитопов синапсина и NeuN отмечена только при использовании метода иммуноблоттинга, в то время как при иммуноцитохимическом исследовании, проводимом на парафиновых срезах, антитела к NeuN не связываются с синапсином I. Это может быть обусловлено как маскировкой антигенной детерминанты вследствие фиксации объектов в формальдегиде и заливки материала в парафин, так и низким сродством антител к NeuN к перекрестному эпитопу синапсина I, которое при проведении иммуноблоттинга компенсируется высокой концентрацией синапсина в исследуемом материале [21, 23].

Расшифровка нуклеотидной последовательности и определение гена, кодирующего белок NeuN, закономерно привело к изучению функций NeuN/Fox-3 в клетках нервной системы. Показано, что данный белок играет роль в нейроспецифическом альтернативном сплайсинге [24]. Впоследствии было экспериментально установлено, что регулируемый NeuN/Fox-3 сплайсинг вносит большой вклад в регуляцию дифференцировки нейронов в нервной системе позвоночных животных [25]. В связи с этим высказывается мнение о том, что использовать NeuN-иммуоокрашивание в качестве удобного нейронального маркера следует с учетом функций, выполняемых белком Fox-3 в клетке [21].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКА NeuN В КАЧЕСТВЕ НЕЙРОМАРКЕРА

Несмотря на то что вопрос о структуре антигенной детерминанты, с которой связываются антитела A60, и условиях этого связывания остается не до конца изученным, антитела к белку NeuN широко используются в научных исследованиях, а также в гистопатологической диагностике. Так, в течение последнего десятилетия белок NeuN применяется в качестве универсального нейрон-специфического маркера при изучении дифференцировки стволовых клеток [7, 26–28]. Свидетельством нейрональной дифференцировки является присутствие в постмитотических клетках ряда специфических белков-маркеров, иммуноцитохимическая детекция которых позволяет селективно выявить клетки, принадлежащие к тканям нервной системы. К таким белкам относятся, например, β -тубулин

III, MAP-2, даблкортин, синаптофизин, белки нейрофиламентов, нейрон-специфическая енолаза, нейрональная молекула клеточной адгезии, а также ферменты синтеза нейромедиаторов (тирозингидроксилаза, холин-ацетилтрансфераза) и др. [28, 29]. Использование белка NeuN в качестве маркера нейрональной дифференцировки имеет ряд преимуществ. Во-первых, белок NeuN экспрессируется исключительно в нервной ткани, в то время как другие белки – маркеры нейрональной дифференцировки – обнаруживаются и в других клетках. Так, например, MAP-2 экспрессируется не только в нейронах, но также и в скелетных мышцах, клетках эпителия и др. Положительную иммуноцитохимическую реакцию на нейрон-специфичную енолазу могут давать и астроциты, а синаптофизин выявляется не только в нейронах, но и в нейроэндокринных клетках [29]. Во-вторых, NeuN не выявляется в незрелых предшественниках нервных клеток до тех пор, пока они не вышли из клеточного цикла [15, 19, 30]. В данном контексте некоторые маркеры оказываются менее удобными – выявляют как зрелые нейроны, так и недифференцированные нейроэпителиальные клетки (MAP-2), либо только нервные клетки, находящиеся уже на поздних стадиях дифференцировки (ферменты – маркеры синтеза нейромедиаторов) [31]. Наконец белок NeuN – единственный из перечисленных маркеров, экспрессия которого преимущественно связана с ядром клетки. В связи с этим детекция данного белка, в отличие от цитоплазматических маркеров, не зависит от малого объема цитоплазмы, характерного для нейробластов и мелких нейронов. Кроме того, ядерная локализация этого маркера позволяет получить на препарате дискретные окрашенные структуры, которые при фотографировании доступны для бинаризации – процедуры обработки изображений, необходимой при проведении автоматизированного количественного анализа объектов.

Реакцию на NeuN применяют и при патогистологической диагностике в нейроонкологии [9, 31]. Имеются данные об экспрессии NeuN в части клеток дифференцированных опухолей нейрального происхождения (нейроцитомы, ганглиоцитомы, медуллобластомы) [30, 31]. Так, Wolf и соавт. [30] выявили иммунореактивность по NeuN в ядрах клеток ряда ганглионарных опухолей и отсутствие этой иммунореактивности у клеток олигодендроглии, что может быть использовано при дифференциальной морфологической диагностике онкологических заболеваний. Введение этого маркера в панель антител, используемых для диагностики нейроцитом, может способствовать повышению надежности диагностики и дифференциального диагноза, по крайней мере, в случае нейробластом центральной нервной системы [31].

Хотя NeuN считается удобным маркером постмитотических нейронов и дифференцированных клеток нейрогенных опухолей, использовать его для идентификации нервных клеток в условиях *in vitro* следует с осторожностью. Как показано Darlington и соавт. [32], иммунореактивность по NeuN присутствует в первичных культурах клеток мозга мыши, крысы и человека, однако NeuN-иммунопозитивными оказываются не только нейроны. Было показано, что часть NeuN-иммунопозитивных клеток в данных культурах экспрессирует глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) – маркер астроцитов. Причем NeuN экспрессируют все GFAP-позитивные клетки. Выявленные NeuN⁺/GFAP⁺-клетки имеют морфологию астроцитов, не пролиферируют (согласно данным мечения BrdU) и не обнаруживают экспрессии других нейрональных маркеров. Основываясь на этих данных, предположили, что выявленные *in vitro* NeuN⁺/GFAP⁺-клетки это именно астроциты, а не частично дифференцированные нейрональные предшественники, находящиеся на стадии начала синтеза нейрон-специфичных белков, как можно было предположить в качестве альтернативы. Помимо астроцитов, иммунореактивными по отношению к NeuN *in vitro* оказываются также клетки одной из линий фибробластов (3T3). Остается не до конца понятной причина наблюдаемой в культурах NeuN-иммунореактивности клеток ненейрональной природы. При работе с парафиновыми срезами было обнаружено, что на NeuN-иммунореактивность оказывают влияние некоторые методические приемы [33–36]. Отмечается, что длительная фиксация в формалине (в течение нескольких месяцев или лет) снижает NeuN-иммунореактивность по сравнению с уровнем, наблюдаемым при фиксации аналогичного материала в течение нескольких дней или недель. Кроме того, для связывания антител A60, как правило, необходимо тепловое демаскирование антигена [15, 36]. В то же время декальцинация объектов в растворах муравьиной кислоты не приводит к ухудшению реакции на NeuN [35]. Очевидно, что NeuN-иммуноокрашивание предполагает использование определенных протоколов, которые стандартизированы для работы с парафиновыми срезами [29, 37, 38], но, вероятно, требуют доработки и унификации в случае исследований, проводимых *in vitro*.

Другая сфера применения антител против NeuN – выявление патологических изменений в существующих нейрональных популяциях. В ряде исследований сообщается о различных патологических процессах, которые сопровождаются ослаблением или исчезновением иммунореактивности NeuN в нервных клетках. Так, отмечено полное исчезновение NeuN-иммуногистохимического окрашивания ядер

и цитоплазмы нейронов в области ишемического повреждения стриатума в мозге крысы [39, 40]. Также обнаружено прекращение синтеза белка NeuN нейронами отдельных участков стриатума при болезни Хантингтона [41]. Показано, что ядерный белок NeuN исчезает из поврежденных и погибающих пирамидных нейронов гиппокампа [42]. Об уменьшении иммунореактивности NeuN сообщают также при гипоксии и травме головного мозга [43–45].

Важно отметить, что в ряде работ потерю иммунореактивности NeuN объясняют гибелью нейронов. Так, Davoli и соавт. [44], сопоставив NeuN-иммуноокрашивание с окрашиванием методом TUNEL в ходе ишемии, обнаружили, что иммунореактивность по отношению к NeuN существенно уменьшается через 24 ч после воздействия, что коррелирует с увеличением количества клеток в апоптозе (выявляемых методом TUNEL). Основываясь на полученных данных, предположили, что уменьшение NeuN-иммуноокрашивания связано с гибелью нейронов в поврежденном участке головного мозга. С другой стороны, как впоследствии было показано, потеря NeuN-окрашивания не всегда связана с гибелью нервных клеток и может определяться другими причинами – например, временным прекращением синтеза данного белка нейронами вследствие их повреждения (но без потери жизнеспособности). На модели умеренной ишемии (30-минутная ишемия) установлено, что нейроны теряют NeuN-иммунореактивность через 6 ч после воздействия, но при этом сохраняют клеточную целостность и имеют неповрежденное ядро, т.е. не обнаруживают характерных признаков клеточной гибели [45]. Причиной потери иммунореактивности в данном случае, по мнению авторов, является не уменьшение синтеза белка NeuN в нейронах, а потеря способности антигена связываться с антителами к NeuN. В противоположность этому, в случае аксотомии показано именно резкое уменьшение количества белка NeuN в нервных клетках [20]. Поэтому потеря нервными клетками NeuN-иммунореактивности указывает на их повреждение, но не может быть безусловным свидетельством гибели нейронов (ожидаемой или произошедшей), что следует учитывать при интерпретации данных количественного иммуногистохимического исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на многолетнее интенсивное изучение белка NeuN, ряд вопросов, связанных с его структурой и функциями, остается открытым. Так, мало изучены антигенные детерминанты, с которыми связываются антитела к NeuN, а также условия, необходимые для эффективного взаимодействия

антител с антигеном в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Не определен весь спектр функций белка NeuN в клетках. Не ясно, какие именно процессы, происходящие в клетке, приводят к наблюдаемым в ряде случаев изменениям интенсивности реакции на NeuN/Фох-3 или потере NeuN-иммунореактивности, а также к посттрансляционным модификациям этого белка. Несмотря на это, NeuN уже более 20 лет успешно используется в качестве надежного маркера постмитотических нейронов в исследованиях нейрональной

дифференцировки и при оценке состояния нервных клеток как в норме, так и при патологии. В последнее время возрастает число работ, направленных на изучение свойств белка NeuN/Фох-3. Новые данные должны углубить наши представления о структуре и функциях этого белка и способствовать объективной интерпретации результатов исследований, проводимых с использованием антител к белку NeuN. ●

Работа поддержана РФФ (проект № 14-15-00014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ugrumov M.V. // J. Chem. Neuroanat. 2009. V. 38. № 4. P. 241–256.
- Ugrumov M., Taxi J., Pronina T., Kurina A., Sorokin A., Saponova A., Calas A. // Neuroscience. 2014. V. 277. P. 45–54.
- Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Алексеева О.С. // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2014. Т. 50. № 2. С. 157–160.
- Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В., Отеллин В.А. // Морфология. 2008. Т. 133. № 4. С. 7–10.
- Петрова Е.С., Исаева Е.Н., Коржевский Д.Э. // Морфология. 2013. Т. 143. № 2. С. 30–34.
- Petrova E.S., Isaeva E.N., Korzhevskii D.E. // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. V. 158. № 1. P. 123–126.
- Verdiev B.I., Poltavtseva R.A., Podgorny O.V., Marei M.V., Zinoviyeva R.D., Sukhikh G.T., Aleksandrova M.A. // Bull. Exp. Biol. Med. 2009. V. 148. № 4. P. 697–704.
- Chan M.H., Kleinschmidt-Demasters B.K., Donson A.M., Birks D.K., Foreman N.K., Rush S.Z. // Pediatr. Blood Cancer. 2012. V. 59. № 7. P. 1173–1179.
- You H., Kim Y.I., Im S.Y., Suh-Kim H., Paek S.H., Park S.H., Kim D.G., Jung H.W. // J. Neurooncol. 2005. V. 74. № 1. P. 1–8.
- Hagel C., Treszl A., Fehlert J., Harder J., von Haxthausen F., Kern M., von Bueren A.O., Kordes U. // J. Neurooncol. 2013. V. 112. № 2. P. 191–197.
- Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. // Development. 1992. V. 116. P. 201–211.
- Cannon J.R., Greenamyre J.T. // Neurosci. Lett. 2009. V. 464. № 1. P. 14–17.
- Сухорукова Е.Г. // Морфология. 2013. Т. 143. № 2. С. 78–80.
- Kumar S.S., Buckmaster P.S. // Brain Res. 2007. V. 1142. P. 54–60.
- Sarnat H.B., Nochlin D., Born D.E. // Brain Dev. 1998. V. 20. P. 88–94.
- Lind D., Franken S., Kappler J., Jankowski J., Schilling K. // J. Neurosci. Res. 2005. V. 79. P. 295–302.
- Dent M.A., Segura-Anaya E., Alva-Medina J., Aranda-Anzaldo A. // FEBS Lett. 2010. V. 584. № 13. P. 2767–2771.
- Darnell R.B. // Annu. Rev. Neurosci. 2013. V. 36. P. 243–270.
- Weyer A., Schilling K. // J. Neurosci. Res. 2003. V. 73. P. 400–409.
- McPhail L.T., McBride C.B., McGraw J., Steeves J.D., Tetzlaff W. // Exp. Neurol. 2004. V. 185. P. 182–190.
- Maxeiner S., Glassmann A., Kao H.-T., Schilling K. // Histochem. Cell Biol. 2014. V. 141. P. 43–55.
- Williamson M.P. // Biochem. J. 1994. V. 297. P. 249–260.
- Kim K.K., Adelstein R.S., Kawamoto S. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 31052–31061.
- Kim K.K., Kim Y.C., Adelstein R.S., Kawamoto S. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. 3064–3078.
- Kim K.K., Nam J., Mukoyama Y.S., Kawamoto S. // J. Cell Biol. 2013. V. 200. P. 443–458.
- Hess D.C., Hill W.D., Martin-Studdard A., Carroll J., Brailer J., Carothers J. // Stroke. 2002. V. 33. P. 1362–1368.
- Tanvig M., Blaabjerg M., Andersen R.K., Villa A., Rosager A.M., Poulsen F.R., Martinez-Serrano A., Zimmer J., Meyer M. // Brain Res. 2009. V. 1295. P. 1–12.
- Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В., Безнин Г.В., Сухорукова Е.Г. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. 5. № 3. С. 57–63.
- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С., Карпенко М.Н., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г., Колос Е.А. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии / Ред. Коржевский Д.Э. 2-е изд. СПб.: СпецЛит, 2014. 119 с.
- Wolf H.K., Buslei R., Schmidt-Kastner R., Schmidt-Kastner P.K., Pietsch T., Wiestler O.D., Blümcke I. // J. Histochem. Cytochem. 1996. V. 44. P. 1167–1171.
- Soylemezoglu F., Onder S., Tezel G.G., Berker M. // Pathol. Res. Pract. 2003. V. 199. P. 463–468.
- Darlington P.J., Goldman J.S., Cui Q.L., Antel J.P., Kennedy T.E. // J. Neurochem. 2008. V. 104. P. 1201–1209.
- Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Зинькова Н.Н., Григорьев И.П., Отеллин В.А. // Морфология. 2005. Т. 128. № 5. С. 76–78.
- Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г., Петрова Е.С., Кирик О.В., Григорьев И.П. // Морфология. 2013. Т. 143. № 2. С. 81–85.
- Колос Е.А., Коржевский Д.Э. // Морфология. 2013. Т. 144. № 4. С. 76–79.
- Gill S.K., Ishak M., Rylett R.J. // J. Neurosci. Meth. 2005. V. 148. P. 26–35.
- Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. // Морфология. 2008. Т. 134. № 6. С. 76–79.
- Гиляров А.В., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. // Морфология. 2010. Т. 137. № 5. С. 59–64.
- Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Власов Т.Д., Коржевский Д.Э. // Морфология. 2009. Т. 135. № 2. С. 80–82.
- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Байса А.Е., Власов Т.Д. // Бюл. эксп. биологии и медицины. 2009. Т. 147. № 2. С. 217–219.
- Tippett L.J., Waldvogel H.J., Thomas S.J., Hogg V.M., van Roon-Mom W., Synek B.J., Graybiel A.M., Faull R.L. // Brain. 2007. V. 130. P. 206–221.
- Коржевский Д.Э., Хожай Л.И., Гилерович Е.Г., Григорьев И.П., Гиляров А.В., Отеллин В.А. Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга. М.: ИЗПИЦ Информкнига, 2006. 396 с.
- Igarashi T., Huang T.T., Noble L.J. // Exp. Neurol. 2001. V. 172. P. 332–341.
- Davoli M.A., Fourtounis J., Tam J., Xanthoudakis S., Nicholson D., Robertson G.S., Ng G.Y., Xu D. // Neuroscience. 2002. V. 115. P. 125–136.
- Unal-Cevik I., Kiling M., Gürsoy-Ozdemir Y., Gurer G., Dalkara T. // Brain Res. 2004. V. 1015. P. 169–174.

УДК 611.013.17:57.085.23

Рост и созревание фолликулов яичника мыши в альгинатном гидрогеле *in vitro*: состояние проблемы

М. А. Филатов*, Ю. В. Храмова, М. Л. Семёнова

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

*E-mail: maxfilat@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.2014

После доработки 06.03.2015

РЕФЕРАТ В обзоре рассмотрены основные факторы, влияющие на развитие овариального фолликула мыши в условиях *in vitro* в трехмерной системе альгинатного гидрогеля: концентрация альгината, присутствие в гидрогеле веществ, влияющих на жесткость субстрата (коллаген, фибрин); атмосфера культивирования; базовый состав культуральных сред, присутствие в средах для культивирования специальных добавок, проявляющих свойства антиоксидантов (соли аскорбиновой кислоты, глутатион) или способствующих улучшению липидного обмена (*L*-карнитин), гормональных препаратов и факторов роста. Обсуждаются основные методические подходы группового культивирования фолликулов в альгинатном гидрогеле, а также сокультивирования инкапсулированных в альгинат фолликулов с различными клеточными популяциями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА альгинат, гидрогель, фолликул, яичник мыши.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БСА – бычий сывороточный альбумин; ИТС – инсулин, трансферрин, селенит; ЛГ – лютеинизирующий гормон; 2D – двухмерный; 3D – трехмерный; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ХГЧ – хорионический гонадотропин человека; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; ЭФР – эпидермальный фактор роста.

ВВЕДЕНИЕ

Создание системы, позволяющей получать зрелые ооциты в условиях *in vitro*, представляет большой интерес для исследователей. По различным причинам женщине может потребоваться получить зрелые ооциты из ткани яичника в искусственных условиях. Например, при гормонзависимом раке молочной железы для снижения выработки половых гормонов применяют овариоэктомию [1]. При других видах рака применяют лучевую и химиотерапию, что также негативно сказывается на состоянии яичника. Под действием химиотерапевтических агентов клетки яичника деградируют по пути апоптоза. Этот процесс затрагивает как строму, так и собственно фолликулярную систему яичника [2] и приводит к уменьшению численности в том числе и примордиальных фолликулов, а следовательно, к снижению овариального резерва и развитию бесплодия [3]. В настоящее время больным предлагается проведение криоконсервации овариальной ткани в расчете на то, что после успешного лечения данную ткань можно будет вернуть в организм пациентки [4]. Такие процедуры сопряжены с рядом трудностей: как при заборе овариальной ткани, так и при аутооттрансплан-

тации необходимо хирургическое вмешательство, а для инициации роста и созревания фолликулов и ооцитов требуется гормональная стимуляция. Все эти действия могут негативно отразиться на ослабленном здоровье пациентки, включая повышение риска возобновления онкологического процесса.

Выходом в подобных ситуациях может стать культивирование ткани яичника в условиях *in vitro* с дальнейшим получением зрелых, способных к оплодотворению ооцитов, которые могут быть подвергнуты криоконсервированию и в дальнейшем использоваться в программах вспомогательных репродуктивных технологий. В последние годы методы культивирования *in vitro* овариальной ткани и единичных фолликулов активно разрабатываются на различных модельных объектах. К таким модельным объектам относятся собака [5], макака-резус [6], но в большинстве случаев используют ткань яичника мыши [7–11]. Хотя за последнее время получен ряд обнадеживающих результатов [7, 8, 10], многие вопросы, касающиеся регуляции роста фолликулов и созревания ооцитов в условиях *in vitro*, до сих пор не решены. Регуляция роста фолликулов и созревания в них ооцитов *in vivo* зависит от гормонов, вы-

деляемых гипофизом и клетками яичника, ростовых факторов, а также других веществ, роль которых до сих пор до конца не установлена. Рост фолликула во многом зависит также от механических свойств окружающей овариальной ткани. Для успешного культивирования фолликулов *in vitro* необходимо воспроизведение всех этих условий.

Большая часть исследователей применяет культивирование единичных фолликулов, выделенных из яичника механическим или ферментативным способом. При механическом способе сохраняется большее число клеток фолликула, в том числе и клеток теки, что способствует лучшему росту фолликула в условиях *in vitro* [12, 13].

Культивирование единичных фолликулов может проводиться в условиях 2D (плоскостных, двухмерных) или 3D (пространственных, трехмерных) систем. Пространственные системы обладают рядом преимуществ по сравнению с плоскостными. Главный минус 2D-систем – низкое соответствие микроокружения культивируемого фрагмента условиям *in vivo*. При двухмерном культивировании клетки фолликула и окружающей его стромы мигрируют по плоскости, фолликулы теряют форму, и ооциты лишаются нормального клеточного окружения. Регуляцию функционирования 2D-систем можно осуществлять лишь за счет изменения концентраций химических соединений (факторов роста, гормонов и т.п.) в культуральной среде, тогда как при использовании 3D-технологий культивирования регуляцию можно осуществлять также с помощью подбора физических параметров трехмерного микроокружения эксплантата.

При создании трехмерных систем культивирования в качестве субстратов используют агарозу, коллаген, матригель или производные альгинатов [14]. Альгинатные гидрогели, получающиеся в результате растворения солей альгиновой кислоты (альгинатов), имеют преимущества перед другими веществами: для их полимеризации необходимо лишь добавить раствор, содержащий связывающий агент – ионы Ca^{2+} или Mg^{2+} . При этом не требуется воздействие высоких температур или ультрафиолетового излучения, губительных для живых клеток. Кроме того, альгинаты имеют растительное происхождение (их получают из бурых водорослей), что делает возможным их использование в проектах, в которых требуется использовать системы, содержащие компоненты только неживотного происхождения («animal free»). На рис. 1 показана схема образования альгинатного гидрогеля за счет полимеризации альгината натрия с помощью ионов кальция. Изменяя концентрацию солей кальция и магния, используемых при полимеризации, концентрацию альгинатов в растворе, а так-

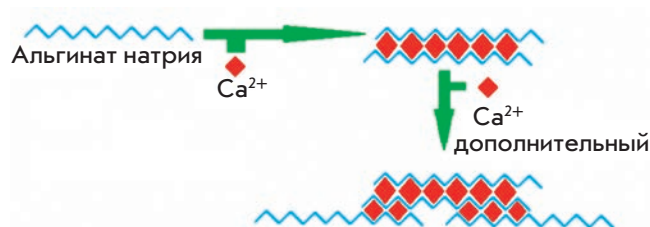


Рис. 1. Схема образования альгинатного гидрогеля

же время полимеризации можно добиться получения гидрогелей различной структуры и плотности, т.е. обладающих разными механическими свойствами.

Механическое окружение фолликула

Важное значение для нормального роста фолликула и созревания ооцита имеют механические напряжения, возникающие в клетках фолликула. В публикациях нескольких независимых групп исследователей, посвященных изучению экспрессии генов в фолликулах яичников мыши, было показано, что выращивание фолликулов в менее концентрированных, а следовательно, более мягких альгинатных субстратах в большей степени соответствует условиям роста и созревания фолликулов *in vivo*, нежели культивирование в более жестких альгинатных субстратах [9, 15, 16].

В ходе культивирования фолликулов с использованием 0.25% альгинатных гидрогелей (0.25 г альгината натрия растворены в 100 мл раствора) в ооцитах происходило увеличение числа транскриптов таких генов, как *Gdf9*, *Bmp15*, *Tcl1* и *Zp3*, высокий уровень экспрессии которых характерен для нормального оогенеза *in vivo*, в сравнении с 1.5% альгинатным гидрогелем (1.5 г альгината натрия растворены в 100 мл раствора). Кроме того, показано, что культивирование фолликулов в более мягких альгинатных гидрогелях (0.25%) приводит к более интенсивному увеличению размеров ооцита и фолликула в целом в сравнении с культивированием в более жестком альгинатном гидрогеле (1.5%) [9].

Группой исследователей из США показано, что при культивировании фолликулов в жестких альгинатных гидрогелях (1.5%), снижающих темпы роста и развития фолликулов, в сравнении с более мягкими альгинатными гидрогелями (0.5%) наблюдается избыточное увеличение экспрессии таких генов, как *Star* (регулирующего внутриклеточный транспорт холестерина, необходимого для синтеза половых гормонов), *Cyp11a1* (отвечающего за превращение холестерина в прегненолон), *Hsd3b1* (кодирующего гидрокси- δ -5-стероиддегидрогеназу). Кроме того, при культивировании в 0.5% альгинатном гидрогеле (в

сравнении с 1.5% гидрогелем) усиливалась экспрессия *Lhcgr*, гена рецептора лютеинизирующего гормона и хорионического гонадотропина. Также между нулевым и восьмым днем культивирования фолликула в клетках гранулезы возрастает уровень экспрессии гена *Cyp19a1*, отвечающего за превращение андростендиона в эстрадиол. Этот процесс идет более эффективно в 0.5% альгинатном гидрогеле – уровень экспрессии *Cyp19a1* повышается в 34 раза, а в 1.5% гидрогеле – только в 15 раз. В результате этого в фолликулах, культивированных с использованием более жестких субстратов, наблюдали существенно меньшую выработку эстрадиола [15].

Также особый интерес представляет сравнение уровней экспрессии генов при развитии овариальных фолликулов *in vivo*, а также при их культивировании *in vitro* в альгинатном гидрогеле [16]. В этой работе у 12-дневных неполовозрелых мышей из яичников выделяли фолликулы, содержащие два слоя клеток гранулезы (двухслойные фолликулы), после чего их инкапсулировали в 0.25% альгинатный гидрогель и культивировали в течение 4 дней. Сравнивали уровни экспрессии генов в клетках фолликулов после культивирования в альгинатном гидрогеле и в клетках многослойных фолликулов, выделенных из яичников 16-дневных мышей. Выделенные фолликулы имели диаметр от 150 до 180 мкм, что соответствовало размеру фолликулов, полученных после культивирования *in vitro*. Установлено, что овариальные фолликулы, культивируемые в 0.25% альгинатном гидрогеле, и фолликулы, растущие в условиях *in vivo*, имеют сходные паттерны экспрессии, в том числе таких генов, как *Fshr* (кодирующего рецептор к ФСГ), *Inha* (отвечающего за образование α -субъединицы ингибина), *Igf1* (инсулиноподобного фактора роста первого типа, влияющего на рост фолликула), *Zp2* (кодирующего один из гликопротеинов, входящих в состав *zona pellucida*), *Lhcgr*.

Хотя при использовании мягких альгинатных гидрогелей удастся добиться лучших результатов, чем при культивировании фолликулов в более жестком механическом окружении, культивирование в гидрогелях с низкой концентрацией альгината имеет ряд технологических сложностей. При применении менее концентрированных растворов деструкция капель гидрогеля наступает быстрее, так как между молекулами альгината образуется меньшее количество поперечных сшивок, а, следовательно, структура получается менее прочной. Слабо концентрированные растворы альгинатов перспективны в случае технологий культивирования, способных обеспечить инкапсуляцию фолликулов в гидрогель и смену среды культивирования таким образом, чтобы при этом не происходило повреждения гидрогеля.

Воссоздание кортикально-медуллярной структуры яичника *in vitro*

В условиях *in vivo* фолликул в процессе роста переходит из более плотной (кортикальной) зоны яичника в менее ригидную (медуллярную) [17]. Таким образом, в естественных условиях происходит постепенное уменьшение механических напряжений в клетках фолликула. На сегодняшний день разработаны две различные методики, связанные с использованием альгинатов и позволяющие воссоздать кортикально-медуллярную структуру для единичного фолликула: культивирование в фибриново-альгинатном или в альгинат-коллагеновом гидрогеле.

Для воссоздания условий изменяющихся механических напряжений были разработаны методики культивирования фолликулов в фибриново-альгинатном гидрогеле [17–20], который образуется в результате одновременной полимеризации альгината и фибрина: альгината с помощью ионов кальция (Ca^{2+}), а фибрина с помощью тромбина и фактора свертываемости крови XIII. Фолликул в процессе роста выделяет в окружающую среду литические ферменты – протеазы, которые разрушают полимеризованный фибрин. В результате механические напряжения, существующие вокруг фолликула, культивируемого в фибриново-альгинатном гидрогеле, снижаются, что позволяет фолликулу сильнее увеличиться в размерах [18]. При использовании фибриново-альгинатного гидрогеля, основанного на 0.25% альгинате, выработка эстрадиола и прогестерона фолликулами значительно усиливается, а размер ооцитов увеличивается гораздо значительно, чем при использовании стандартного 0.25% альгинатного гидрогеля без добавления фибрина [20].

Другой способ создания динамического окружения фолликула, обладающего различными уровнями жесткости, – альгинат-коллагеновая система. При таком типе культивирования в центре капли, в которую инкапсулирован фолликул, находится коллаген, а по периферии – альгинатный гидрогель. Коллаген значительно более мягкий субстрат, чем альгинатный гидрогель, поэтому получается гетерогенная по уровню жесткости система, имитирующая микроокружение фолликула в яичнике в условиях *in vivo* – кортикальная часть более жесткая, а медуллярная более мягкая [21]. На *рис. 2* показана схема строения альгинат-коллагеновой капли с инкапсулированным фолликулом.

Одной из последних разработок является методика инкапсуляции фолликулов в двухслойную систему, состоящую из альгината и коллагена, с помощью технологии микрофлюидики. Эта технология позволяет получать капли, состоящие из различных веществ, взятых в необходимых пропорциях, за счет



Рис. 2. Схема строения альгинат-коллагеновой системы культивирования: фолликул находится в зоне перехода из более плотной области (кортикальной) в менее плотную (медуллярную). В процессе развития он разрастается в медуллярную область

направленных микротоков разных жидкостей, которые создаются по заданной схеме в заранее изготовленном чипе [22]. С помощью данной технологии можно получать капли необходимого размера, в том числе соответствующие объему единичного фолликула, что позволяет упростить этапы дальнейшего культивирования [21].

В табл. 1 представлены основные типы систем культивирования фолликулов, а также показатели, характеризующие эффективность систем данного рода, такие, как выживаемость и процент развития ооцитов до стадии метафазы II мейоза (MII). Наилучшие результаты получены при использовании фолликулов с начальным диаметром более 130 мкм; фолликулы размером менее 100 мкм в диаметре в таких исследованиях не используются, хотя в яичнике фолликулов такого размера достаточно много. По-видимому, для успешного роста фолликулов и созревания ооцита в альгинатных гидрогелях необходим некоторый минимальный объем клеточного микроокружения.

Состав сред для культивирования фолликулов

При культивировании фолликулов, инкапсулированных в альгинатный гидрогель, обычно используется двухступенчатая система культивирования. На первом этапе культивирование проводят в среде, способствующей росту фолликула – IVC (*In vitro culture medium*), а на втором этапе фолликулы помещают в среду для созревания ооцитов – IVM (*In vitro maturation medium*). В табл. 2 показаны основные типы сред для культивирования фолликулов, инкапсулированных в альгинатные гидрогели, и их производные.

Как правило, для роста и созревания фолликулов используется полная среда α -MEM с различными добавками. Для роста фолликулов в среду добавляют инсулин, селенит, трансферрин (ИТС), бычий сывороточный альбумин (БСА) или эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), фолликулостимулирующий

гормон (ФСГ). Иногда в культуральную среду вносят вещества, обладающие антиоксидантными свойствами (аскорбиновая кислота) или усиливающие липидный обмен (*L*-карнитин).

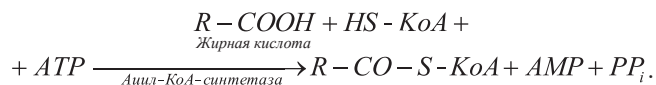
В среду для созревания ооцитов обязательно вносят хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) для стимуляции овуляции. Также в эту среду в большинстве работ добавляют факторы роста, в том числе эпидермальный фактор роста (ЭФР), который способствует нормальному протеканию мейоза [30].

На сегодняшний день не разработано единой методики культивирования, хотя большинство авторов придерживаются двухступенчатой системы культивирования, позволяющей сначала стимулировать рост фолликулов, а затем активировать созревание в них ооцитов. Изучение целесообразности внесения в двухступенчатые культуральные среды различных добавок, способных индуцировать рост и развитие фолликулов и ооцитов, является первоочередной задачей дальнейших исследований, связанных с получением ооцитов, способных к оплодотворению, в условиях *in vitro*.

Регуляция липидного обмена при фолликулогенезе

Как правило, при культивировании фолликулов в условиях *in vitro* значительное внимание уделяется метаболизму углеводов. В большинстве случаев в среду вносят сами углеводы в качестве энергетического субстрата: базовым компонентом большинства сред для культивирования фолликулов является α -MEM, в состав которого входит пируват натрия. Для полноценного развития ооцита и эмбриона важен не только углеводный трофический путь, но и путь β -окисления липидов. Однако внимание обмену липидов при культивировании фолликулов и эмбрионов уделяется лишь в единичных работах [7, 31]. Для метаболизма липидов по пути β -окисления необходим карнитин, который помогает липидам проникать в митохондрию, принимая участие в формировании так называемого карнитинового тоннеля [32].

Образование АТФ при разложении липидов происходит в митохондриях в результате β -окисления жирных кислот. На первом этапе липидного обмена на наружной поверхности мембраны митохондрий активируются жирные кислоты. В активации участвуют АТФ, коэнзим А (HS-КоА) и ионы Mg^{2+} . Реакция катализируется ферментом ацил-КоА-синтетазой:



В результате реакции образуется ацил-КоА, который является активной формой жирной кислоты. На втором этапе липидного обмена активированная

Таблица 1. Развитие методик культивирования фолликулов яичников мыши в альгинатных гидрогелях различного состава (по [23] с дополнениями)

Состав гидрогеля	Продолжительность культивирования, дни	Начальный размер фолликула, мкм	Выживаемость, %	Наступление МП, %	Дополнительные наблюдения в рамках исследования	Источник
2% альгинат (кортекс), 0.5% альгинат (ядро) vs 2% альгинат (кортекс), 0.5% коллаген типа I (ядро)	Более 9	100–130	Нет данных	Нет данных	Развитие до стадии антрального фолликула происходит чаще при использовании коллагена	[21]
Альгинат, 0.25% vs 1.5%	8	130–150	Нет данных	86 vs 63.8	Уровни экспрессии основных генов фолликулогенеза выше при более мягких субстратах	[9]
0.25% альгинат с фибрином	8	130–150	Нет данных	Нет данных	Фолликул, разрушая фибрин протеазами, уменьшает механические напряжения	[18]
0.25% альгинат с фибрином	12	Нет данных	75	88	Образование двухклеточных эмбрионов после оплодотворения ооцитов, полученных из фолликулов <i>in vitro</i>	[20]
0.25% альгинат	12	100–130	78	59	Исследование щелевидных контактов в фолликулярных клетках	[24]
Альгинат, 1.5% vs 0.5%	2–8	150–180	82.7 vs 84.3	Нет данных	Мягкий субстрат (0.5%) способствует росту фолликула в сравнении с более жестким (1.5%)	[15]
0.25% альгинат с фибрином	12	100–130	77–81	75–82	Нет данных	[19]
Альгинат, 0.7, 1.5, 3%	8–12	100–130 150–180	31–66 46–91	Нет данных	Исследования секреции эстрогенов фолликулами	[25]
Различные системы культивирования (как индивидуальный альгинатный гидрогель, так и его комплексы с различными пептидами): 1.5% раствор альгината 1.5% раствор альгината с коллагеном I типа 1.5% раствор альгината с фибронектином 1.5% раствор альгината с трипептидами (аргинин, глицин, аспарагиновая кислота) 1.5% раствор альгината с коллагеном типа IV 1.5% раствор альгината с ламинином	8	100–130 vs 150–180	64 vs 69 65 vs 67 70 vs 72 72 vs 62 72 vs 48 63 vs 61	40 44 71 65 50 71	Культивирование в комплексах альгината с коллагеном I типа и с трипептидами приводило к росту фолликулов, использование гидрогелей, содержащих фибронектин, трипептиды или ламинин, стимулировало образование ооцитов на стадии МП	[26]
Альгинат, 1.5%	8	150–180	93	71	Рождение живых мышат после оплодотворения ооцитов, полученных из фолликулов <i>in vitro</i>	[27]
Альгинат, 0.25, 0.5, 1, 1.5%	12	100–130	74–85	56–67	Изучение эффектов жесткости субстратов: более мягкие субстраты способствуют развитию ооцитов	[28]

Таблица 2. Сравнение сред, используемых при культивировании фолликулов мыши в альгинатном гидрогеле

Состав среды для роста фолликулов	Состав среды для созревания ооцитов	Наступление МП, %	Источник
α-МЕМ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 10 мМЕ/мл ФСГ, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин и 5 нг/мл селенит	Не использовалась	Нет данных	[11]
α-МЕМ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит (ИТС), 0.01 МЕ/мл рекомбинантный человеческий ФСГ, 50 мкг/мл натриевой соли аскорбиновой кислоты	Не использовалась	Нет данных	[29]
α-МЕМ, глутамакс (3 мМ), пенициллин и стрептомицин (100 МЕ/мл), 5 мг/мл человеческий сывороточный альбумин, инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл), селенит (5 нг/мл), аскорбиновая кислота (50 мкг/мл), ФСГ (0.01 МЕ/мл)	Не использовалась	Нет данных	[10]
α-МЕМ, 5% ЭТС, 0.01 МЕ/мл ЛГ, 0.1 МЕ/мл ФСГ, 1 мМ L-карнитин	α-МЕМ, 10% ЭТС, 1.5 МЕ/мл ХГЧ	51	[7]
α-МЕМ, 1% ЭТС	α-МЕМ, 10% ЭТС, 1.5 МЕ/мл ХГЧ, 5 нг/мл ЭФР	88	[20]
α-МЕМ, 0.01 МЕ/мл рекомбинантный ФСГ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит	α-МЕМ, 10% ЭТС, 1.5 МЕ/мл ХГЧ, 5 нг/мл ЭФР	59	[24]
α-МЕМ, 0.01 МЕ/мл рекомбинантный ФСГ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит	α-МЕМ, 10% ЭТС, 1.5 МЕ/мл ХГЧ, 5 нг/мл ЭФР	75–82	[19]
α-МЕМ, 0.01 МЕ/мл рекомбинантный ФСГ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит	α-МЕМ, 0.25 пг/мл ЭФР, 0.045 МЕ/мл ХГЧ	Нет данных	[25]
α-МЕМ, 0.01 МЕ/мл рекомбинантный ФСГ, 3 мг/мл БСА, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит	α-МЕМ, 1.5 МЕ/мл ХГЧ, 5 нг/мл ЭФР	40–71	[26]

жирная кислота должна проникнуть в митохондрию. Ключевой и одновременно лимитирующий фактор этого процесса – карнитин-пальмитоилтрансфераза I (CPT1B), для функционирования которой необходим карнитин [31]. Третий этап липидного обмена протекает в матриксе митохондрий, где в цикле трикарбоновых кислот и цепи переноса электронов синтезируются молекулы АТФ [31].

Показано, что ингибирование карнитин-пальмитоилтрансферазы I препятствует нормальному протеканию мейоза [31, 33], из чего можно сделать вывод, что использование L-карнитина необходимо для нормального развития и созревания ооцитов *in vitro*.

Эксперименты, проведенные на фолликулах мыши, культивированных в альгинатном субстрате [7], свидетельствуют о том, что добавление L-карнитина в среду для созревания ооцитов приводит к увеличению числа нормально развивающихся эмбрионов, полученных в результате оплодотворения ооцитов, выращенных в условиях *in vitro* с использованием L-карнитина.

Активация всех систем энергетического обмена (не только системы углеводного, но и липидного) важна для стимуляции созревания ооцитов. Поэтому следу-

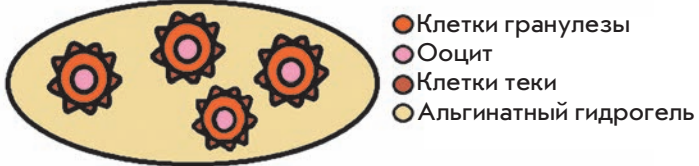


ет ожидать появления работ, связанных с использованием L-карнитина и других кофакторов, позволяющих стимулировать липидный обмен, и разработки методик эффективного культивирования фолликулов с получением зрелых ооцитов.

Влияние окислительного стресса на рост и созревание фолликулов

Культивирование фолликулов яичников млекопитающих осуществляют, как правило, в условиях классического углекислотного инкубатора с соотношением газов: 5 об.% CO₂/воздух. Таким образом, атмосфера, в которой проводится культивирование, имеет следующее соотношение газов (об.%): 5 CO₂, 20 O₂ и 75 N₂ [34]. При таком соотношении газов в культуральной атмосфере парциальное давление кислорода в культивируемых тканях составляет около 140 мм рт. ст. [6]. В то время как парциальное давление кислорода в перитонеальной полости равно примерно 40 мм рт. ст. [35], что соответствует 5 об.% O₂ в атмосфере инкубатора для культивирования.

Повышению жизнеспособности фолликулов, культивируемых в условиях пониженной концентрации кислорода, очевидно, способствует низкий уровень

Таблица 3. Основные системы сокультивирования фолликулов

Тип сокультивирования	Схема опыта	Источник
1. Неконтактное сокультивирование большого числа фолликулов		[8]
2. Фолликулы в среде, кондиционируемой эмбриональными фибробластами		[43]
3. Фолликулы в предварительно кондиционированной среде		[13]

образующихся активных форм кислорода (АФК), в то время как при культивировании фолликулов яичников млекопитающих в условиях повышенного парциального давления кислорода происходит активное образование АФК, вызывая в клетках окислительный стресс, что негативно сказывается на росте и развитии фолликулов [36].

В ряде работ [10, 37] показано, что культивирование при пониженных концентрациях кислорода (5 об.% по сравнению с 20 об.% O₂) в атмосфере инкубатора приводит к повышению жизнеспособности и улучшению роста фолликулов яичников мыши.

Особое внимание необходимо уделять концентрации O₂ в атмосфере инкубатора на ранних стадиях культивирования фолликулов (примордиальных, первичных, а также ранних вторичных). В условиях *in vivo* эти фолликулы располагаются в корковом слое яичника, степень васкуляризации которого значительно меньше, чем в мозговом слое, вследствие чего ранние фолликулы фактически находятся в условиях особо острой гипоксии. Поэтому для их развития *in vitro* необходимо воссоздавать подобные условия. Так, при культивировании ранних вторичных фолликулов мыши (диаметр 100–120 мкм) их рост, выживаемость, а также выработка фактора роста эндотелия сосудов А (vascular endothelial growth factor

А – VEGFA), лактата, ингибина В, антимюллерова гормона достоверно повышаются при культивировании в условиях 2.5 об.% атмосферы O₂ по сравнению с культивированием в атмосфере 20 об.% O₂ [11].

С другой стороны, показано, что при повышенных концентрациях кислорода образуются ооциты более высокого качества как при культивировании фолликулов [38], так и при созревании ооцит-кумулясных комплексов *in vitro* [39]. Известно, что под воздействием низких концентраций кислорода в ооците может нарушаться активность моторных белков, в том числе динеина и динактина, регуляторных факторов, отвечающих за формирование веретена деления, а также белков, контролирующих клеточный цикл [38]. Кроме того, при пониженной концентрации кислорода в культуральной среде в клетках нарушается функционирование митохондрий, что, в свою очередь, ведет к снижению выработки АТФ. Возможно, именно этот процесс влечет за собой нарушения функционирования всех перечисленных групп белков. Культивирование и созревание фолликулов при низких концентрациях кислорода может привести также к десинхронизации процессов ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов [38].

Неоднозначность данных об оптимальной концентрации кислорода в культуральной атмосфере де-

лает исследования более актуальными, поскольку подбор правильных условий определяет качество эмбрионов, развивающихся из ооцитов. Вероятно, стоит ожидать разработки многоступенчатых систем культивирования, сочетающих использование разных концентраций кислорода на различных этапах культивирования. Перспективной представляется трехступенчатая система культивирования. На первом этапе (при культивировании ранних фолликулов) необходимо использовать сверхнизкие концентрации кислорода. На втором этапе (при культивировании более поздних фолликулов, антральных) нужно повышать концентрацию кислорода в атмосфере инкубатора. На третьем этапе (при созревании ооцит-кмулюсных комплексов, выделенных из культуры) требуется, вероятно, дополнительное повышение концентрации кислорода в атмосфере инкубатора. Впрочем, число этапов культивирования и процентное содержание кислорода в культуральной среде на каждом этапе еще не установлены. Возможно, что более высоких результатов удастся добиться не при ступенчатом изменении концентрации кислорода в культуральной атмосфере, а при ее плавном и постепенном увеличении в ходе всего культивирования.

Снижение уровня свободных радикалов в культивируемых фолликулах можно обеспечить и иным способом – путем внесения в культуральную среду антиоксидантов. Для снижения уровня образования активных форм кислорода при культивировании фолликулов в среду можно добавлять различные антиоксиданты, такие, как кверцетин [40], аскорбиновая кислота [29, 41], 7,8-дигидроксифлавонол [42], глутатион [29]. В то же время показано, что положительное влияние на рост фолликулов натриевой соли аскорбиновой кислоты обусловлено не ее антиоксидантными свойствами, а способностью к стимуляции образования контактов клеток фолликула с внеклеточным матриксом. А добавление глутатиона при культивировании фолликулов мыши, инкапсулированных в альгинатный гидрогель, не приводило к увеличению их выживаемости и роста в сравнении с фолликулами, которые культивировали в среде с добавлением натриевой соли аскорбиновой кислоты. Антиоксидантная активность как аскорбиновой кислоты, так и глутатиона, по всей видимости, не оказывала значительного воздействия на фолликулогенез *in vitro* [29].

Использование методик сокультивирования

Естественные условия роста и созревания фолликулов в условиях *in vitro* воссоздают, внося в культуральную среду гормональные препараты (ФСГ, ХГЧ, ЛГ) [7, 16, 17], факторы роста [20, 25] и другие

компоненты [7, 10, 29]. Тем не менее воссоздать в лаборатории условия, в которых находятся фолликулы *in vivo*, пока не представляется возможным. Помимо гормонов клетки, гранулезы и теки фолликула вырабатывают большое количество факторов роста, создавая локально обогащенную ими специфическую зону, которая наилучшим образом способствует росту и развитию фолликулов, а также созреванию в них ооцитов.

Некоторые исследователи, создавая обогащенную многочисленными ростовыми факторами и гормонами среду для культивирования фолликулов, применяют принципиально другой подход – сокультивирование группы фолликулов. Предполагается, что при совместном культивировании нескольких фолликулов овариальные компоненты будут стимулировать рост и развитие друг друга путем обогащения среды секретлируемыми паракринными факторами в концентрациях, необходимых для нормального роста фолликулов. В настоящее время разрабатываются три основных типа сокультивирования: неконтактное сокультивирование большого числа фолликулов в составе одной капли альгинатного гидрогеля [8], сокультивирование фолликулов с эмбриональными фибробластами [29, 43], культивирование фолликулов в кондиционированной среде [13, 43]. В табл. 3 представлены схемы наиболее распространенных систем сокультивирования фолликулов.

При неконтактном сокультивировании несколько фолликулов помещают в одну каплю альгинатного гидрогеля, однако при этом фолликулы непосредственно не контактируют друг с другом и между ними остается место для роста. Коммуникации между фолликулами в таком случае осуществляются путем выделения в окружающее фолликулы пространство паракринных факторов. Наилучшие результаты достигнуты при сокультивировании 10 фолликулов в группе [8].

Сокультивирование фолликулов с эмбриональными фибробластами проводят по следующей схеме: фолликулы, инкапсулированные в альгинатный гидрогель, помещают на монослой инактивированных мышечных эмбриональных фибробластов, кондиционирующих среду для культивирования различными паракринными факторами. В таких условиях возможно более успешное выращивание фолликулов меньшего диаметра (начиная с 80–90 мкм), чем в системах без фидерного слоя, которые поддерживают рост фолликулов диаметром свыше 100 мкм.

При культивировании фолликулов в кондиционированной среде предварительно выращивают различные клеточные культуры (эмбриональные фибробласты мыши, овариальные клеточные компоненты), а затем собирают среду, в которой эти клетки куль-

тивировали, и помещают в нее инкапсулированные в альгинатный гидрогель фолликулы. Такая среда содержит различные паракринные факторы, в том числе необходимые факторы роста, которые диффундируют в толщу гидрогеля, создавая условия для роста фолликула.

Каждый из трех основных методов имеет свои преимущества и недостатки. При неконтактном сокультивировании большого числа фолликулов очень сложно проследить за процессом роста и созревания каждого фолликула в отдельности. При гибели даже одного фолликула в группе будет наблюдаться также снижение темпов роста оставшихся фолликулов. В то же время метод неконтактного сокультивирования фолликулов технологически прост и позволяет получать достаточно высокие результаты при культивировании. Использование фидерного слоя инактивированных эмбриональных фибробластов для сокультивирования с фолликулами сопряжено с рядом трудностей. В частности, при использовании данной методики необходимо поддерживать оптимальный баланс в составе сред культивирования, так как для нормального роста и развития фолликулов и эмбриональных фибробластов необходимо присутствие различных веществ в среде. Кроме того, возможность применения этого метода в медицинской практике также остается под вопросом, поскольку подобная система подразумевает использование при сокультивировании фетальных клеток. Культивирование фолликулов в предварительно кондиционированной среде также является технологически сложным процессом. Данная система сокультивирования подразумевает прохождение нескольких этапов, на каждом из которых необходимо избежать контаминации культуральной среды. Кроме того, процесс кондиционирования среды

пролиферирующей клеточной популяцией сложно стандартизировать – в каждой партии кондиционированной среды может быть разная концентрация активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технологии культивирования компонентов овариальной ткани млекопитающих с течением времени становятся все более и более сложными, все в большей степени соответствуя условиям *in vivo*. Учитывая значительное число различных аспектов, исследователям удается добиваться более высоких результатов культивирования: полученные ооциты созревают в большем числе случаев, чаще наблюдается рост фолликулов до более поздних стадий. В будущем, нас, вероятно, ожидает обнаружение новых компонентов, которые необходимо добавлять в культуральные среды для лучшего роста и созревания фолликулов, а также проведение работ, связанных с воссозданием архитектуры яичника в условиях *in vitro*, позволяющих культивировать фолликулы в оптимальных условиях. Учитывая многочисленные факторы (механические напряжения, обмен веществ в фолликуле, концентрация газов в культуральной атмосфере, гормональный фон, влияние паракринных факторов и т.д.), можно разработать высокоэффективную систему культивирования фолликулов. Поэтому, вероятно, в ближайшем будущем стоит ожидать появления работ, в которых сочетается использование всех необходимых для нормального роста и развития фолликула факторов, что позволит стабильно получать компетентные к оплодотворению и дальнейшему развитию ооциты. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Di Leva G., Piovan C., Gasparini P., Ngankeu A., Taccioli C., Briskin D., Cheung D.G., Bolon B., Anderlucci L., Alder H., et al. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 3. e1003311.
- Verga Falzacappa C., Timperi E., Bucci B., Amendola D., Piergrossi P., D'Amico D., Santaguida M.G., Centanni M., Misiti S. // *J. Endocrinol.* 2012. V. 215. № 2. P. 281–289.
- Oktom O., Oktay K. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 21. P. 10159–10162.
- Meirow D., Baum M., Yaron R., Levron J., Hardan I., Schiff E., Nagler A., Yehuda D.B., Raanani H., Hourvitz A., Dor J. // *Leuk. Lymphoma.* 2007. V. 48. № 8. P. 1569–1576.
- Songsasen N., Woodruff T.K., Wildt D.E. // *Reproduction.* 2011. V. 142. № 1. P. 113–122.
- Xu J., Lawson M.S., Yeoman R.R., Pau K.Y., Barrett S.L., Zelinski M.B., Stouffer R.L. // *Hum. Reprod.* 2011. V. 26. № 5. P. 1061–1072.
- Dunning K.R., Akison L.K., Russell D.L., Norman R.J., Robker R.L. // *Biol. Reprod.* 2011. V. 85. № 3. P. 548–555.
- Hornick J.E., Duncan F.E., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Reproduction.* 2013. V. 145. № 1. P. 19–32.
- Jiao Z.X., Woodruff T.K. // *Fertil. Steril.* 2013. V. 99. № 5. P. 1453–1459.
- Gook D.A., Edgar D.H., Lewis K., Sheedy J.R., Gardner D.K. // *Mol. Hum. Reprod.* 2014. V. 20. № 1. P. 31–41.
- Makanji Y., Tagler D., Pahnke J., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014. V. 15. № 306(8). e893–903.
- Figueiredo J.R., Hulshof S.C., Van den Hurk R., Ectors F.J., Fontes R.S., Nusgens B., Bevers M.M., Beckers J.F. // *Theriogenology.* 1993. V. 40. № 4. P. 789–799.
- Choi J.K., Agarwal P., He X. // *Tissue Eng. Part. A.* 2013. V. 19. № 23–24. P. 2626–2637.
- West E.R., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Semin. Reprod. Med.* 2007. V. 25. № 4. P. 287–299.
- West-Farrell E.R., Xu M., Gomberg M.A., Chow Y.H., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biol. Reprod.* 2009. V. 80. № 3. P. 432–439.

16. Parrish E.M., Siletz A., Xu M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Reproduction*. 2011. V. 142. № 2. P. 309–318.
17. Xu J., Lawson M.S., Yeoman R.R., Molskness T.A., Ting A.Y., Stouffer R.L., Zelinski M.B. // *Hum. Reprod*. 2013. V. 28. № 8. P. 2187–2200.
18. Shikanov A., Xu M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *J. Vis. Exp*. 2011. V. 15. № 49. P. 2695.
19. Shikanov A., Xu M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biomaterials*. 2009. V. 30. № 29. P. 5476–5485.
20. Jin S.Y., Lei L., Shikanov A., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Fertil. Steril*. 2010. V. 93. № 8. P. 2633–2639.
21. Choi J.K., Agarwal P., Huang H., Zhao S., He X. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 19. P. 5122–5128.
22. Streets A.M., Huang Y. // *Curr. Opin. Biotechnol*. 2014. № 25. P. 69–77.
23. Desai N., Alex A., AbdelHafez F., Calabro A., Goldfarb J., Fleischman A., Falcone T. // *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2010. V. 14. № 8. P. 119.
24. Xu M., Banc A., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biotechnol. Bioeng*. 2009. V. 103. № 2. P. 378–386.
25. West E.R., Xu M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biomaterials*. 2007. V. 28. № 30. P. 4439–4448.
26. Kreeger P.K., Deck J.W., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 5. P. 714–723.
27. Xu M., Kreeger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Tissue Eng*. 2006. V. 12. № 10. P. 2739–2746.
28. Xu M., West E., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Biol. Reprod*. 2006. V. 75. № 6. P. 916–923.
29. Tagler D., Makanji Y., Tu T., Bernabé B.P., Lee R., Zhu J., Kniazeva E., Hornick J.E., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biotechnol. Bioeng*. 2014. V. 111. № 7. P. 1417–1429.
30. Conti M., Hsieh M., Park J.Y., Su Y.Q. // *Mol. Endocrinol*. 2006. V. 20. № 4. P. 715–723.
31. Dunning K.R., Cashman K., Russell D.L., Thompson J.G., Norman R.J., Robker R.L. // *Biol. Reprod*. 2010. V. 83. № 6. P. 909–918.
32. Montjean D., Entezami F., Lichtblau I., Belloc S., Gurgan T., Menezo Y. // *J. Assist. Reprod. Genet*. 2012. V. 29. № 11. P. 1221–1225.
33. Downs S.M., Mosey J.L., Klinger J. // *Mol. Reprod. Dev*. 2009. V. 76. № 9. P. 844–853.
34. Xu J., Bernuci M.P., Lawson M.S., Yeoman R.R., Fisher T.E., Zelinski M.B., Stouffer R.L. // *Reproduction*. 2010. V. 140. P. 685–697.
35. Tsai A.G., Friesenecker B., Mazzoni M.C., Kerger H., Buerk D.G., Johnson P.C., Intaglietta M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 6590–6595.
36. Silva A.E., Rodriguez P., Cavalcante L.F., Rodrigues B.A., Rodrigues J.L. // *Reprod. Domest. Anim*. 2009. V. 44. Suppl 2. P. 259–262.
37. Adam A.A., Takahashi Y., Katagiri S., Nagano M. // *Jpn. J. Vet. Res*. 2004. V. 52. № 2. P. 77–84.
38. Hu Y., Betzendahl I., Cortvrindt R., Smitz J., Eichenlaub-Ritter U. // *Hum. Reprod*. 2001. V. 16. № 4. P. 737–748.
39. Banwell K.M., Lane M., Russell D.L., Kind K.L., Thompson J.G. // *Hum. Reprod*. 2007. V. 22. № 10. P. 2768–2775.
40. Kang J.T., Kwon D.K., Park S.J., Kim S.J., Moon J.H., Koo O.J., Jang G., Lee B.C. // *J. Vet. Sci*. 2013. V. 14. № 1. P. 15–20.
41. Kere M., Siriboon C., Lo N.W., Nguyen N.T., Ju J.C. // *J. Reprod. Dev*. 2013. V. 59. № 1. P. 78–84.
42. Choi J.Y., Kang J.T., Park S.J., Kim S.J., Moon J.H., Saadeldin I.M., Jang G., Lee B.C. // *J. Reprod. Dev*. 2013. V. 59. № 5. P. 450–456.
43. Tagler D., Tu T., Smith R.M., Anderson N.R., Tinggen C.M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Tissue Eng. Part. A*. 2012. V. 18. № 11–12. P. 1229–1238.

УДК 577.152.161; 577.151.02

Поиск ингибиторов лактатдегидрогеназы А человека с использованием компьютерного моделирования

Д. К. Нилов^{1,2*}, Е. А. Прохорова², В. К. Швядас^{1,2}¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

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

Поступила в редакцию 10.12.2014

РЕФЕРАТ Изоформа А лактатдегидрогеназы человека играет важную роль в жизнеобеспечении опухолевых клеток с анаэробным метаболизмом, поэтому поиск эффективных ингибиторов фермента является перспективным направлением создания новых лекарственных препаратов. С целью выявления новых ингибиторов, конкурентных по отношению к субстрату и к кофактору, созданы полноатомные модели лактатдегидрогеназы А (со связанной молекулой NADH и без нее), разработаны структурные критерии отбора потенциальных ингибиторов и проведен компьютерный скрининг библиотеки низкомолекулярных соединений. Это позволило обнаружить потенциальный ингибитор STK381370, положение которого стабилизировано дополнительными взаимодействиями с петлей 96–111, обеспечивающей переход из открытой конформации в закрытую.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА докинг, ингибитор, лактатдегидрогеназа, молекулярное моделирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ЛДГ-А – изоформа А лактатдегидрогеназы; 88N – название ингибитора, представленное в кристаллической структуре 4ajr.

ВВЕДЕНИЕ

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – фермент, превращающий пируват в лактат на последнем этапе анаэробного гликолиза. Принимая во внимание особенности энергетического метаболизма опухолей, связанные с активацией гликолиза и снижением работы митохондриальной дыхательной цепи (так называемый эффект Варбурга) [1], ЛДГ человека рассматривается как фермент, важный для пролиферации опухолевой ткани и перспективная мишень для терапии опухолей. Одна из причин усиления гликолитической активности в опухолевых клетках – повышенный уровень экспрессии изоформы А ЛДГ (ЛДГ-А) [2, 3]. Селективное ингибирование ЛДГ-А способно, таким образом, эффективно подавить синтез АТФ в опухолевых клетках и способствовать их гибели [4–6]. Отдельную задачу представляет обеспечение селективности в отношении изоформ фермента А и В (изоформа из сердечной мышцы), которые обладают высоким структурным сходством [7]. Доступные

кристаллографические структуры ЛДГ-А человека, а также ясное представление о строении активного центра и механизме катализа служат хорошей предпосылкой поиска и оптимизации ингибиторов.

ЛДГ-А состоит из четырех субъединиц, каждая из которых содержит активный центр. Сначала с субъединицей связывается кофермент NADH, затем молекула пирувата. Среди участвующих в связывании аминокислотных остатков можно выделить Arg168, боковая цепь которого образует вилочковое взаимодействие с карбоксильной группой пирувата [8]. В ходе реакции происходит перенос гидрид-иона с NADH на карбонильный углерод пирувата и протона с His192 на карбонильный кислород. Важную роль в катализе играет петля 96–111, закрывающая активный центр ЛДГ-А после связывания кофермента и субстрата. Переход в закрытую конформацию обеспечивает образование водородных связей между пируватом и остатком Arg105 для последующей стабилизации переходного состояния и является

лимитирующей стадией восстановления пирувата [9]. Кристаллическая структура тройного комплекса ЛДГ-А человека с NADH и оксаматом (PDB ID 1i10) показала, что после связывания субстратов сохраняется некоторая вероятность существования петли 96–111 в открытой конформации [7]. Две из восьми субъединиц в асимметрической ячейке (D и G) при этом остаются открытыми. Недавно были получены кристаллические структуры апоформы и двойного комплекса NADH с ЛДГ-А человека (PDB ID 4l4r и 4l4s соответственно), которые подтвердили, что связывание кофермента вызывает лишь небольшие локальные изменения структуры петли [10].

Несмотря на то что структура и физико-химические свойства ЛДГ-А хорошо изучены, описаны лишь несколько классов ее ингибиторов, большинство из которых обладают невысокой ингибирующей активностью [11]. Референтным соединением для изучения ингибирования ЛДГ является оксамат – структурный аналог пирувата, с константой ингибирования 26 мкМ по отношению к ЛДГ-А человека [12]. N-замещенные оксаматы также подавляют активность различных изоформ ЛДГ в микромолярном диапазоне концентраций [13, 14]. В недавних публикациях компаний AstraZeneca и ARIAD Pharmaceuticals сообщается о новых ингибиторах ЛДГ-А – производных малоновой и никотиновой кислоты [15, 16]. Эти ингибиторы получены путем линкерного соединения молекулярных фрагментов, взаимодействующих с участками связывания субстрата и кофактора. Фрагменты были обнаружены при помощи высокопроизводительного экспериментального скрининга коллекций соединений, при этом на отдельных этапах дополнительно применялись методы молекулярного моделирования. Установлена кристаллическая структура комплекса одного из наиболее эффективных ингибиторов с ЛДГ-А человека (PDB ID 4a1p), в котором петля 96–111 представлена в закрытой конформации. Интересно, что переход петли в закрытую конформацию не обязателен для эффективного связывания, поскольку известны несколько фермент-ингибиторных комплексов с открытой структурой ЛДГ-А [17–19].

Высокопроизводительное компьютерное моделирование взаимодействий с белком должно облегчить поиск потенциальных ингибиторов в обширных библиотеках соединений. Однако при таком моделировании следует учитывать подвижность петли 96–111, которая может вносить вклад в эффективность связывания ингибитора. Цель настоящей работы состояла в выборе подходящей для моделирования кристаллической структуры ЛДГ-А, построении полноатомной модели фермента и оценке пригодности модели для скрининга потенциальных ингибиторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модели ЛДГ-А человека были созданы на основе кристаллографической структуры 1i10 [7] с помощью пакетов программ AmberTools 1.2 и Amber 10 (<http://ambermd.org>) [20]. К структуре белка и лигандов добавляли атомы водорода, после этого молекулу белка помещали в ячейку воды типа TIP3P с минимальным расстоянием 12 Å от белка до края ячейки (при этом сохранялись кристаллические молекулы воды). Для нейтрализации заряда в систему добавляли ионы хлора. Минимизацию энергии полученной системы (2500 шагов по методу наискорейшего спуска, затем 2500 шагов по методу сопряженных градиентов) проводили с позиционными ограничениями 2 ккал/(моль × Å²) на тяжелых атомах белка и лигандов. Белок описывали с использованием силового поля *ff99SB* [21]. Для описания молекул NADH использовали параметры из базы данных AMBER parameter database [22], молекул оксамата – параметры из силового поля *GAFF* [23]. Из оптимизированной структуры удаляли молекулы воды и ионы хлора, в результате чего была получена модель 0 ЛДГ-А. Модели 1 и 2 для проведения докинга получены после удаления из модели 0 оксамата и оксамата с NADH соответственно.

Структуры пирувата и известных ингибиторов ЛДГ моделировали в программе ACD/ChemSketch 8.17 [24]. Компьютерный скрининг ингибиторов ЛДГ-А проводили в коммерческой библиотеке низкомолекулярных соединений Vitas-M [25]. Прежде всего структуры соединений протонировали с помощью OpenBabel 2.3.0 [26], и их геометрию оптимизировали с помощью CORINA 3.4 [27]. С использованием программы ACD/Spectrus DB 14.0 [28] из библиотеки отобрали производные пирувата и оксамата, удовлетворяющие правилу Липинского [29].

Молекулярный докинг соединений в активный центр моделей 1 и 2 с фиксированным положением аминокислотных остатков проводили с помощью программы Lead Finder 1.1.15 [30]. Потенциальная решетка (карта потенциала взаимодействия в активном центре) была построена для субъединицы A модели белка таким образом, чтобы охватить область связывания оксамата (в случае модели 1) или область связывания оксамата и NADH (в случае модели 2). Для этого вокруг указанных лигандов (координаты которых заимствованы из модели 0) строили минимальную по размеру решетку, и затем ее стороны сдвигали на 6 Å от центра, чтобы охватить близлежащее пространство. При оценке энергии связывания лиганда с белком учитывали Ван-дер-Ваальсово взаимодействие, наличие водородных связей, электростатическое взаимодействие, а также энтропийные эффекты, связанные с десольватацией и фиксацией

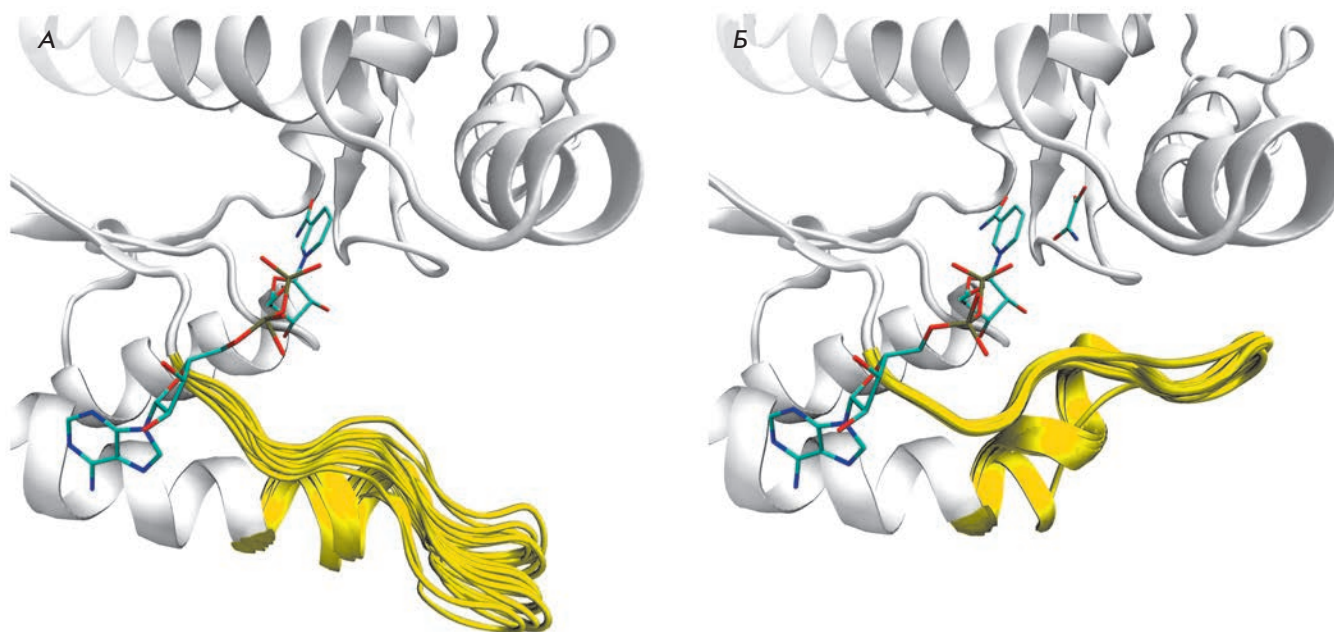


Рис. 1. Открытая (А) и закрытая (Б) конформации ЛДГ-А человека по данным рентгеноструктурного анализа. Петля 96–111 показана желтым цветом, позиции молекул NADH и оксамата раскрашены по атомам. Ансамбль открытых конформаций петли 96–111 получен путем наложения отдельных субъединиц из структур 4jnk (А, С, D), 4m49 (А–D), 4l4r (А, Н), 4l4s (А, Н), 4qo7 (А, С, D), 4qo8 (А, С, D) по C^{α} -атомам. Ансамбль закрытых конформаций получен путем наложения субъединиц из структур 1i10 (А–С, Е, F, Н), 4ajr (А–D)

торсионных углов. Поиск позиции соединений проводили с использованием генетического алгоритма в режиме «extra precision». Для расчета среднеквадратичного отклонения позиции ингибитора в модели использовали референсные координаты соединений из структур 1i10 и 4ajr (субъединица А). Автоматическую структурную фильтрацию комплексов осуществляли путем отбраковки структур, в которых расстояние между углеродом карбоксильной группы лиганда и углеродом гуанидиновой группы Arg168 составляло более 4.5 Å.

Визуализацию, наложение и анализ структур осуществляли с помощью программ VMD 1.8.6 [31] и Swiss-PdbViewer 4.1.0 [32].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор кристаллической структуры

В базе данных Protein Data Bank представлены следующие структуры ЛДГ-А человека: апоформа (PDB ID 4l4r), двойной комплекс с NADH (4l4s), комплексы с ингибиторами в открытой (4jnk, 4m49, 4qo7, 4qo8) и в закрытой (1i10, 4ajr) конформации. Чтобы проанализировать конформационное пространство подвижной петли 96–111, мы наложили отдельные субъединицы из этих структур на субъединицу

А из структуры 1i10 по C^{α} -атомам. Сравнение показало, что в открытой конформации петля может быть расположена различным образом, причем даже в пределах одного тетрамера (рис. 1А). Так, при наложении субъединиц из структуры апоформы 4l4r среднее квадратичное отклонение по C^{α} -атомам петли составляет 2.09 Å. В закрытой конформации, напротив, петля фактически находится в одном положении, небольшое отклонение имеет место только в субъединице Е комплекса 1i10 (рис. 1Б).

Целый ансамбль положений петли 96–111 в открытой конформации ЛДГ-А делает затруднительным выбор конкретной структуры для построения модели фермента. В недавней работе по моделированию конформационной подвижности ЛДГ-А было предложено использовать так называемый ансамблевый докинг, когда позицию потенциального ингибитора находят для различающихся структур белка, после чего анализируют набор полученных комплексов [33]. Однако такой подход генерирует большой объем данных, усложняет их анализ и выбор адекватных критериев оценки эффективности потенциальных ингибиторов.

В то же время структура закрытой конформации ЛДГ-А привлекательна для компьютерного поиска ингибиторов четко заданным положением петли 96–

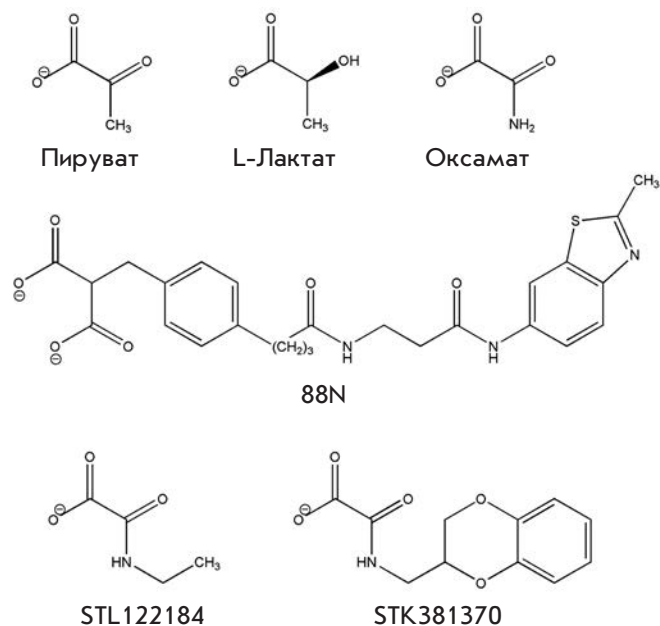


Рис. 2. Химические структуры субстратов и ингибиторов ЛДГ-А человека

111, а пригодность построенной на ее основе модели можно оценить путем докинга субстратов и известных ингибиторов. Поэтому далее мы сосредоточили внимание на структурах ЛДГ-А человека в закрытой конформации 1i10 и 4ajr. Структура 1i10 с разрешением 2.30 Å представляет комплекс с коферментом NADH и оксаматом, а структура 4ajr с разрешением 2.38 Å – комплекс с высокоэффективным ингибитором 88N, занимающим участки связывания субстрата и кофермента. Для моделирования была выбрана структура 1i10, ввиду более высокого разрешения и присутствия координат всех остатков в пределах тетрамера.

Построение полноатомных моделей фермента

К тетрамеру ЛДГ-А, взятому из кристаллической структуры 1i10, добавили атомы водорода. При этом остаток His192 был протонирован по N^{δ1}- и N^{ε2}-атомам имидазольного кольца, а другие ионогенные остатки активного центра (Arg98, Arg105, Arg168) были сконструированы в стандартной, заряженной форме. Для оптимизации координат добавленных атомов водорода проведена минимизация энергии сольватированной структуры. После удаления воды и связанных в активном центре лигандов (NADH и/или оксамата) получили две модели ЛДГ-А для молекулярного докинга. Модель 1, содержащую в активном центре молекулу NADH, для поиска конкурентных в отношении пирувата ингибиторов и мо-

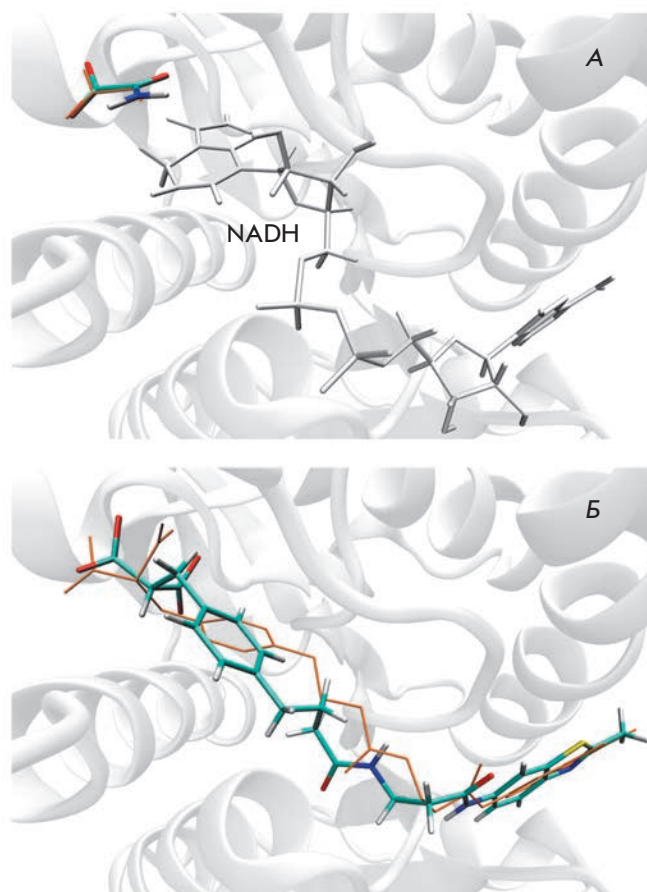


Рис. 3. Положения известных ингибиторов в активном центре ЛДГ-А человека, предсказанные методом молекулярного докинга. А – позиция оксамата в модели 1, содержащей молекулу NADH, $\Delta G^{\text{calc}} = -4.8$ ккал/моль. Б – позиция ингибитора 88N в модели 2, $\Delta G^{\text{calc}} = -9.6$ ккал/моль. Оранжевым цветом показаны координаты соединений в кристаллических структурах 1i10 и 4ajr

дель 2, не содержащую лигандов, для поиска ингибиторов, конкурирующих одновременно за участки связывания пирувата и NADH.

Валидацию моделей проводили путем докинга известных ингибиторов с установленной структурой комплекса с ЛДГ-А человека (рис. 2). В активный центр модели 1 докировали оксамат, структурный аналог субстрата. Среднеквадратичное отклонение предсказанной позиции оксамата от позиции в структуре 1i10 составило 0.24 Å (рис. 3А). При моделировании связывания субстрата показано, что пируват занимает схожую с оксаматом позицию, обеспечивающую необходимые для катализа взаимодействия с Arg105, Arg168, His192 и никотинамидным кольцом NADH. При докировании ингибитора 88N

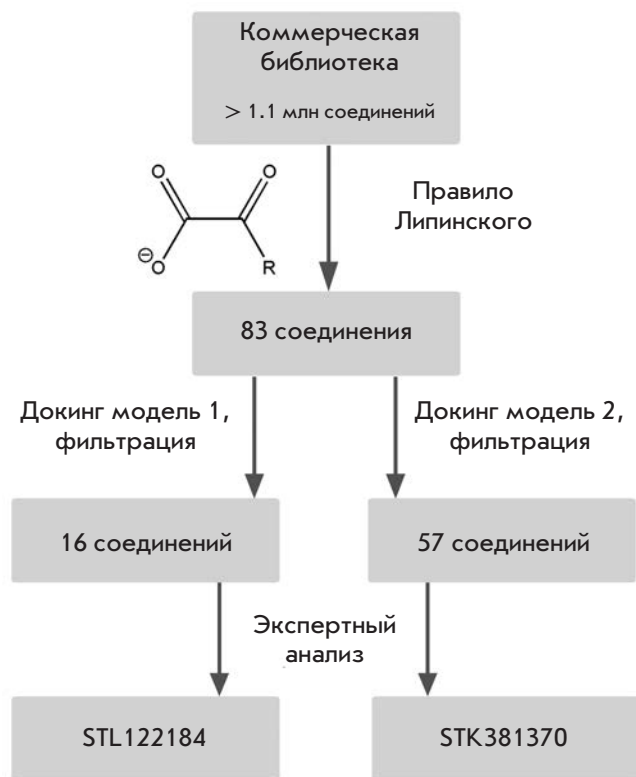


Рис. 4. Схема компьютерного поиска ингибиторов ЛДГ-А человека в коммерческой библиотеке низкомолекулярных соединений

в активный центр модели 2 отклонение от позиции в кристаллической структуре 4ajr составило 1.65 Å (рис. 3Б). Известные ингибиторы ЛДГ-А были правильно ориентированы в активном центре со среднеквадратичным отклонением от референсной позиции в пределах 2 Å, что доказывает эффективность использованного алгоритма докинга.

Учет взаимодействий с петлей 96–111

При компьютерном скрининге с использованием полученных моделей ЛДГ-А следует учитывать взаимодействия субстратов и ингибиторов с петлей 96–111, за счет которых поддерживается закрытая конформация фермента. Чтобы установить водородные связи и гидрофобные контакты, которые возникают при переходе петли 96–111 в закрытую конформацию, мы сравнили структуры апоформы 4l4r и фермент-ингибиторных комплексов 1i10 и 4ajr.

В комплексе 1i10 оксамат, структурный аналог пирувата, образует водородные связи с гуанидиновой группой остатка Arg105. Это взаимодействие с петлей хорошо известно, поскольку важно для стабилизации переходного состояния в ходе превращения

субстрата. Также имеют место водородная связь 3'-ОН-группы никотинамидной части NADH с кислородом остова Ala97, гидрофобный контакт между C2'- и C3'-атомами никотинамидной части NADH и C^β-атомом боковой цепи Arg98, электростатическое взаимодействие между пирофосфатной группой NADH и гуанидиновой группой Arg98 (таблица). В комплексе 4ajr карбоксильные группы ингибитора 88N взаимодействуют с Arg105 схожим с оксаматом образом, кроме того, одна из карбоксильных групп образует водородную связь с боковой цепью Gln99. C21-атом метиленовой группы и C27-атом бензольного кольца ингибитора образуют гидрофобный контакт с C^β-атомом Arg98. При этом следует отметить отсутствие сближения полярных групп ингибитора с гуанидиновой группой Arg98. Перечисленные водородные связи, электростатические взаимодействия и гидрофобные контакты с петлей 96–111 представлены в полученных методом докинга комплексах с пируватом, оксаматом, ингибитором 88N и могут быть использованы в качестве структурных критериев отбора потенциальных ингибиторов ЛДГ-А в ходе компьютерного скрининга.

Компьютерный скрининг ингибиторов

При исследовании пригодности созданных моделей ЛДГ-А для скрининга новых ингибиторов из коммерческой библиотеки были отобраны 83 производных пирувата и оксамата (α-оксокарбоновые кислоты и их соли), удовлетворяющих правилу Липинского. Данное правило определяет диапазон физико-химических параметров, которым характеризуется большинство известных лекарственных средств: молекулярная масса ≤ 500, log P ≤ 5, доноры водородной связи ≤ 5, акцепторы водородной связи ≤ 10. После докинга выбранных соединений в активный центр моделей 1 и 2 и структурной фильтрации из дальнейшего рассмотрения были исключены производные, не образующие вилочкового взаимодействия с остатком активного центра Arg168 (это взаимодействие ключевое для связывания пирувата и оксамата, поэтому должно быть свойственно селективным ингибиторам). При экспертном анализе оставшихся структур отбирали соединения, способные образовать дополнительные взаимодействия с белком (водородные связи и гидрофобные контакты). При этом необходимым условием для отбора соединения в качестве потенциального ингибитора было наличие хотя бы одного (для модели 1) или двух (для модели 2) взаимодействий с остатками петли 96–111 из таблицы. В результате для моделей ЛДГ-А 1 и 2 были отобраны соединения STL122184 ($\Delta G^{\text{calc}} = -4.9$ ккал/моль) и STK381370 ($\Delta G^{\text{calc}} = -7.9$ ккал/моль) соответственно (рис. 2, 4).

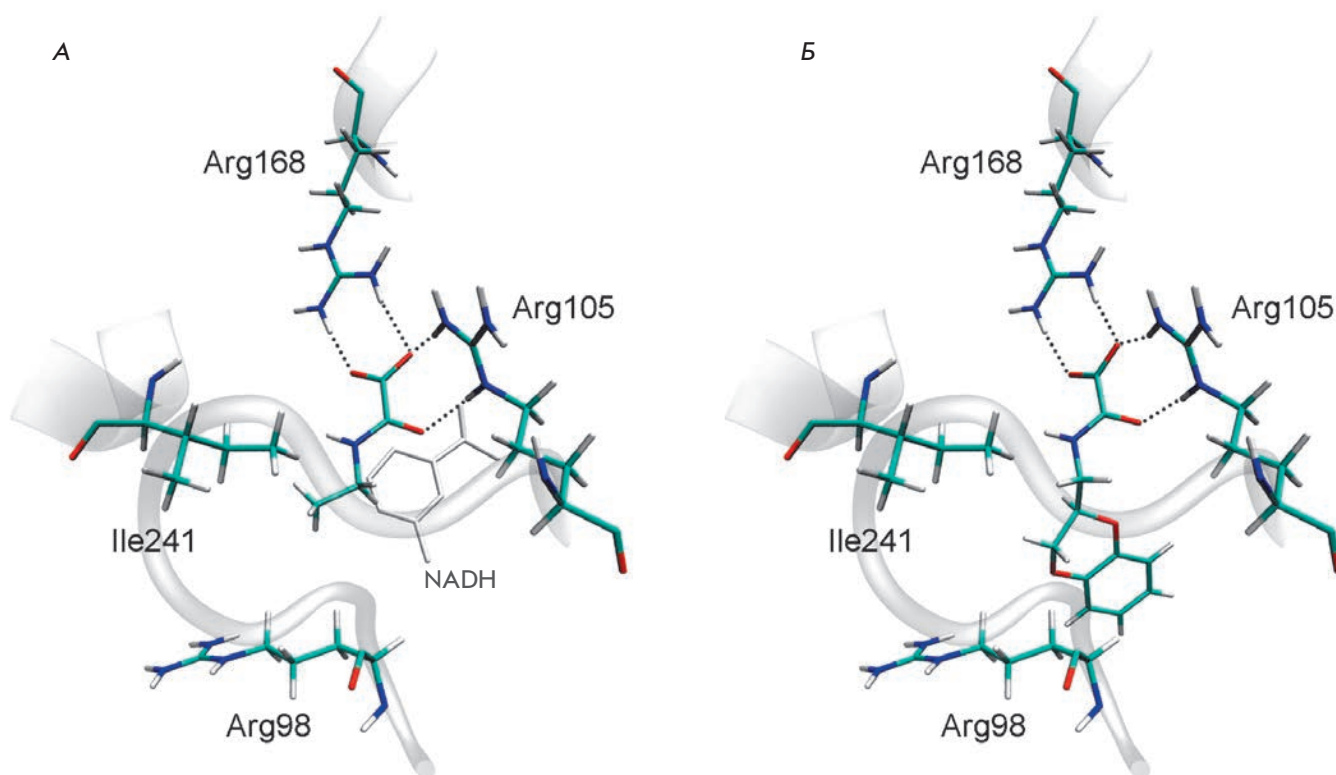


Рис. 5. Позиции потенциальных ингибиторов в активном центре ЛДГ-А человека, найденные в результате компьютерного скрининга коммерческой библиотеки соединений. А – позиция соединения STL122184 в модели 1. Б – позиция соединения STK381370 в модели 2. На рисунках показаны остатки подвижной петли 96–111 Arg98 и Arg105

Ранее было показано, что соединение STL122184 (N-этилоксаминовая кислота) является конкурентным в отношении пирувата ингибитором ЛДГ-А из скелетных мышц мышей ($K_i = 140 \text{ мкМ}$) [34]. В полученной модели комплекса STL122184 образует вилочковое взаимодействие с гуанидиновой группой Arg168, водородные связи с Arg105, а также гидрофобный контакт между этильным заместителем и боковой цепью Ile241 (рис. 5А). Следует отметить, что ближайшие структурные аналоги STL122184 – STK499896 (N-изопропилоксаминовая кислота) и STK501930 (N-пропилоксаминовая кислота) были отбракованы в ходе компьютерного скрининга ввиду отсутствия вилочкового взаимодействия с остатком Arg168 и по причине неблагоприятного контакта гидрофобного заместителя с остовом Thr247 соответственно. Экспериментальные данные по ингибированию ЛДГ-А мышей также свидетельствуют о низкой активности этих соединений [34, 35].

Ингибиторные свойства второго отобранного соединения, STK381370, не описаны. Этот потенциальный ингибитор ЛДГ-А образует необходимые взаимодействия, перечисленные выше для модели 2:

Взаимодействия между петлями 96–111, никотинамидной частью NADH, оксаматом (ОХМ) и ингибитором 88N в закрытой конформации. Расстояния до NADH и оксамата усреднены по субъединицам А–С, F, H структуры 1i10, до ингибитора 88N – по субъединицам А–D структуры 4ajp

Взаимодействие	Расстояние, Å	
	1i10	4ajp
Ala97:O ... NADH:O3'	2.88	
Arg98:CB ... NADH:C2'	3.71	
Arg98:CB ... NADH:C3'	3.56	
Arg98:NH1 ... NADH:P	4.0	
Arg105:NH2 ... ОХМ:O _{карбоксил}	2.86	
Arg105:NE ... ОХМ:O _{карбонил}	2.93	
Arg98:CB ... 88N:C21		4.38
Arg98:CB ... 88N:C27		4.45
Gln99:NE2 ... 88N:O _{карбоксил2}		2.72
Arg105:NH2 ... 88N:O _{карбоксил1}		3.14
Arg105:NE ... 88N:O _{карбоксил2}		3.04

вилочковое взаимодействие с Arg168, водородные связи с Arg105 и гидрофобный контакт с боковой цепью Arg98 (рис. 5Б). Кроме того, полициклическая часть STK381370 может образовывать водородную связь с боковой цепью Asn137 и гидрофобный контакт с Val30.

ВЫВОДЫ

Мобильность петли 96–111, участвующей в формировании активного центра ЛДГ-А человека, играет важную роль в механизме эффективного связывания ингибиторов. Анализ кристаллографических данных показал, что в открытой конформации петля может располагаться различным образом. При переходе в закрытую конформацию положение петли 96–111 стабилизируется за счет водородных связей и ги-

дрофобных контактов остатков Ala97, Arg98, Gln99 и Arg105 с субстратами и ингибиторами.

На основе кристаллической структуры тетрамера 1i10 для поиска новых ингибиторов ЛДГ-А созданы полноатомные модели ЛДГ-А человека (с молекулой NADH и без нее), показана их пригодность для скрининга библиотеки низкомолекулярных соединений. В качестве структурных критериев отбора потенциальных ингибиторов выбрано наличие водородных связей и гидрофобных контактов с петлей 96–111. Это позволило обнаружить потенциальный ингибитор STK381370, положение которого стабилизировано дополнительными взаимодействиями с остатками Arg105 и Arg98. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 14-08-01251).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Warburg O. // *Science*. 1956. V. 124. P. 269–270.
- Goldman R.D., Kaplan N.O., Hall T.C. // *Cancer Res*. 1964. V. 24. P. 389–399.
- Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Sivridis E., Bougioukas G., Didilis V., Gatter K.C., Harris A.L. // *Br. J. Cancer*. 2003. V. 89. P. 877–885.
- Fantini V.R., St-Pierre J., Leder P. // *Cancer Cell*. 2006. V. 9. P. 425–434.
- Le A., Cooper C.R., Gouw A.M., Dinavahi R., Maitra A., Deck L.M., Royer R.E., Vander Jagt D.L., Semenza G.L., Dang C.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 2037–2042.
- Miao P., Sheng S., Sun X., Liu J., Huang G. // *IUBMB Life*. 2013. V. 65. P. 904–910.
- Read J.A., Winter V.J., Eszes C.M., Sessions R.B., Brady R.L. // *Proteins*. 2001. V. 43. P. 175–185.
- Dunn C.R., Wilks H.M., Halsall D.J., Atkinson T., Clarke A.R., Muirhead H., Holbrook J.J. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 1997. V. 332. P. 177–184.
- Gerstein M., Chothia C. // *J. Mol. Biol*. 1991. V. 220. P. 133–149.
- Dempster S., Harper S., Moses J.E., Dreveny I. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. 2014. V. 70. P. 1484–1490.
- Granchi C., Bertini S., Macchia M., Minutolo F. // *Curr. Med. Chem*. 2010. V. 17. P. 672–697.
- Eszes C.M., Sessions R.B., Clarke A.R., Moreton K.M., Holbrook J.J. // *FEBS Lett*. 1996. V. 399. P. 193–197.
- Yu Y., Deck J.A., Hunsaker L.A., Deck L.M., Royer R.E., Goldberg E., Vander Jagt D.L. // *Biochem. Pharmacol*. 2001. V. 62. P. 81–89.
- Choi S.R., Beeler A.B., Pradhan A., Watkins E.B., Rimoldi J.M., Tekwani B., Avery M.A. // *J. Comb. Chem*. 2007. V. 9. P. 292–300.
- Ward R.A., Brassington C., Breeze A.L., Caputo A., Critchlow S., Davies G., Goodwin L., Hassall G., Greenwood R., Holdgate G.A., et al. // *J. Med. Chem*. 2012. V. 55. P. 3285–3306.
- Kohlmann A., Zech S.G., Li F., Zhou T., Squillace R.M., Commodore L., Greenfield M.T., Lu X., Miller D.P., Huang W.S., et al. // *J. Med. Chem*. 2013. V. 56. P. 1023–1040.
- Dragovich P.S., Fauber B.P., Corson L.B., Ding C.Z., Eigenbrot C., Ge H., Giannetti A.M., Hunsaker T., Labadie S., Liu Y., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2013. V. 23. P. 3186–3194.
- Fauber B.P., Dragovich P.S., Chen J., Corson L.B., Ding C.Z., Eigenbrot C., Giannetti A.M., Hunsaker T., Labadie S., Liu Y., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2013. V. 23. P. 5533–5539.
- Dragovich P.S., Fauber B.P., Boggs J., Chen J., Corson L.B., Ding C.Z., Eigenbrot C., Ge H., Giannetti A.M., Hunsaker T., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2014. V. 24. P. 3764–3771.
- 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.
- Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling, C. // *Proteins*. 2006. V. 65. P. 712–725.
- Walker R.C., de Souza M.M., Mercer I.P., Gould I.R., Klug D.R. // *J. Phys. Chem. B*. 2002. V. 106. P. 11658–11665.
- Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. // *J. Comput. Chem*. 2004. V. 25. P. 1157–1174.
- ACD/ChemSketch Freeware, version 8.17. Advanced Chemistry Development, Inc., www.acdlabs.com. 2005.
- ST(K/L) collection. Vitas-M Laboratory, Ltd, www-vitasm-lab.com. 2012.
- O’Boyle N.M., Banck M., James C.A., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G.R. // *J. Cheminform*. 2011. V. 3. P. 33.
- Sadowski J., Gasteiger J., Klebe G. // *J. Chem. Inf. Comput. Sci*. 1994. V. 34. P. 1000–1008.
- ACD/Spectrus DB, version 14.01. Advanced Chemistry Development, Inc., www.acdlabs.com. 2012.
- Lipinski C.A. // *Drug Discov. Today Technol*. 2004. V. 1. P. 337–341.
- Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Chem. Inf. Model*. 2008. V. 48. P. 2371–2385.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graphics*. 1996. V. 14. № 1. P. 33–38.
- Guex N., Peitsch M.C. // *Electrophoresis*. 1997. V. 18. P. 2714–2723.
- Buonfiglio R., Ferraro M., Falchi F., Cavalli A., Masetti M., Recanatini M. // *J. Chem. Inf. Model*. 2013. V. 53. P. 2792–2797.
- Rodríguez-Páez L., Chena-Taboada M.A., Cabrera-Hernández A., Cordero-Martínez J., Wong C. // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. 2011. V. 26. P. 579–586.
- Wong C., Rodríguez-Páez L., Nogueira B., Pérez A., Baeza I. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1343. P. 16–22.

УДК 577.21

Модифицированный метод анализа структуры рРНК позволил выявить новые свойства аналогов С/D-бокс-РНК

Ю. А. Филиппова^{1,2*}, Г. А. Степанов¹, Д. В. Семенов¹, О. А. Коваль^{1,2}, Е. В. Кулигина¹, И. В. Рабинов¹, В. А. Рихтер¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: filipova@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 04.08.2014

После доработки 19.01.2015

РЕФЕРАТ Созревание рибосомных РНК (рРНК) представляет собой сложный процесс, в ходе которого отдельные нуклеотиды подвергаются химическим модификациям по азотистым основаниям или остатку рибозы. Одна из самых распространенных модификаций рРНК – 2'-О-метилирование нуклеотидов – осуществляется рибонуклеопротеидными комплексами, содержащими в своем составе малые ядрышковые С/D-бокс-РНК. Поскольку большая часть 2'-О-метилированных нуклеотидов расположена в наиболее консервативных участках рРНК, формирующих важнейшие функциональные центры рибосом, то изменения в профиле 2'-О-метилирования могут приводить к нарушению сборки и функционирования рибосом. Один из основных методов выявления положений 2'-О-метилированных нуклеотидов в протяженных РНК – метод терминации обратной транскрипции. В настоящей работе этот метод адаптирован к использованию флуоресцентно меченных праймеров и анализу продуктов терминации капиллярным гель-электрофорезом на автоматическом геномном анализаторе. С помощью разработанного подхода проанализировано действие синтетических аналогов С/D-бокс-РНК на посттранскрипционные модификации 28S рРНК человека в клетках линии MCF-7. Установлено, что трансфекция клеток MCF-7 аналогом С/D-бокс-РНК приводит к увеличению глубины модификации отдельных сайтов 2'-О-метилирования в рРНК-мишени. Наблюдаемый эффект воздействия синтетических РНК на 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК в клетках человека указывает на возможность направленной регуляции посттранскрипционного созревания рРНК. Представленный подход может найти применение в разработке методов выявления заболеваний человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА малые ядрышковые С/D-бокс-РНК, посттранскрипционные модификации нуклеотидов РНК, 2'-О-метилирование РНК, терминация обратной транскрипции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ рРНК – рибосомная РНК; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; мяоРНК – малая ядрышковая РНК; мяоРПК – малый ядрышковый рибонуклеопротеидный комплекс; FAM – 5(6)-карбокCIFлуоресцеин; M-MLV – Moloney Murine Leukemia Virus, вирус лейкоза мышей Молони; dNTP – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты; ОТ – обратная транскрипция; ПААГ – полиакриламидный гель.

ВВЕДЕНИЕ

РНК всех живых организмов подвергаются посттранскрипционной модификации и содержат не только канонические, но и модифицированные нуклеотиды, необходимые для правильного функционирования сложных биологических комплексов. Посттранскрипционные модификации существенно влияют на формирование вторичной структуры и функции РНК [1, 2].

Одна из наиболее распространенных модификаций некодирующих РНК у млекопитающих – метилирование нуклеотидов по 2'-О-положению рибозы [3]. Положения многих сайтов 2'-О-метилирования в рРНК носят консервативный характер, а большинство модификаций обнаружены в наиболее эволюционно консервативных и важных участках рРНК, которые играют ключевую роль на различных этапах трансляции [4]. Изменение общей картины распре-

деления модифицированных нуклеотидов или недостаток таких нуклеотидов могут привести к нарушению сборки и функционирования рибосом [5, 6]. Например, показано, что блокирование модификации нуклеотидов пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) рибосом вызывает изменения во вторичной структуре 25S рРНК дрожжей, нарушает трансляционную активность рибосом и повышает, в ряде случаев, чувствительность клеток к действию ингибиторов трансляции [2, 7].

Считается, что модификации способствуют стабилизации «функциональной» структуры рРНК за счет влияния на внутри- и межмолекулярные взаимодействия [2]. На данный момент основной функцией модификаций считают участие в созревании и сборке рибосом: модификация рРНК в определенной степени может служить дополнительным критерием качества новосинтезированной рРНК, что способствует отбору только «правильных» рРНК для включения в рибосомы [8].

Известно, что 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК и малых ядерных РНК клеток млекопитающих осуществляют рибонуклеопротеидные комплексы (мяоРПК), содержащие малые ядрышковые С/D-боксы-РНК [9]. При этом С/D-боксы-РНК, будучи комплементарными участку РНК-мишени, непосредственно участвуют в процессе узнавания нуклеотида-мишени 2'-О-метилирования – модификации подвергается пятый нуклеотид от D-бокса (рис. 1) [10, 11].

Недавно показали, что в клетках некоторых типов рака повышен уровень экспрессии генов С/D-боксы-РНК, а также фибрилларина – ключевого белка мяоРПК, выполняющего роль метилтрансферазы [12, 13]. Установлено, что клетки рака молочной железы разного типа могут отличаться глубиной модификации отдельных нуклеотидов рРНК [14]. Различия в экспрессии отдельных С/D-боксы-РНК выявлены и при разных типах лейкоза [15]. Ранее уже отмечалось, что нарушения в созревании рРНК и синтеза рибосомных белков в клетках человека могут приводить к патологическим изменениям [16, 17]. Таким образом, мяоРНК могут участвовать в онкогенезе, а изменение профиля 2'-О-метилирования рРНК может иметь диагностическую значимость. Поэтому актуальной представляется разработка новых подходов к анализу структуры рРНК и других протяженных клеточных РНК, позволяющих количественно оценивать глубину модификации отдельных нуклеотидов таких РНК.

В настоящей работе метод определения положений 2'-О-метилированных нуклеотидов РНК адаптирован к использованию 5'-флуоресцентно меченных праймеров с последующим анализом продуктов

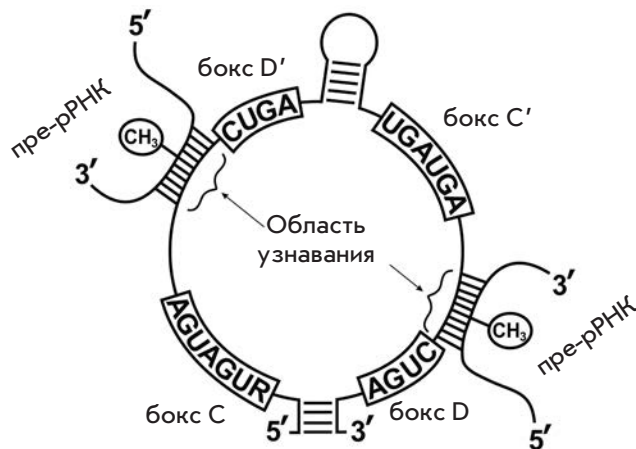


Рис. 1. Структура С/D-боксы-РНК и ее взаимодействие с предшественником рРНК

терминации обратной транскрипции (ОТ) на автоматическом ДНК-анализаторе. При помощи предложенного подхода проведен анализ влияния синтетических аналогов С/D-боксы-РНК на изменение профиля 2'-О-метилированных нуклеотидов рРНК в клетках человека. Показано, что при трансфекции клеток аденокарциномы MCF-7 синтетическими С/D-боксы-РНК, направленными на 28S рРНК, происходит увеличение глубины 2'-О-метилирования отдельных нуклеотидов рРНК-мишени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Анализ профилей 2'-О-метилирования 18S и 28S рРНК человека

Номера нуклеотидов рРНК человека приведены в соответствии с GenBank: U13369 (7935–12969 н.) для 28S рРНК и X03205 для 18S рРНК.

Обратную транскрипцию проводили с использованием праймеров, содержащих на 5'-конце [³²P] либо остаток 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеина (FAM): 18-2 – 5'-ТААТГАТССТТССГСАГГТТС-3' (комплементарен участку 1849–1869 н. 18S рРНК); FAM-28-2.2 – 5'-АТТГГСТССТСАГССААГСА-3' (4608–4627 н. 28S рРНК) и FAM-4491 – 5'-GACGGTCTAAACCCAGCTCA-3' (4491–4510 н. 28S рРНК). Реакционную смесь, содержащую 3.0 мкг суммарной клеточной РНК и 1.4 пмоль праймера, инкубировали при 70°C в течение 3 мин и охлаждали до 4°C. Добавляли буфер для обратной транскрипции, содержащий (мМ) 50 КСl, 50 Трис-НСl (рН 8.3), 4 MgCl₂ и 10 ДТТ; а также 3 ед. акт./мкл обратной транскриптазы М-МlV («Биосан», Новосибирск).

В отдельные пробы добавляли dNTP до конечной концентрации 2.0, 1.0, 0.1 или 0.04 мМ. Реакционную смесь инкубировали 2 ч при 40°C. Продукты ОТ осаждали 75% этанолом, высушивали и растворяли в деионизованной воде.

Секвенирование участка 18S рРНК проводили методом обратной транскрипции в присутствии ddNTP. Для этого инкубировали 3.0 мкг суммарной клеточной РНК и 1.4 пмоль праймера 18-2 в течение 3 мин при 70°C, охлаждали до 4°C. К смеси добавляли один из ddNTP: ddATP до конечной концентрации 5.0 мкМ, ddCTP – 2.5 мкМ, ddGTP – 5.0 мкМ или dTTP – 5.0 мкМ. Конечная концентрация dNTP, соответствующего ddNTP в смеси, равна 25 мкМ, а остальных dNTP – 100 мкМ. К полученной смеси добавляли буфер для обратной транскрипции (см. выше), а также 2.0 мМ MnCl₂, 10 мМ ДТТ и 3 ед. акт./мкл обратной транскриптазы M-MLV. Смесь инкубировали в течение 90 мин при 40°C. Продукты ОТ осаждали 75% этанолом, высушивали и растворяли в деионизованной воде.

Анализ продуктов обратной транскрипции рибосомных РНК клеток человека

Флуоресцентно меченные продукты обратной транскрипции рРНК анализировали на анализаторе ABI3100 Applied Biosystems (ЦКП «Геномика» СО РАН). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Peak Scanner Software версии 1.0 (Applied Biosystems, США). Относительное изменение выхода продуктов ОТ определяли с использованием значений площадей пиков, нормированных на сумму площадей пиков, относительная интенсивность которых изменялась меньше чем на 20%. Представлены средние данные как минимум трех независимых экспериментов.

Получение синтетических С/Д-боксов-РНК

Аналоги С/Д-боксов-РНК были получены с помощью транскрипции *in vitro* согласно [18, 19]:

28A4518 (98 н.)

5'-

GACUCAGCAUGCGUGUUCAUGCUAUGAUGAAA-AAGUCAACUUAGGCGUGGUUGUGGCCUAAAA-CUAACCGUCUCUGAUGGCAGAGGCAUGCUGA-GUC-3';

РНК3 (77 н.)

5'-

GGGUGCAGAUGAUGUAAAAUAGCGACGGGCGG-UGCUGAGAGAUGGUGAUGAACGGUCUAAACCC-AGCUGAUGCACCC-3';

РНК5 (77 н.)

5'-

GGGUGCAGAUGAUGUAAAAUAGCGACGGGCGG-

UGCUGAGAGAUGGUGAUGAACGACGGUCUAAA-CCCUGAUGCACCC-3';

РНК5mC (77 н.)

5'-

GGGUGCAGACAGCACAAAAUAGCGACGGGCGG-UGCUGAGAGAUGGCAGCAGACGACGGUCUAAA-CCCUGAUGCACCC-3';

РНК5D/N (77 н.)

5'-

GGGUGCAGAUGAUGUAAAAUAGCGACGGGCGG-UGCUGAGAGAUGGUGAUGAACGACGGUCUAAA-CCAGUCUGCACCC-3';

РНК5mD (77 н.)

5'-

GGGUGCAGAUGAUGUAAAAUAGCGACGGGCGG-UGAAAAAGAGAUGGUGAUGAACGACGGUCUAAA-CCAAAAUGCACCC-3'.

Подчеркнута область узнавания нуклеотидов рРНК, жирным шрифтом выделены консервативные элементы (С- и D-боксы).

Трансфекция клеток MCF-7 синтетическими РНК. Выделение суммарной клеточной РНК

Клетки MCF-7 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, ИИЦ РАН, Санкт-Петербург) культивировали в среде IMDM с 10 мМ L-глутамином и 40 мкг/мл гентамицина в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Синтетические аналоги С/Д-боксов-РНК (10⁻⁶ М) предварительно инкубировали с липофектаминам (Lipofectamine Reagent, Invitrogen, США) в концентрации 0.06 мг/мл в течение 15 мин при 20°C. Клетки MCF-7 трансфицировали комплексом липофектамина с РНК (конечная концентрация РНК в среде 7 × 10⁻⁸ М). Контрольные клетки инкубировали в среде с липофектаминам (6 мкг/мл). После 24 ч инкубации суммарную РНК клеток выделяли с помощью Trizol Reagent (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Сохранность суммарной РНК оценивали электрофорезом на Lab-on-chip анализаторе нуклеиновых кислот Agilent Bioanalyzer и использовали препараты со значениями RIN не менее 8.0. Профиль 2'-О-метилирования рРНК анализировали как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация метода терминации обратной транскрипции

Метод терминации обратной транскрипции основан на способности 2'-О-метилированных нуклеотидов вызывать остановку ревертазы при концентрации dNTP менее 1 мМ [20]. По длине

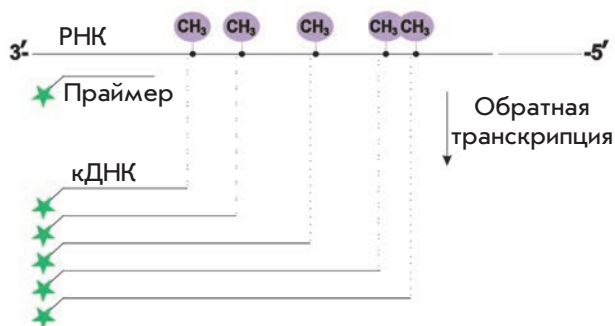


Рис. 2. Метод терминции обратной транскрипции

продуктов терминции ОТ можно судить о положениях 2'-О-метилованных нуклеотидов в анализируемой РНК-матрице [21] (рис. 2). В отличие от стандартной методики, которая предполагает проведение реакции обратной транскрипции с радиоактивно меченым праймером и разделение кДНК-продуктов в полиакриламидном геле с последующей радиоавтографией, разработанный нами подход основан на использовании флуоресцентно меченных праймеров и анализе кДНК капиллярным гель-электрофорезом на автоматическом генном анализаторе.

Возможность применения такого подхода к определению положений 2'-О-метилованных нуклеотидов в РНК изучали с помощью обратной транскрипции 18S или 28S рРНК из линии клеток MCF-7 с [5'-³²P]- или 5'-ФАМ-мечеными праймерами. На рис. 3 представлено сравнение типичных результатов «стандартного» метода с использованием радиоактивно меченных праймеров и метода, адаптированного к анализу флуоресцентно меченных кДНК-продуктов на автоматическом ДНК-анализаторе. Видно, что наборы кДНК-продуктов на рис. 3А,Б хорошо согласуются между собой по длине и относительному выходу.

Для точного определения соответствия детектируемых продуктов терминции ОТ положениям конкретных нуклеотидов РНК-матрицы мы разделяли продукты реакции секвенирования по Сэнгеру участка 18S рРНК (рис. 3А, нижняя вставка).

Воспроизводимость результатов оценивали с использованием данных трехкратного повторения обратной транскрипции суммарной клеточной РНК с праймерами, специфичными к различным участкам 18S и 28S рРНК, с последующим разделением ДНК-транскриптов на генном анализаторе. В серии экспериментов было установлено, что главные продукты терминции ОТ одинаковых участков рРНК-матрицы согласуются по времени выхода (± 1 н.) и интенсивностям сигналов кДНК ($\pm 10\%$) (данные не приведены).

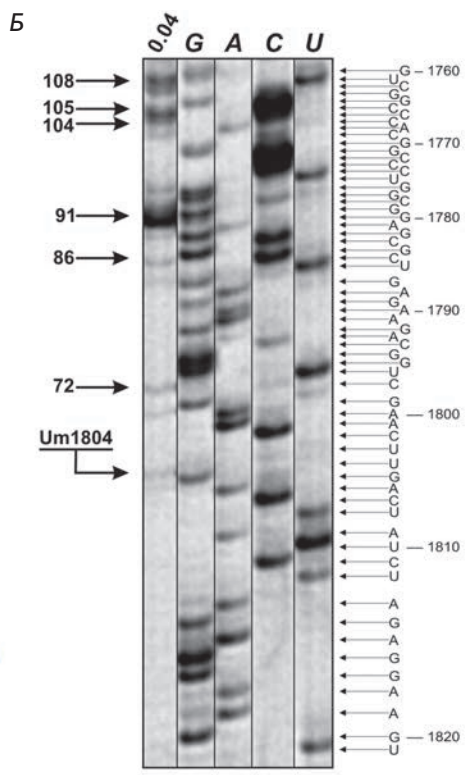
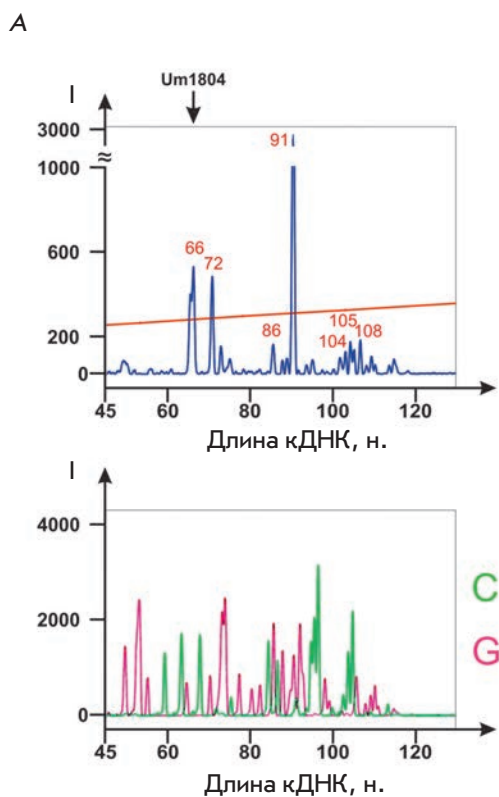
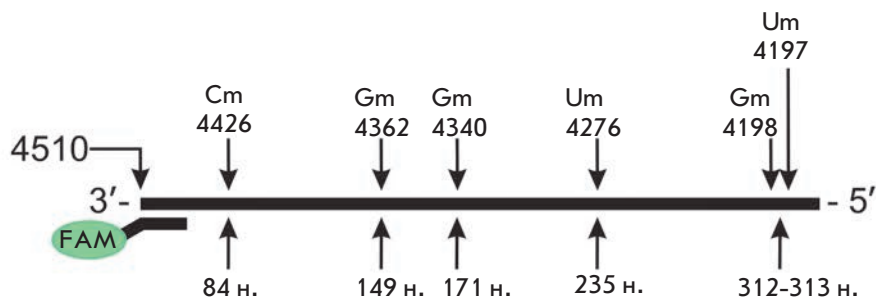
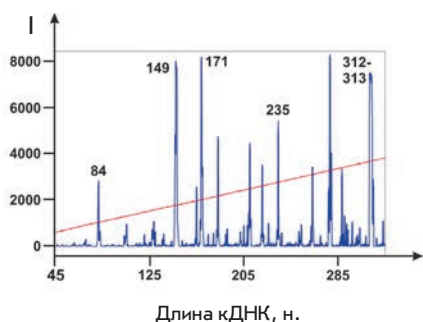


Рис. 3. Сравнение продуктов терминции обратной транскрипции 18S рРНК с [5'-³²P]-меченым и 5'-ФАМ-меченым праймером 18-2 (в присутствии 0.04 мМ dNTP). А – разделение 5'-ФАМ-меченных продуктов терминции ОТ капиллярным электрофорезом на автоматическом ДНК-анализаторе (верхняя вставка); продукты терминции ОТ 18S рРНК в присутствии ddGTP и ddCTP (нижняя вставка). Б – разделение [5'-³²P]-меченных продуктов ОТ в 12% денатурирующем ПААГ. Дорожка 0.04 – продукты терминции ОТ при 0.04 мМ dNTP. Дорожки G, A, C и U – терминция ОТ 18S рРНК в присутствии ddCTP, dTTP, ddGTP и ddATP соответственно

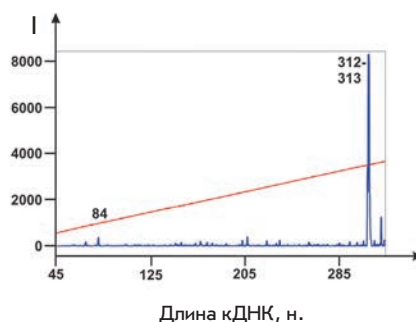
А



Б



В



Г

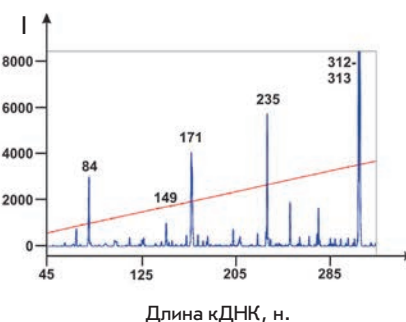


Рис. 4. Анализ кДНК-продуктов терминации ОТ, соответствующих известным сайтам 2'-О-метилирования в 28S рРНК. А – схема расположения 2'-О-метилированных нуклеотидов в 28S рРНК и длин соответствующих им кДНК-продуктов терминации ОТ с праймера FAM-4491. Б–Г – разделение FAM-меченых продуктов терминации ОТ на автоматическом ДНК-анализаторе. ОТ 28S рРНК клеток MCF-7 проводили при следующих концентрациях dNTP в реакционной смеси (мМ): Б – 0.1, В – 1.0, Г – 2.0

С помощью предлагаемого метода мы проанализировали наборы продуктов терминации ОТ 28S рРНК человека при разных концентрациях мономеров в реакционной смеси. В дополнение к стандартным условиям эксперимента по терминации ОТ, при которых используют пониженные концентрации dNTP в реакционной смеси (0.001–0.1 мМ) [21], мы проводили реакцию и при повышенных концентрациях мономеров (2.0 мМ). Из рис. 4 видно, что при понижении концентрации dNTP в реакционной смеси увеличивается выход кДНК-продуктов длиной 84, 149, 171 и 235 н., соответствующих известным сайтам 2'-О-метилирования – Cm4426, Gm4362, Gm4340 и Um4276 (рис. 4Б,В). ОТ терминируется непосредственно на модифицированном нуклеотиде (Gm4362, Gm4340 и Um4276) либо на нуклеотиде, прилежащем с 3'-конца к 2'-О-метилированному (Cm4426). Кроме того, установлено, что при повышении концентрации dNTP до 2.0 мМ удастся увеличить специфичность терминации на 2'-О-метилированных нуклеотидах рРНК. Так, при 2.0 мМ dNTP выход продуктов терминации, не относящихся к 2'-О-метилированным нуклеотидам РНК-матрицы, значительно снижает-

ся по сравнению с ОТ, проводимой при 0.1 мМ dNTP (рис. 4Б,Г).

Преимуществом нового подхода является возможность количественной оценки выхода продуктов терминации ОТ. При этом разделение продуктов терминации на автоматическом генном анализаторе позволяет получать более полную информацию о распределении сайтов терминации в структуре РНК-матрицы за счет анализа более протяженных участков РНК по сравнению со стандартным разделением кДНК в денатурирующем ПААГ. Предложенный подход может быть использован как для идентификации модифицированных нуклеотидов в природных РНК и подтверждения положений сайтов модификации в синтетических РНК, так и для решения других задач, связанных с анализом структуры протяженных РНК, методом обратной транскрипции.

Влияние аналогов С/Д-боксов-РНК на профиль 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК человека

Представленный в нашей работе подход был использован для изучения влияния аналогов малых ядерш-

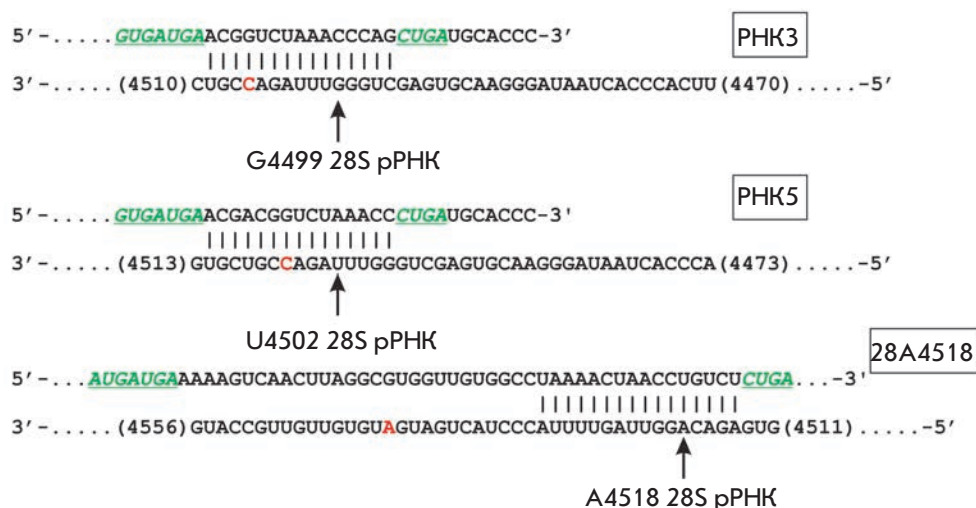


Рис. 5. Конструирование синтетических аналогов С/D-боксов-РНК. Консервативные элементы аналогов мяоРНК – С (С')- и D (D')-боксы – выделены зеленым цветом. Нуклеотиды-мишени в рРНК обозначены стрелкой с указанием номера нуклеотида в соответствии с [26]. Известные 2'-О-метилованные нуклеотиды в структуре 28S рРНК выделены красным цветом. В рамках справа приведены обозначения аналогов С/D-боксов-РНК, содержащих в своей структуре соответствующую область комплементарности к рРНК

ковых С/D-боксов-РНК на процессинг рРНК-мишеней в клетках человека. Ранее J. Cavaille и соавт. показали возможность направления 2'-О-метилования нуклеотидов рРНК с использованием ДНК-конструкций, кодирующих С/D-боксов-РНК [22]. Нами были сконструированы и получены синтетические аналоги малых ядрышковых С/D-боксов-РНК человека, содержащие измененные области узнавания мишени (рис. 1). В качестве мишеней синтетических С/D-боксов-РНК были выбраны нуклеотиды рРНК человека, входящие в состав или находящиеся вблизи ПТЦ рибосом – G4499, U4502 и A4518 28S рРНК [23–25]. Аналоги малых ядрышковых С/D-боксов-РНК были сконструированы таким образом, чтобы их последовательности содержали необходимые компоненты для направления 2'-О-метилования в заранее заданный нуклеотид-мишень: консервативные области С- и D-боксов (домены узнавания белков мяоРНК); а также область, комплементарную участку рРНК-мишени (рис. 5).

Аналог С/D-боксов-РНК – 28A4518 – имел структуру, способную направлять 2'-О-метилование нуклеотида A4518 28S рРНК. Из рис. 6В видно, что трансфекция РНК 28A4518 в клетки человека линии MCF-7 не вызывает появления нового продукта терминации в положении нуклеотида-мишени, соответствующему кДНК длиной 109 н. Вопрос отсутствия модификации нуклеотидов-мишеней в составе рРНК мы обсуждали ранее [18]. В частности, мы полагаем, что наблюдаемое отсутствие 2'-О-метилования нуклеотидов-мишеней может указывать на низкое содержание модифицированной рРНК в клетках вследствие ее быстрой деградации. Как показано в работах В. Liu и М. J. Fournier с соавт., 2'-О-метилование ряда нуклеотидов, формирующих активные центры рибосом клеток дрожжей,

индуцирует деградацию рРНК-мишеней и приводит к снижению скорости роста клеток [23, 27, 28].

Несмотря на отсутствие терминации на нуклеотиде-мишени РНК 28A4518, трансфекция клеток синтетическим аналогом приводила к изменению глубины 2'-О-метилования известных сайтов модификации рРНК. Из данных рис. 6 видно, что увеличивается выход продуктов терминации, соответствующих положениям 2'-О-метилованных Gm4362, Gm4198 и Um4197 (рис. 6Б,В). Сравнение значений интенсивностей кДНК-продуктов показало, что трансфекция клеток аналогом РНК 28A4518 приводит к усилению терминации на нуклеotide Gm4362 в 1.5 раза, тогда как выход продукта длиной 428–429 н. (Gm4198 и Um4197) возрастает в 2.2 раза. Повышение выхода продуктов ОТ, соответствующих остановке ревертазы на 2'-О-метилованных нуклеотидах, указывает на большую глубину модификации этих нуклеотидов рРНК в трансфицированных клетках.

Изменение глубины модификации нуклеотидов рибосомных РНК может быть связано с увеличением локальной концентрации компонентов комплексов, осуществляющих 2'-О-метилование нуклеотидов при созревании ядрышкового предшественника рРНК. Нуклеотиды Gm4362, Gm4198 и Um4197 28S рРНК находятся на значительном расстоянии (более 150 н.) от участка комплементарности аналогов С/D-боксов-РНК к рРНК (рис. 5). Увеличение глубины 2'-О-метилования перечисленных нуклеотидов может быть связано с их сближенностью в пространственной структуре предшественника рРНК с нуклеотидами-мишенями С/D-боксов-РНК и миграцией компонентов метилтрансферазного комплекса от дуплекса С/D-боксов-РНК · рРНК к ближайшим нуклеотидам рРНК. Нельзя исключать также воз-

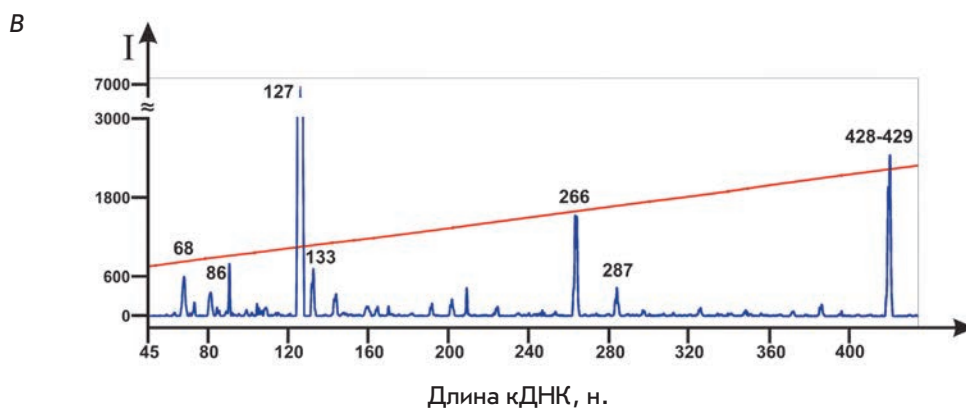
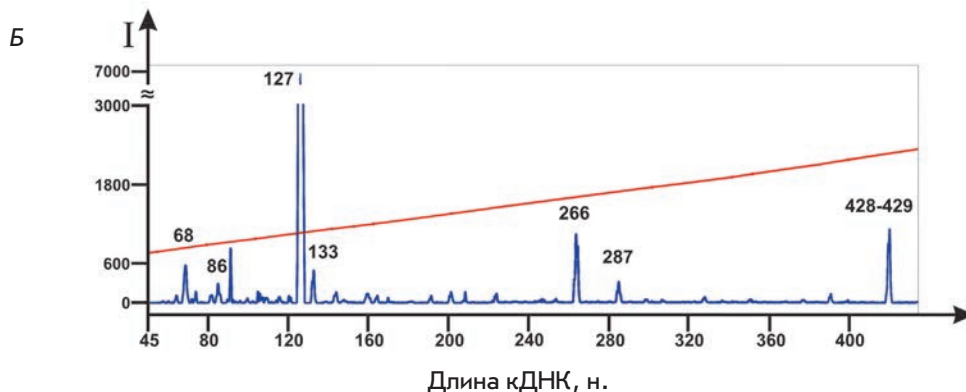
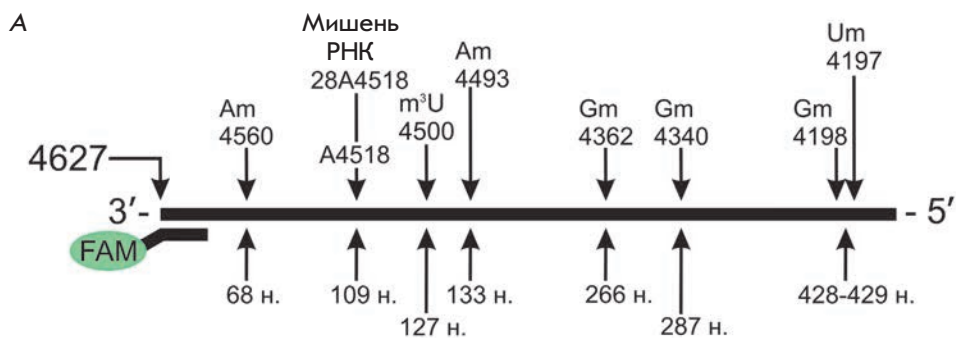


Рис. 6. Влияние синтетических аналогов С/D-боксов РНК на выход продуктов терминации ОТ рРНК. А – схема расположения 2'-О-метилованных нуклеотидов в 28S рРНК и длин соответствующих им продуктов терминации ОТ с праймера FAM-28-2.2. Продукты ОТ рРНК контрольных клеток МСF-7 (Б) и клеток МСF-7, трансфицированных аналогом 28А4518 (В). ОТ рРНК проводили при концентрации dNTP 0.04 мМ

возможное влияние синтетических РНК на вторичную структуру рРНК и взаимодействие с независимыми трансфакторами, контролирующими этапы созревания рРНК в клетках эукариот, такими, как РНК-геликазы [29].

Усиление терминации ОТ на известных сайтах 2'-О-метилования мы наблюдали при изучении воздействия других аналогов С/D-боксов-РНК на клетки человека. В частности, аналоги РНК3 и РНК5 были сконструированы таким образом, чтобы направлять 2'-О-метилование нуклеотидов 28S рРНК G4499 и U4502 соответственно. Трансфекция клеток МСF-7 аналогом РНК3 или РНК5 не индуцировала модификации нуклеотида-мишени, но приводила к усилению глубины 2'-О-метилования нуклеотида Cm4506

28S рРНК (рис. 7В,Г). Данные, представленные на рис. 7 и в таблице, показывают, что после трансфекции клеток МСF-7 синтетическими РНК3 и РНК5 выход кДНК-продукта длиной 121 н. увеличивается в 40 и 7 раз соответственно. Этот кДНК-продукт образуется в результате терминации ревертазы М-MLV на 2'-О-метилованном Cm4506 28S рРНК при элонгации праймера FAM-28-2.2. Наблюдаемое повышение выхода продукта терминации указывает на увеличение глубины 2'-О-метилования Cm4506.

С целью определения структурных особенностей аналогов С/D-боксов-РНК, влияющих на глубину природного 2'-О-метилования нуклеотидов рРНК, были получены аналоги С/D-боксов-РНК5, содержащие замены в последовательности С(С')-

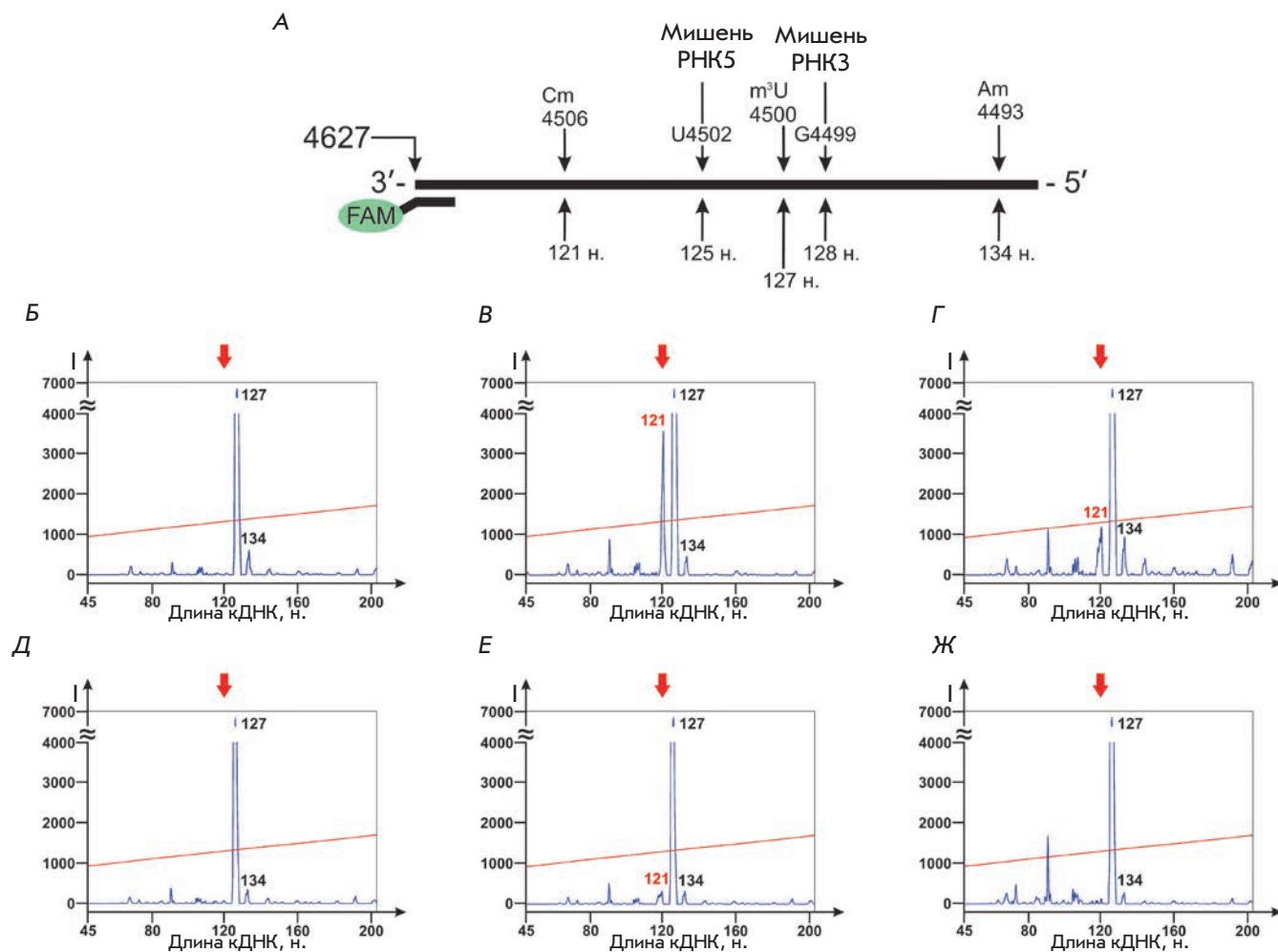


Рис. 7. Влияние синтетических аналогов С/Д-боксов-РНК на глубину 2'-О-метирирования нуклеотида Cm4506 28S рРНК в клетках человека. А – расположение праймера FAM-28-2.2, 2'-О-метирированных нуклеотидов 28S рРНК и нуклеотидов-мишеней аналогов С/Д-боксов-РНК. Б–Ж – разделение 5'-FAM-меченых продуктов терминиции ОТ 28S рРНК (при концентрации dNTP 0.04 мМ) контрольных клеток MCF-7 (Б) и клеток, трансфицированных РНКЗ (В), РНК5 (Г), РНК5мС (Д), РНК5D/Н (Е) и РНК5мD (Ж). Красной стрелкой сверху обозначено положение продукта терминиции ОТ, соответствующего нуклеотиду Cm4506 28S рРНК. Продукт терминиции ОТ длиной 127 н. соответствует m³U4500 28S рРНК

или D(D')-боксов: РНК5мС, РНК5D/Н и РНК5мD. Все перечисленные аналоги имели одинаковую последовательность области узнавания, направленную на U4502 28S рРНК (рис. 5, таблица). В РНК5мС последовательности С- (AUGAUGU) и С'- (GUGAUGA) боксов были заменены на (ACAGCAC) и (GCAGCAG) соответственно. В структуре РНК5D/Н только D-боксов заменен на (AGUC), тогда как в РНК5мD обе последовательности D- и D'-боксов (CUGA) заменены на (AAAA).

Установлено, что замены в структурах D- и С-боксов существенно снижают эффективность действия аналогов С/Д-боксов-РНК. Так, при замене

одного D-боксов в структуре РНК5 относительный выход продукта терминиции уменьшается приблизительно в 2 раза, а при одновременной замене обоих D- и D'-боксов либо обоих С- и С'-боксов – снижается до уровня в контрольных клетках (рис. 7Г–Ж, таблица). Полученные данные позволили заключить, что С- и D-боксы являются ключевыми элементами в структуре синтетических аналогов С/Д-боксов-РНК, влияющими на глубину 2'-О-метирирования нуклеотидов рРНК при трансфекции их в клетки человека. Для влияния на модификацию рРНК достаточно одной пары С/Д-боксов в структуре синтетической РНК. Удаление функциональных элементов – С-

Выход продукта терминации ОТ, соответствующего нуклеотиду Cm4506 28S рРНК клеток MCF-7, трансфицированных аналогами С/D-боксов-РНК

Аналог С/D-боксов-РНК	Изменения в структуре С/D-боксов-РНК относительно аналога РНК5	Выход продукта терминации ОТ, соответствующего Cm4506 28S рРНК**	Относительный выход продукта терминации***, %
РНК5	–	1100 ± 154	100
РНК3	Сдвиг области узнавания на 3 нуклеотида к 5'-концу рРНК	6500 ± 780	590
РНК5mC	Бокс С (AUGAUGU) → (ACAGCAC); бокс С' (GUGAUGA) → (GCAGCAG)	170 ± 25	15
РНК5D/N	Бокс D (CUGA) → (AGUC)	570 ± 86	50
РНК5mD	Боксы D и D' (CUGA) → (AAAA)	150 ± 25	13
Контроль*	–	150 ± 25	13

*Контрольные клетки MCF-7 инкубировали в среде с липофектаминам без РНК.

**Представлены средние значения площадей пиков (± SD).

***Приведены значения относительного выхода продукта терминации ОТ, соответствующего Cm4506 28S рРНК, по сравнению с его выходом при ОТ 28S рРНК клеток MCF-7, трансфицированных РНК5.

и D-боксов – отменяет действие аналогов мРНК на структуру рРНК в трансфицированных клетках (рис. 7, таблица).

Полученные данные позволяют заключить, что аналоги С/D-боксов-РНК, проникая в клетки человека, влияют на посттранскрипционный процессинг рибосомных РНК. Хотя трансфекция аналогов С/D-боксов-РНК в клетки MCF-7 не вызывала *de novo* 2'-О-метилирования заранее заданных нуклеотидов-мишеней рРНК, под действием синтетических аналогов происходило увеличение глубины природного 2'-О-метилирования нуклеотидов 28S рРНК.

Недавно показали, что в ряде линий опухолевых клеток повышение уровня отдельных С/D-боксов-РНК сопровождается увеличением содержания фибрилларина – ключевого компонента ядрышкового метилтрансферазного комплекса [12]. Кроме того, профиль 2'-О-метилирования рРНК может различаться в раковых клетках различного происхождения [14]. В связи с этим предполагают, что регуляция созревания рибосомных РНК может влиять на онкотрансформацию клеток и контролировать жизненный цикл раковых клеток [30, 31]. Поэтому наблюдаемый нами эффект синтетических РНК на 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК клеток человека указывает на перспективность разработки систем регуляции посттранскрипционного созревания рРНК, которые могут заложить основу для создания новых терапевтических подходов. Предложенный метод анализа 2'-О-метилированных нуклеотидов в составе РНК может использоваться как для выявления модификаций РНК, возникающих в результате направленного искусственного воздействия, так и для поиска

диагностически значимых различий в профиле модификаций РНК в клетках человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлена адаптация метода терминации обратной транскрипции для выявления положений 2'-О-метилованных нуклеотидов в РНК и анализа 5'-флуоресцентно меченных кДНК-продуктов капиллярным гель-электрофорезом на автоматическом геномном анализаторе. С помощью предложенного подхода проанализировано влияние синтетических аналогов малых ядрышковых С/D-боксов-РНК на профиль 2'-О-метилирования 28S рРНК человека в клетках линии MCF-7. Показано, что трансфекция клеток синтетическими аналогами С/D-боксов-РНК приводит к усилению терминации ОТ на известных сайтах 2'-О-метилирования рРНК, что указывает на существенное повышение глубины модификации отдельных нуклеотидов рРНК-мишеней. При этом ключевую роль в действии синтетических РНК играют консервативные структурные элементы мРНК – С- и D-боксы.

В настоящее время полагают, что посттранскрипционные модификации разных нуклеотидов рРНК являются независимыми процессами. Так, направленное введение дополнительных 2'-О-метилованных нуклеотидов в состав рРНК не влияет на выход модификации других нуклеотидов [28, 32]. Наши данные показывают, что С/D-боксов-РНК, которая содержит область узнавания, направленную в заранее заданный нуклеотид, и при этом не индуцирует 2'-О-метилирование нуклеотида-мишени, может повлиять на глубину модификации дру-

гих нуклеотидов рРНК. Возможно, что наблюдаемый нами эффект отражает функционирование нового природного механизма взаимосвязанной регуляции посттранскрипционных модификаций нуклеотидов рРНК. Реализация такого механизма может влиять на глубину 2'-О-метилирования одних нуклеотидов при нарушении модификации других нуклеотидов,

сближенных в пространственной структуре ядрышкового предшественника рРНК. ●

*Работа поддержана РФФИ
(гранты № 13-04-01058 и 14-04-31468)
и Междисциплинарным интеграционным
проектом СО РАН № 84 (2012–2014 гг.).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lapeyre B. // *Top. Curr. Genet.* 2005. V. 12. P. 85–91.
2. Baxter-Roshek J.L., Petrov A.N., Dinman J.D. // *PLoS One.* 2007. V. 2. № 1. e174.
3. Piekna-Przybylska D., Decatur W.A., Fournier M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. D178–183.
4. Decatur W.A., Fournier M.J. // *Trends Biochem. Sci.* 2002. V. 27. № 7. P. 344–351.
5. Liang X.H., Liu Q., Fournier M.J. // *Mol. Cell.* 2007. V. 28. № 6. P. 965–977.
6. Esguerra J., Warringer J., Blomberg A. // *RNA.* 2008. V. 14. № 4. P. 649–656.
7. Liang X.H., Liu Q., Fournier M.J. // *RNA.* 2009. V. 15. № 9. P. 1716–1728.
8. Song X., Nazar R.N. // *FEBS Lett.* 2002. V. 523. № 1–3. P. 182–186.
9. Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Bachellerie J.P., Caizergues-Ferrer M., Kiss T. // *Cell.* 1996. V. 85. № 7. P. 1077–1088.
10. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. // *Молекуляр. биология.* 2007. Т. 41. № 2. С. 246–259.
11. Reichow S.L., Hamma T., Ferre'-D'Amare' A.R., Varani G. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 5. P. 1452–1464.
12. Su H., Xu T., Ganapathy S., Shadfai M., Long M., Huang T.H., Thompson I., Yuan Z.M. // *Oncogene.* 2014. V. 33. № 11. P. 1348–1358.
13. Marcel V., Ghayad S.E., Belin S., Therizols G., Morel A.-P., et al. // *Cell.* 2013. V. 24. № 3. P. 318–330.
14. Belin S., Beghin A., Solano-Gonzalez E., Bezin L., Brunet-Manquat S., et al. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 9. e7147.
15. Teittinen K.J., Laiho A., Uusimaki A., Pursiheimo J.P., Gyenesi A., Lohi O. // *Cell. Oncol. (Dordr).* 2013. V. 36. № 1. P. 55–63.
16. Montanaro L., Trere D., Derenzini M. // *Am. J. Pathol.* 2008. V. 173. № 2. P. 301–310.
17. Freed E.F., Bleichert F., Dutca L.M., Baserga S.J. // *Mol. Biosyst.* 2010. V. 6. № 3. P. 481–493.
18. Степанов Г.А., Семенов Д.В., Кулигина Е.В., Коваль О.А., Рабинов И.В., Кит Ю.Я., Рихтер В.А. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 4. № 1 (12). С. 34–43.
19. Stepanov G.A., Semenov D.V., Savelyeva A.V., Koval O.A., Kuligina E.V., Rabinov I.V., Richter V.A. // *Biomed. Res. Int.* 2013. ID:656158.
20. Maden B.E., Corbett M.E., Heeney P.A., Pugh K., Ajuh P.M. // *Biochimie.* 1995. V. 77. № 1–2. P. 22–29.
21. Maden B.E. // *Methods.* 2001. V. 25. № 3. P. 374–382.
22. Cavaille J., Nicoloso M., Bachellerie J.P. // *Nature.* 1996. V. 383. № 6602. P. 732–735.
23. Liu B., Fournier M.J. // *RNA.* 2004. V. 10. № 7. P. 1130–1141.
24. Graifer D., Molotkov M., Styazhkina V., Demeshkina N., Bulygin K., Eremina A., Ivanov A., Laletina E., Venyaminova A., Karpova G. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 11. P. 3282–3293.
25. Bulygin K., Malygin A., Hountondji C., Graifer D., Karpova G. // *Biochimie.* 2013. V. 95. № 2. P. 195–203.
26. Lestrade L., Weber M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. D158–162.
27. Liu B., Ni J., Fournier M.J. // *Methods.* 2001. V. 23. № 3. P. 276–286.
28. Liu B., Liang X.H., Piekna-Przybylska D., Liu Q., Fournier M.J. // *RNA Biol.* 2008. V. 5. № 4. P. 249–254.
29. Rodriguez-Galan O., Garcia-Gomez J.J., de la Cruz J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1829. № 8. P. 775–790.
30. Williams G.T., Farzaneh F. // *Nat. Rev. Cancer.* 2012. V. 12. № 2. P. 84–88.
31. Mannoor K., Liao J., Jiang F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1826. № 1. P. 121–128.
32. Qu G., van Nues R.W., Watkins N.J., Maxwell E.S. // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. № 2. P. 365–374.

УДК 612.017.1:612.112.31

Направленная элиминация миелин-реактивных В-клеток с применением иммунотоксинов – лигандов антигенных рецепторов

А. В. Степанов^{1,2*}, А. А. Белогуров^{1,2,3}, Р. Kothapalli⁴, О. Г. Шамборант¹, В. Д. Кнорре¹, Г. Б. Телегин¹, А. А. Овсепян¹, Н. А. Пономаренко¹, С. М. Деев¹, S. V. Kaveri⁴, А. Г. Габибов^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

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

³Институт биологии гена РАН, 119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, 34/5

⁴Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, UMR S 1138, F-75006 Paris, France

*E-mail: stepanov.aleksei.v@gmail.com

Поступила в редакцию 05.05.2015

РЕФЕРАТ В-клетки играют важную роль в развитии и патогенезе как системных, так и орган-специфических аутоиммунных заболеваний. Аутореактивные В-клетки не только продуцируют аутоантитела, но также секретируют провоспалительные цитокины и эффективно презентуют специфические аутоантигены Т-клеткам. Существующая на сегодняшний день терапия аутоиммунных заболеваний путем элиминирования большинства аутореактивных В-клеток моноклональным анти-CD19/20-антителом Ритуксимаб (Rituximab) приводит к системным побочным проявлениям и требует значительного пересмотра. Терапия, направленная на селективную элиминацию патологических аутореактивных В-клеток, потенциально может стать универсальным подходом к лечению целого ряда аутоиммунных заболеваний. В данной работе нами создан рекомбинантный иммунотоксин на основе константного фрагмента антитела, слитого с иммунодоминантным эпитопом основного белка миелина. На животной модели рассеянного склероза – мышах линии SJL/J с индуцированным экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЕАЕ), показано, что созданный рекомбинантный иммунотоксин способен направленно элиминировать популяцию патологических лимфоцитов *in vivo*. Предложенная концепция может лечь в основу дальнейшего развития препаратов для специфической терапии рассеянного склероза и ряда других аутоиммунных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аутоантигены, В-лимфоциты, иммуноглобулины, иммунотоксины, рассеянный склероз. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЕАЕ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; ИФА – иммуноферментный анализ; МВР – основной белок миелина; ПАФ – полный адъювант Фрейнда; РС – рассеянный склероз.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – это хроническое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы аутоиммунной природы, при котором основными аутоантигенами являются белки миелиновой оболочки нервных волокон [1]. В Российской Федерации насчитывается более 200000 человек, больных рассеянным склерозом [2]. Несмотря на успехи в терапии РС, достигнутые в последние годы, существующие методики не позволя-

ют добиться полного выздоровления пациента [3]. Современные подходы к терапии РС, включающие введение рекомбинантных антител и других низкомолекулярных агентов, специфически действующих на компоненты иммунной системы, крайне затратны для бюджетов развитых стран, а с учетом необходимости длительного лечения ставят под угрозу всю систему реабилитации. Более того, уровни инвалидизации пациентов не дают основания для позитивного прогноза в социальной сфере.

Важно отметить, что на сегодняшний день методики, применяемые при РС, включают в себя в основном иммуносупрессирующие препараты ненаправленного действия, часто вызывающие системные осложнения [4].

Основную роль в патогенезе РС долгое время отводили CD4⁺Т-клеткам, однако на настоящий момент очевидно, что В-клеточный ответ несомненно играет не менее важную роль в развитии данного заболевания. Аутореактивные В-клетки не только вырабатывают аутоантитела, но также способны эффективно функционировать в качестве антиген-презентирующих клеток, активируя Т-клетки [5]. Кроме того, В-клетки могут секретировать провоспалительные цитокины и усиливать патологические процессы саморазрушения [6]. Терапия, направленная на определенную популяцию лимфоцитов, в перспективе является универсальным средством при целом ряде В-клеточных заболеваний. На сегодняшний день элиминацию аутореактивных В-клеток осуществляют с помощью введения моноклонального анти-CD19/20-антитела Ритуксимаб (Rituximab, Rituxan, MabThera), которое активно используется в терапии лимфом и аутоиммунных заболеваний [7–12]. Клиническое применение данного препарата в значительной степени ограничено и осуществляется в исключительных случаях, так как приводит к элиминации большинства В-лимфоцитов организма и, как следствие, широкому спектру побочных эффектов [13]. В этой связи проблема создания препаратов специфической терапии рассеянного склероза и других аутоиммунных заболеваний остается крайне актуальной.

Основной подход к терапии рассеянного склероза заключается в подкожном введении иммуномодулирующего препарата глатирамера ацетата (GA, glatiramer acetate). GA – это полипептид длиной 40–100 аминокислотных остатков, включающий случайную комбинацию аланина, лизина, глутамата и тирозина в соотношении 4.5 : 3.6 : 1.5 : 1 соответственно. Структурно GA имитирует один из основных аутоантигенов при РС, сильно положительно заряженный основной белок миелина (myelin basic protein, MBP). Действие GA предположительно состоит в конкуренции с фрагментами основного белка миелина за связывание с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II DR, а также в индукции регуляторных Т-клеток (тип Тх2/3), секретирующих противовоспалительные цитокины ИЛ-4, ИЛ-10 и нейротрофический фактор головного мозга [14]. Следует отметить, что степень эффективности терапии GA сильно варьирует, вплоть до полной резистентности пациентов к используемому препарату [14].

В данной работе нами предложен и успешно реализован подход к созданию рекомбинантных полипептидов, способных осуществлять специфическую элиминацию патологических лимфоцитов *in vivo*. В качестве мишени адресной доставки цитотоксических агентов нами был выбран поверхностный иммуноглобулин аутореактивных В-лимфоцитов (В-клеточный рецептор, BCR) – уникальный рецептор, отличающий определенную клонально-гомогенную популяцию В-клеток от всех других клеток организма. В ряде научных работ уже была доказана высокая эффективность направленной элиминации лимфоцитов с помощью BCR-специфичных иммунотоксинов *in vitro* [15, 16]. Ранее уже было показано, что в сыворотке больных РС обнаруживается высокий титр аутоантител [17–19], специфичных к MBP. Одна из наиболее признанных животных моделей рассеянного склероза – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ), индуцированный у мышей линии SJL/J [20, 21]. При развитии ЕАЕ у мышей SJL/J также формируются аутоантитела, специфичные к MBP. С помощью созданной нами ранее библиотеки рекомбинантных эпитопов MBP методом иммуноферментного анализа (ИФА) проведен сравнительный анализ специфичности сывороточных аутоантител, полученных от пациентов с РС и различных животных с ЕАЕ к различным эпитопам аутоантигена [22]. Основываясь на полученных данных, в качестве высокоспецифичного лиганда поверхностных BCR аутореактивных В-клеток выбрали иммунодоминантный фрагмент [QDENPVVHFFKNIIVTPRTPPPSQ] MBP⁸²⁻¹⁰⁵. Далее нами был создан химерный белок, состоящий из последовательности MBP⁸²⁻¹⁰⁵, слитой с константным фрагментом антитела, который обладает хорошими фармакодинамическими показателями и, вместе с тем, способен эффективно запускать механизмы антитело-зависимой цитотоксичности. В настоящей работе изучен терапевтический потенциал созданного белка-киллера в терминах селективной элиминации аутореактивных MBP-специфичных В-клеток *in vivo* у мышей линии SJL/J с индуцированным ЕАЕ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание генетической конструкции, кодирующей константный фрагмент иммуноглобулина, слитого с MBP⁸²⁻¹⁰⁵

Нуклеотидная последовательность, кодирующая фрагмент MBP⁸²⁻¹⁰⁵, получена путем ПЦР-амплификации с взаимно перекрывающимися внешними и внутренними праймерами 5'-ATTAGGTACCCAAGATGAAAAC-

СССГТАГТССАСТТСТТСААГА-3',
5' -CGTAGTССАСТТСТТСААГАА-
САТТГТГАСГССТСГСАСАСС-3' и 5'-ТААТ-
ГТСГАСТССТСГСАСГГГГТГГТГТГС-
ГАГГСГТСАСА-3'. ПЦР-продукт был обработан
эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BglII, а затем
лигирован с обработанным аналогичным образом
вектором pFUSE.

Получение клонов-продуцентов рекомбинантных молекул

Для получения стабильной линии клеток CHO, продуцирующей рекомбинантные молекулы MBP₈₂₋₁₀₅-Fc (pFUSE-MBP₈₂₋₁₀₅-Fc) и Fc (pFUSE-Fc), клетки линии CHO трансфицировали методом липофекции соответствующими генетическими конструкциями. Для этого за день до трансфекции клетки CHO рассеивали в лунки 6-луночного планшета (Nunc) в концентрации 0.5 млн/мл. При достижении 80% конfluenceности клетки трансфицировали методом липофекции с помощью набора Lipofectamine LTX (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя. Спустя 72 ч к клеткам добавляли среду с селективным антибиотиком зеоцином. Устойчивые к антибиотику клетки переносили в 96-луночные плашки (Corning). Полученные клоны тестировали на наличие продукции рекомбинантных молекул методом ИФА с помощью моноклональных анти-Fc-антител.

Выделение молекул Fc, MBP₈₂₋₁₀₅-Fc

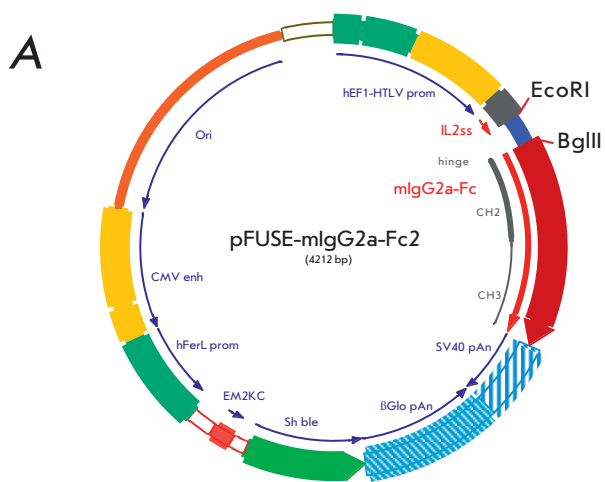
Выделение белков-киллеров, содержащих Fc-фрагмент антитела класса IgG2a, проводили по следующей схеме. Первоначально отбирали супернатант клеток CHO, трансфицированных плазмидами, содержащими нуклеотидные последовательности, кодирующие константный фрагмент антитела, соединенный с последовательностью пептида. Отобранную фракцию центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об/мин. Супернатант отбирали и наносили на колонку для аффинной хроматографии с иммобилизованным белком G (HiTrap Protein-G Sepharose (Amersham, США)) в буфере PBS со скоростью 0.5 мл/мин. Затем колонку промывали 80–100 объемами PBS на скорости 2.5 мл/мин для отделения неспецифически сорбированных белков. Фракцию элюировали с колонки 100 мМ раствором глицин-HCl pH 2.5 и незамедлительно нейтрализовали 2 М раствором трис-основания до pH 7.3–7.7. Все хроматографические стадии выделения проводили на системе DuoFlow BioRad. Идентификацию препаратов Fc и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc, а также оценку их чистоты проводили с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием серебром и иммуноферментным анализом.

Индукция и терапия ЕАЕ у мышей линии SJL

Эксперименты проводили в научно-производственном подразделении филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова – питомнике лабораторных животных «Пушино» (Россия, Пушино) и научном центре Centre de Recherche des Cordeliers de Jussieu (CRC) (Франция, Париж) с соблюдением всех регламентированных этических норм. ЕАЕ индуцировали у самок мышей линии SJL в возрасте от 6 до 8 недель со статусом SPF (specified pathogen free) в соответствии с протоколом [23] путем двукратного введения 100 мкг гомогената спинного мозга мыши (ГСММ) в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ), содержащем туберкулин в концентрации 4 мг/мл. В 1-й день ГСММ вводили подкожно в две точки вдоль позвоночного столба, а на 3-й день в подошвы задних лап. Дополнительно в день инъекций ГСММ в ПАФ мышам вводили внутривенно раствор коклюшного токсина (Pertussis toxin, Calbiochem, США) в количестве 500 нг/мышь. Мышей с индуцированным ЕАЕ разделили на четыре группы по 10 животных в каждой: без инъекций (группа без терапии); животным однократно вводили 200 мкг GA (Teva); животным в группах Fc и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc на 5 и 10 день с момента индукции ЕАЕ внутривенно вводили 50 мкг препарата. Тяжесть развития аутоиммунной патологии оценивали ежедневно в соответствии со следующей шкалой: 0 – норма, 1 – потеря тонуса хвоста, 2 – слабость задних ног или их паралич, 3 – сильный паралич конечностей, 4 – полный паралич (неспособность двигаться), 5 – смерть.

Проточная цитофлуориметрия

У мышей SJL/J из каждой экспериментальной группы выделяли селезенку. Далее селезенку переносили в чашки Петри и гомогенизировали для получения суспензии спленоцитов. Изолированные спленоциты ресуспендировали в среде DMEM, 1 млн клеток центрифугировали в течение 10 мин при 400 g, осадок дважды отмывали PBS. К клеткам добавляли раствор биотинилированных пептидов MBP (7-TQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPS или 12-DAQG-TLSKIFKLGGGRDSRSGSPMARR) в фосфатном буфере, содержащем 1% БСА. Клетки инкубировали в течение 40 мин при +4°C, центрифугировали (10 мин, 400 g) и ресуспендировали в физиологическом буфере. К клеточной суспензии добавляли анти-B220-APC-антитела (eBioscience, США) и конъюгат Streptavidin-Pacific Blue™, инкубировали (40 мин при +4°C), центрифугировали (10 мин, 400 g), ресуспендировали в буфере FACS (0.1% БСА, 0.02% азида натрия, 50 мкг/мл йодида пропидия в фосфатном буфере) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSdiva (Becton Dickinson, США).



Б
QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG - MBP₈₂₋₁₀₅

ASQKRPSQRHSGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTG
 ILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHNPARTAHYGS
 L POKSHGRT **QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG** KGRG
 LLSLSRFSWGAEGQRPFGFYGGRASDYKSAHKGFKGV
 DAQGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR

Рис. 1. Карта плазмидного вектора pFUSE, содержащего ген константного фрагмента иммуноглобулина мыши (А). Последовательность полноразмерного MBP и фрагмента MBP₈₂₋₁₀₅ (выделен жирным), интегрированного в вектор pFUSE (Б)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание генетической конструкции, кодирующей константный фрагмент иммуноглобулина, слитого с пептидом MBP

Для создания цитотоксических белков высокой избирательности, способных направленно удалять популяцию аутореактивных В-клеток с заранее известной специфичностью, нами была получена генетическая конструкция, кодирующая константный фрагмент (Fc) антитела мыши, слитый с фрагментом MBP₈₂₋₁₀₅. С этой целью использовали коммерчески доступный плазмидный вектор pFUSE, содержащий ген константного фрагмента иммуноглобулина мыши класса IgG2a (Invivogen) (рис. 1). Нуклеотидная последовательность, кодирующая фрагмент MBP₈₂₋₁₀₅ (QDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG), была амплифицирована методом ПЦР с взаимно перекрывающимися праймерами. Полученные фрагменты ДНК встроили в плазмидный вектор pFUSE-mIgG2a по сайтам эндонуклеаз рестрикции EcoRI и BglII.

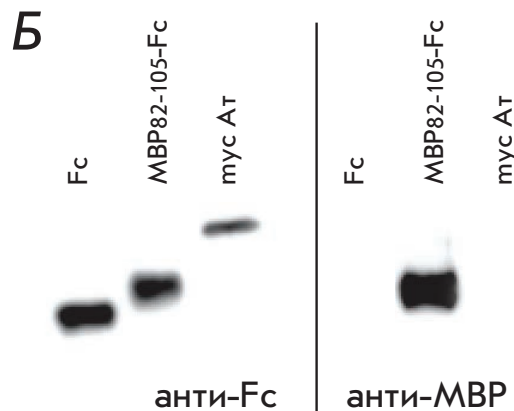
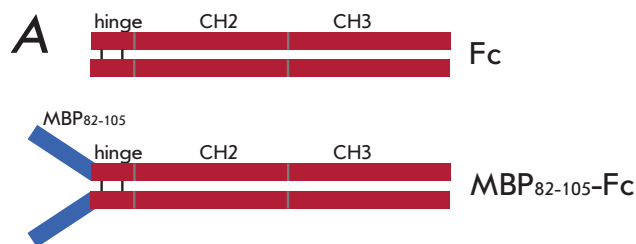


Рис. 2. Схематическое изображение строения рекомбинантных слитых белков Fc и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc (А). Гибридизация Fc и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc с анти-Fc- и анти-MBP-антителами (Б)

Для получения стабильной линии клеток CHO, продуцирующей рекомбинантные белки MBP₈₂₋₁₀₅-Fc (pFUSE-MBP₈₂₋₁₀₅-Fc) и Fc (pFUSE-Fc), клетки линии CHO трансфицировали методом липофекции соответствующими генетическими конструкциями. Трансфицированные клетки отбирали на среде с антибиотиком зеоцином. Устойчивые к антибиотику клетки клонировали. Полученные клоны тестировали на наличие продукции рекомбинантных белков методом ИФА. Отобранные клоны-продуценты использовали для препаративной продукции белка в 125 см² флаконах в течение 9 дней. Fc-содержащие белки последовательно очищали из ростовой среды с помощью аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованным G-белком и на гель-фильтрационной колонке Superdex 200. Согласно электрофоретическому анализу, гомогенность препаратов составила более 95%. Наличие фрагмента MBP в выделенных рекомбинантных белках оценивали методом блоттинга по Вестерну с использованием анти-MBP (рис. 2Б) и анти-Fc (рис. 2Б) антител. Гибридизация с анти-MBP-антителами подтвердила, что слитый белок MBP₈₂₋₁₀₅-Fc содержит иммунодоминантный участок MBP, в то время как в составе контрольного Fc его фрагменты отсутствуют.

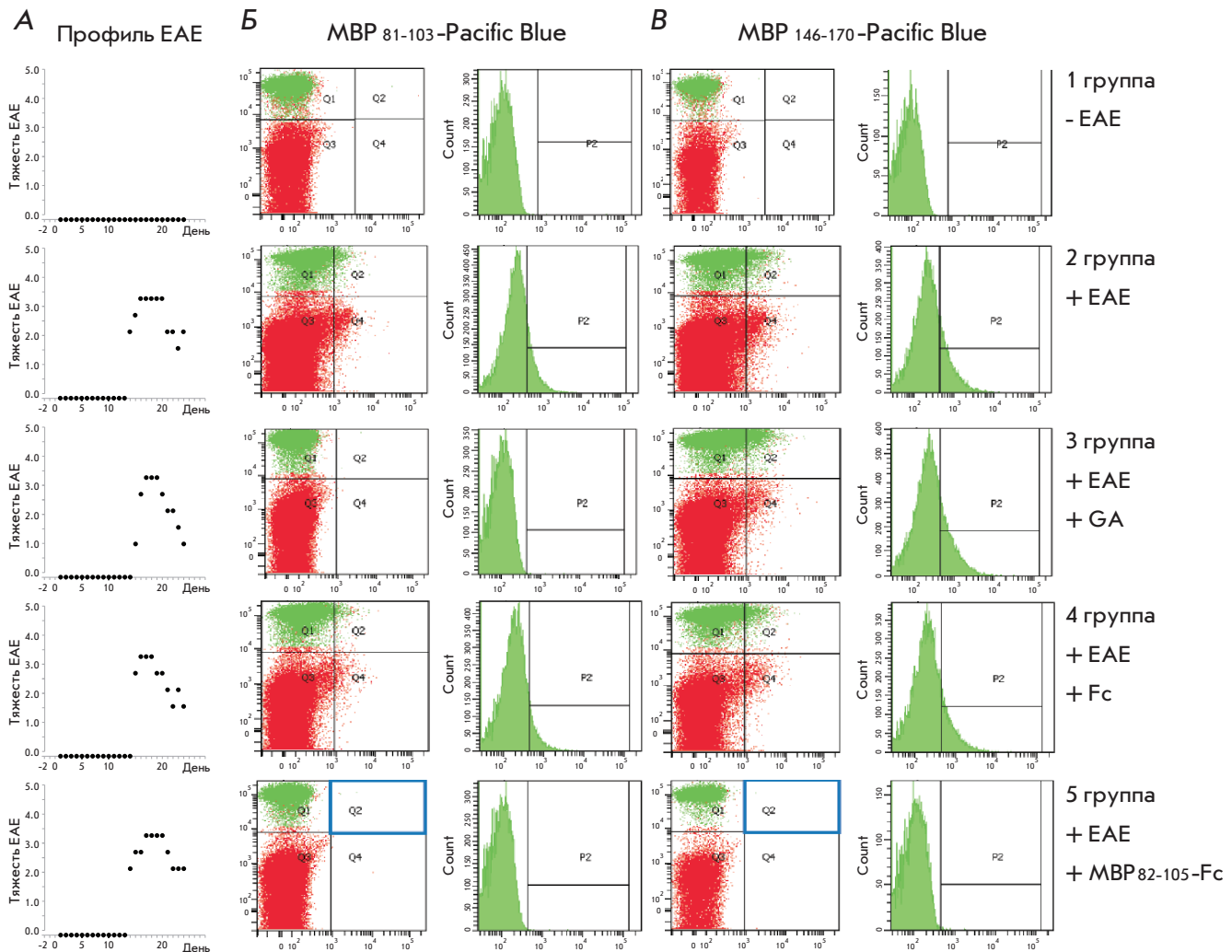


Рис. 3. Степень развития ЕАЕ у мышей линии SJL, отобранных из каждой экспериментальной группы (А). Репрезентативный анализ изолированных спленоцитов на наличие В-клеток, специфичных к фрагментам MBP₈₁₋₁₀₃ (Б) и MBP₁₄₆₋₁₇₀ (В), методом проточной цитофлуориметрии

Элиминация аутореактивных В-клеток у мышей SJL с индуцированным ЕАЕ

Для формирования популяции аутореактивных В-клеток, специфичных к MBP, у мышей линии SJL индуцировали экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит. С этой целью животным делали две подкожные инъекции гомогената спинного мозга мыши в эмульсии полного адъюванта Фрейнда. Дополнительно для усиления развития ЕАЕ в те же дни животным внутривенно вводили раствор коклюшного токсина (Pertussis toxin). В качестве отрицательного контроля использовали группу (1), в которую входили неиммунизированные интактные мыши. Далее мышей с индуцированным ЕАЕ разделили на четыре экспериментальные группы по 10 животных в каждой: (2) без терапии; (3) животным

однократно вводили 200 мкг GA (Teva) (группа GA); животным в каждой группе дважды внутривенно вводили Fc (4) и MBP₈₂₋₁₀₅-Fc (5) (таблица).

На 7 день с начала индукции ЕАЕ и до окончания эксперимента во всех группах оценивали развитие симптомов ЕАЕ по пятибалльной шкале.

На 14–15 день после индукции у мышей во всех группах начинали развиваться симптомы ЕАЕ, на 17–19 дни заболевание достигало пика. На 23 день из каждой экспериментальной группы были отобраны мыши SJL с одинаковой клинической картиной ЕАЕ (рис. 3А). В культурах спленоцитов, полученных из этих мышей, выявляли В-клетки, специфичные к иммунодоминантному и С-концевому фрагментам MBP. Для этого клетки инкубировали с пептидами MBP₈₁₋₁₀₃ и MBP₁₄₆₋₁₇₀, конъюгированными с био-

Экспериментальные группы

Группа	Число мышей	ЕАЕ	Инъекции	Количество инъекций	День инъекции	Доза, мкг/мышь
1	5	-	-	-	-	-
2	10	+	-	-	-	-
3	10	+	GA	1	1	200
4	10	+	Fc	2	5 и 10	50
5	10	+	MBP ₈₂₋₁₀₅ -Fc	2	5 и 10	50

тином. Для визуализации В-клеток использовали конъюгат анти-B220-антител с флуорофором APC (eBioscience), в свою очередь, биотинилированные пептиды MBP, связанные с поверхностным BCR, детектировали, добавляя конъюгат стрептавидина с флуорофором Pacific Blue™ (eBioscience). Образцы анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSDiva (BD), результаты представлены на (рис. 3Б,В).

Как видно из рис. 3Б,В у мыши из группы «контроль» отсутствовала популяция В-клеток, специфичных к MBP, в то время как в культуре спленоцитов, полученной от животного из группы «без терапии», выявлена значимая популяция В-клеток, специфичных к обоим пептидам MBP. Как и ожидалось, внутривенные инъекции контрольного Fc, не содержащего пептиды MBP, не привели к какому-либо изменению популяции MBP-реактивных В-клеток. При однократном введении препарата GA в культуре клеток исчезала популяция, специфичная к MBP₈₁₋₁₀₃, но оставалась популяция В-клеток, содержащих на поверхности BCR, специфичный к С-концевому фрагменту MBP₁₄₆₋₁₇₀. Данное наблюдение в очередной раз подтверждает, что терапевтическое действие GA направлено на популяцию В-клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу MBP₈₁₋₁₀₃ [24]. Введение слитого белка MBP₈₁₋₁₀₃-Fc привело к полной элиминации В-клеток, специфичных не только к фрагменту MBP₈₁₋₁₀₃, входящего в состав вводимого иммунотоксина, но и к фрагменту MBP₁₄₆₋₁₇₀. Таким образом, профиль популяции В-клеток, специфичных к MBP,

в культуре спленоцитов мыши, подвергнутой терапии белком MBP₈₁₋₁₀₃-Fc, совпал с профилем здорового животного. Полученные результаты позволяют утверждать, что иммунотоксин MBP₈₁₋₁₀₃-Fc наряду с селективной элиминацией В-клеток, специфичных к иммунодоминантному фрагменту MBP₈₁₋₁₀₃, подавляет также формирование В-клеток, специфичных к фрагменту MBP₁₄₆₋₁₇₀.

ВЫВОДЫ

В последнее десятилетие при создании препаратов для лечения больных рассеянным склерозом и другими аутоиммунными заболеваниями все большее место отводится антиген-специфичной терапии. На животной модели нами протестирован один из наиболее актуальных на сегодняшний день подходов к терапии рассеянного склероза – селективная элиминация аутореактивных В-клеток. На основе константного фрагмента иммуноглобулина, слитого с иммунодоминантной последовательностью MBP, получен высоко-селективный белок-киллер В-клеток. Введение данного рекомбинантного иммунотоксина мышам линии SJL/J с индуцированным ЕАЕ приводило к полному подавлению популяции В-клеток, специфичных к фрагментам MBP. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что предложенная концепция может быть успешно реализована при создании препаратов направленной терапии рассеянного склероза и других аутоиммунных заболеваний. ●

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (проект № RFMEFI60714X0061).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nylander A., Hafler D.A. // J. Clin. Invest. 2012. V. 122. P. 1180–1188.
 2. Kingwell E., Marriott J.J., Jette N., Pringsheim T., Makhani N., Morrow S.A., Fisk J.D., Evans C., Beland S.G., Kulaga S. // BMC Neurol. 2013. V. 13. P. 128.

3. Ransohoff R.M., Hafler D.A., Lucchinetti C.F. // Nat. Rev. Neurol. 2015. V. 11. P. 134–142.
 4. Sorensen P.S. // Curr. Opin. Neurol. 2014. V. 27. P. 246–259.
 5. Krumbholz M., Derfuss T., Hohlfeld R., Meinl E. // Nat. Rev. Neurol. 2012. V. 8. P. 613–623.
 6. Marino E., Grey S.T. // Autoimmunity. 2012. V. 45. P. 377–387.

7. Arkfeld D.G. // *Rheumatol. Int.* 2008. V. 28. P. 205–215.
8. Wang M., Fowler N., Wagner-Bartak N., Feng L., Romaguera J., Neelapu S.S., Hagemester F., Fanale M., Oki Y., Pro B. // *Leukemia*. 2013. V. 27. P. 1902–1909.
9. Ransohoff R.M., Zamvil S.S. // *Neurotherapeutics*. 2007. V. 4. P. 569–570.
10. Cross A.H., Stark J.L., Lauber J., Ramsbottom M.J., Lyons J.A. // *J. Neuroimmunol.* 2006. V. 180. P. 63–70.
11. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
12. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Кирпичников М.П. // *Успехи химии*. 2015. Т. 84. № 1. С. 1–26.
13. Castillo-Trivino T., Braithwaite D., Bacchetti P., Waubant E. // *PLoS One*. 2013. V. 8. e66308.
14. Sela M., Mozes E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 14586–14592.
15. Stepanov A.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 6. e20991.
16. Zocher M., Baeuerle P.A., Dreier T., Iglesias A. // *Int. Immunol.* 2003. V. 15. № 7. P. 789–796.
17. Johnson A.B., Dal Canto M.C. // *Nature*. 1976. V. 264. P. 453–454.
18. Abramsky O., Lisak R.P., Silberberg D.H., Pleasure D.E. // *New Engl. J. Med.* 1978. V. 298. P. 743.
19. Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A. Jr., Kurkova I.N., Petrenko A.G., Telegin G.B., Suchkov S.V., Kiselev S.L., Lagarkova M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 2. P. 281–286.
20. Miller S.D., Karpus W.J., Davidson T.S. // *Curr. Protoc. Immunol.* 2010. Ch. 15. V. 15. P. 11.
21. Stromnes I.M., Goverman J.M. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 1810–1819.
22. Belogurov A.A., Jr., Kurkova I.N., Friboulet A., Thomas D., Misikov V.K., Zakharova M.Y., Suchkov S.V., Kotov S.V., Alehin A.I., Avalue B., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 1258–1267.
23. Yasuda T., Tsumita T., Nagai Y., Mitsuzawa E., Ohtani S. // *Japan J. Exp. Med.* 1975. V. 45. P. 423–427.
24. Sela M., Teitelbaum D. // *Expert Opin. Pharmacother.* 2001. V. 2. P. 1149–1165.

УДК 577.112:577.215

Влияние различных частей эктодомена рецептора IRR на его рН-чувствительность (биоинформатический подход)

И. Е. Деев*, Н. В. Попова, А. Г. Петренко

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

*E-mail: deyevie@gmail.com

Поступила в редакцию 09.12.2014

РЕФЕРАТ Рецептор, подобный инсулиновому рецептору (IRR) принадлежит к суперсемейству рецепторных тирозинкиназ. IRR является близким структурным гомологом рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста, однако не связывается с их лигандами. IRR, как показано нами ранее, активируется при повышении рН внеклеточной жидкости (> 7.9) и регулирует экскрецию избыточной щелочи в организме. Проведен биоинформатический анализ рН-сенсорного потенциала всех трех членов семейства рецептора инсулина различных видов животных (от лягушки до человека), а также их химер с перестановкой отдельных доменов внеклеточной части. С использованием программы AcalPred показано, что семейство рецептора инсулина делится на белки, активность которых максимальна в кислой среде (все ортологи рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста, за исключением одного ортолога IGF-IR из *Xenopus laevis*) или в щелочной среде (все ортологи IRR). Предсказано также, что на рН-чувствительность рецептора IRR наиболее существенно будет влиять замена доменов L1 и C в его внеклеточной части, а также второго и третьего фибронектиновых повторов. Замена домена L2 будет, предположительно, наименее чувствительной для активации IRR при щелочных значениях рН. Для проверки предсказаний *in silico* получены три конструкции с заменой первых доменов L1C рецептора IRR, третьего домена L2 и всех трех доменов L1CL2 на аналогичные участки рецептора инсулиноподобного фактора роста. Установлено, что замена доменов L1C и трех доменов L1CL2 уменьшает способность рецептора к активации при щелочных рН, что приводит к увеличению полумаксимальной эффективной концентрации почти в 2 раза, а замена домена L2 увеличивает полумаксимальную эффективную концентрацию на 40%. Таким образом, наши данные свидетельствуют о высоком предсказательном потенциале алгоритма AcalPred не только для рН-чувствительных ферментов, но и для рН-регулируемых рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рецептор, фосфорилирование, щелочные значения рН.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство рецептора инсулина (IR) состоит из собственно IR, рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) и рецептора, подобного IR (insulin receptor-related receptor, IRR). Все три рецептора являются высокоомологичными рецепторными тирозинкиназами с одним трансмембранным сегментом, существующими в виде гомологичных димеров, соединенных цистиновыми мостиками [1, 2]. Этим члены семейства IR отличаются от других тирозинкиназных рецепторов, которые образуют нековалентные димеры только при активации. При созревании оба мономера подвергаются протеолизу в примембранной зоне внеклеточной части. В результате молекула

рецептора состоит из двух пар ковалентно связанных α - и β -субъединиц.

Во внеклеточной N-концевой части α -субъединицы у всех трех рецепторов находятся домены L1 и L2 (богатые лейцином), между которыми расположен домен C (фурин-подобный богатый цистеином). Далее следуют три фибронектиновых повтора FnIII-1, FnIII-2 и FnIII-3 [3]. Тирозинкиназный домен расположен в цитоплазматической части β -субъединицы. Степень гомологии между IGF-IR и IRR несколько выше, чем между IR и IRR [2], поэтому считается, что дупликация и разделение генов, кодирующих IGF-IR и IRR, произошли эволюционно позднее, чем отделение гена рецептора инсулина [2].

Поскольку рецепторы уже предимеризованы, связывание пептидного лиганда с внеклеточной частью IR или IGF-IR вызывает конформационные изменения, которые приводят к автофосфорилированию остатков тирозина, расположенных в цитоплазматическом тирозинкиназном домене. У IRR, в отличие от его гомологов, не найдено лигандов пептидно-белковой природы. В то же время нами установлено, что IRR активируется, когда pH внеклеточной жидкости превышает 7.9 [4, 5]. Эксперименты *in vivo* на мышах с нокаутом гена IRR показали, что этот рецептор вовлечен в регуляцию экскреции почками избыточной щелочи в виде бикарбоната [6, 7]. Картирование участков, определяющих pH-чувствительность IRR, показало, что за активацию рецептора отвечают несколько внеклеточных доменов [5, 8], и это обеспечивает положительную кооперативность активации (коэффициент Хилла около 2.4) [5, 9].

Очевидный фундаментальный интерес представляет вопрос, чем определяются столь разительные отличия функций рецепторов IR и IGF-IR, с одной стороны, и IRR, с другой. В представленной работе мы провели сравнительный анализ pH-чувствительности рецептора IRR и других рецепторов из семейства рецептора инсулина с использованием биоинформатического подхода. Применение программы AcalPred [10], разработанной для предсказания значений pH (кислых или щелочных), оптимальных для работы ферментов на основании их первичной структуры, позволило разделить семейство IR на два типа: «кислотно-зависимые» белки (практически все ортологи IR и IGF-IR) и «основно-зависимые» белки (все ортологи IRR). Этот подход позволил оценить относительный вклад отдельных доменов внеклеточной части IRR, а предсказанные свойства химер IRR и рецептора IGF-IR были проверены *in vitro* путем определения их pH-чувствительности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Последовательности рецепторов инсулинового семейства

Все последовательности эктодоменов рецепторов инсулинового семейства *Bos taurus* (BosTau), *Canis familiaris* (CanFam), *Cavia porcellus* (CavPor), *Coturnix japonica* (CotJap), *Danio rerio* (DanRer), *Equus caballus* (EquCab), *Felis catus* (FelCat), *Gallus gallus* (GalGal), *Gasterosteus aculeatus* (GasAcu), *Homo sapiens* (HomSap), *Macaca mulatta* (MacMul), *Microcebus murinus* (MicMur), *Monodelphis domestica* (MonDom), *Mus musculus* (MusMus), *Ochotonas princeps* (OchPri), *Oryctolagus cuniculus* (OryCun), *Pan troglodytes*

(PanTro), *Rattus norvegicus* (RatNor), *Scophthalmus maximus* (ScoMax), *Sus scrofa* (SusScr) и *Xenopus laevis* (XenLae) взяты из сопровождающего материала этой статьи [11]. Так как у *Danio rerio* гены рецепторов IR и IGF-IR дублированы, к ним добавлены обозначения a или b.

Получение химерных рецепторов

Последовательности, кодирующие химерные человеческие рецепторы, получали полимеразной цепной реакцией с использованием следующих праймеров: для L1C(IGF-IR) IRR-НА 5'-CATCCCTTGTGAAGGTCCTTGCCCTAAAGAGTGCAAGGTAGGC и 5'-cccGGtACcTGTCACCTCCTCCAGTCGGTA, затем 5'-gggGGTACCGAATTCATGAAGTCTGGCTCCGGAGGAG; для L2(IGF-IR) IRR-НА 5'-CACAAGTGCGAGGGGCTGTGCCCGAAGGTCTGTGAGGAAGAAA и 5'-cccGGTACCCGTCACCTCCTCCATGCGGTAА, затем 5'-gggGGTACCGAATTCATGGCAGTGCCTAGTCTGTGG. Правильность полученных конструкций проверяли секвенированием.

Трансфекция эукариотических клеток и активация рецептора

Клетки HEK293 растили на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, 1% пенициллина/стрептомицина и 2 мМ L-глутамин при стандартных условиях (37°C и 5% CO₂). Клетки трансфицировали плазмидами pCDNA3.1, кодирующими IRR-НА или химерные рецепторы. Для трансфекции использовали Унифектин-56 (UnifectGroup) согласно рекомендациям производителя. Через 28–40 ч после трансфекции клетки оставляли в бессывороточной ростовой среде на 2–3 ч при стандартных условиях. Далее для проверки активации рецепторов и получения кривых активации клетки HEK293, экспрессирующие рецепторы, после «голодания» в бессывороточной среде инкубировали в фосфатно-солевом буфере с 60 мМ Трис-НСl с требуемым значением pH в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем буфер отбирали и клетки незамедлительно лизировали в 1×буфере для электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS.

Вестерн-блотинг и построение кривых активации

Электрофорез в 8% ПААГ в присутствии SDS и последующий Вестерн-блот-анализ проводили по стандартному протоколу как описано в [12]. Общее количество рецепторов определяли с использованием кроличьей сыворотки к цитоплазматической части IRR (anti-IR/IRR), а для выявления фосфорилированной формы рецептора применяли кроличью сыворотку к фосфорилированному IRR (anti-pIR/IRR).

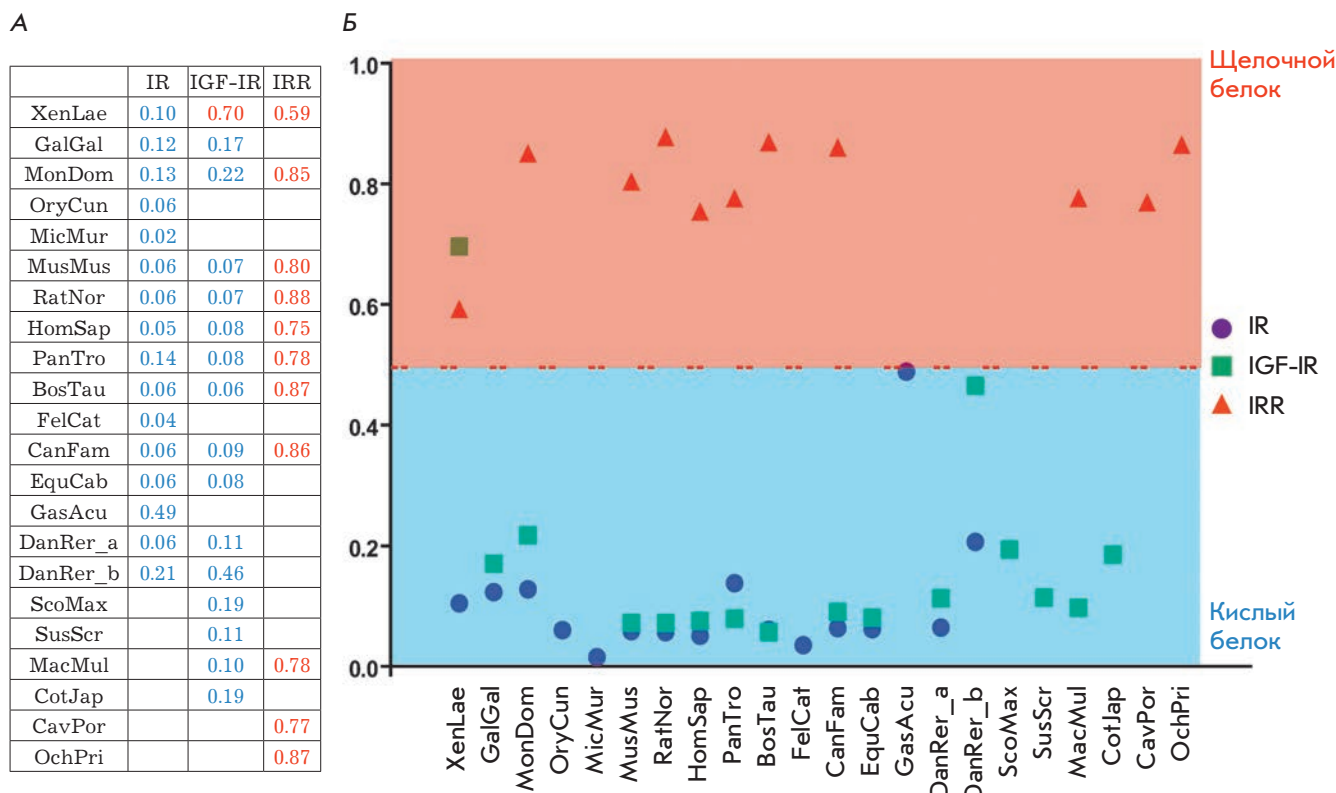


Рис. 1. А — результат анализа последовательностей эктодоменов рецепторов семейства рецептора инсулина с использованием программы AcalPred. В таблице приведены значения относительной вероятности активации при щелочном значении рН эктодоменов рецепторов этого семейства из различных видов животных. Полное название видов указано в «Экспериментальной части». Б — графическое представление описанных выше вероятностей. Красной линией выделена условная граница по значению предсказания – 0.5. Белки с предсказанной вероятностью «щелочной» чувствительности более 0.5 показаны как «щелочные» (находятся в красной зоне), а белки с вероятностью менее 0.5 – как «кислые» (находятся в синей зоне)

Антитела к IRR получены и охарактеризованы в нашей лаборатории [5]. В качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с HRP (Jackson ImmunoResearch). Полученные блоты сканировали, специфичные сигналы обрабатывали с помощью программы ImageJ. Сигнал от антител к фосфорилированному IRR нормировали по сигналу от антитела против С-концевой части рецептора IRR. Далее нормированные сигналы для каждого рН ($n \geq 3$) обрабатывали в программе GraphPad Prism 5 с использованием интерполяции уравнения Хилла (One site – Specific binding with Hill slope-анализ). В результате анализа интерполяции программа GraphPad Prism 5 рассчитывала значения для коэффициента Хилла и полумаксимальной эффективной концентрации гидроксильных ионов для кривой активации химерных белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рецепторная тирозинкиназа IRR обладает уникальной способностью активироваться при защелачивании внеклеточной среды. Это свойство разительно отличает IRR как от других членов семейства рецептора инсулина, так и от большинства тирозинкиназных рецепторов, которые активируются пептидами или белками. Мы задались вопросом о возможности предсказания этого необычного свойства рецептора IRR с помощью современных биоинформатических подходов. Недавно была описана программа AcalPred, первоначально предназначенная для предсказания значений рН, оптимальных для работы фермента (кислых или щелочных) по его последовательности. На данный момент эта программа доступна в сети Интернет и представляется наиболее надежной из описанных ранее алгоритмов предсказания значений рН, оптимальных для ра-

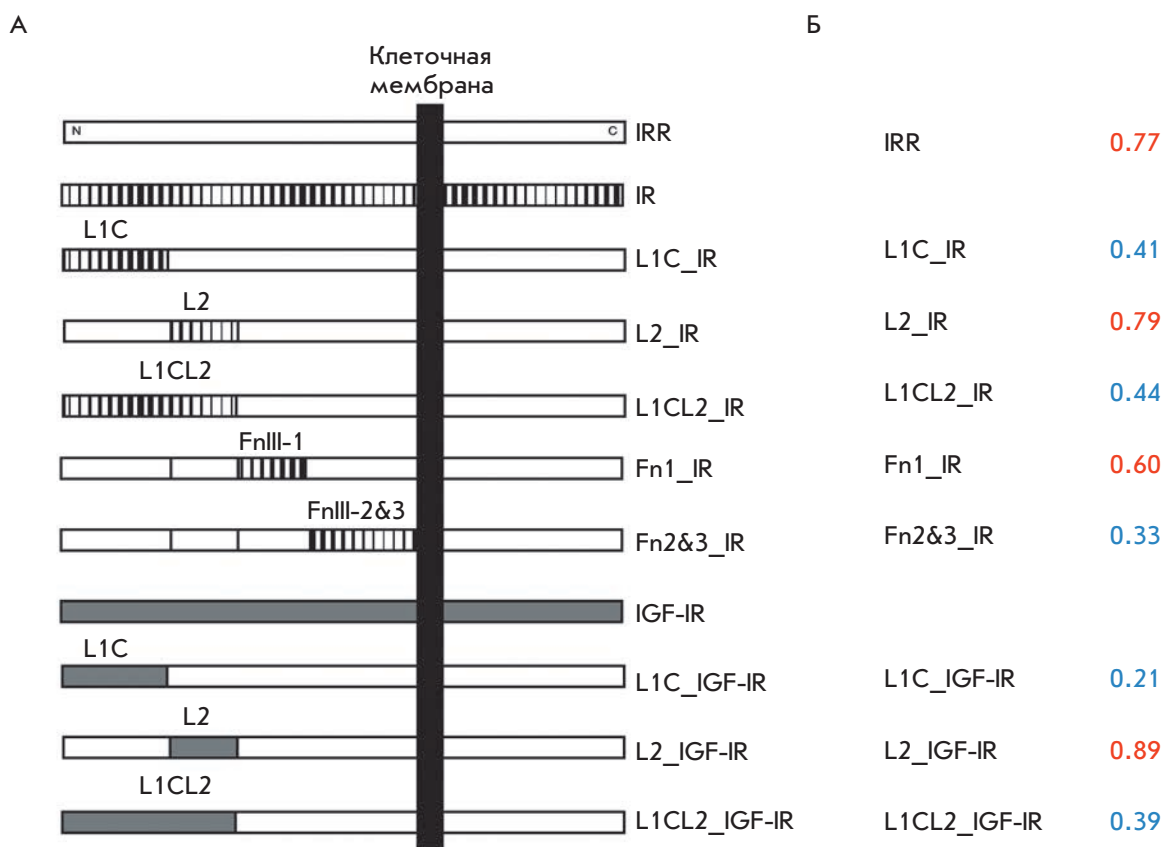


Рис. 2. А – схематическое изображение химерных белков. Белым показаны домены IRR, полосатым – домены IR и серым – домены IGF-IR. L1 и L2 – L-домены, С – фурин-подобный богатый цистеином домен, FnIII-1 и FnIII-2, -3 – обозначение первого или второго и третьего фибронектинового повтора. Б – результат анализа последовательностей эктодоменов химерных рецепторов с использованием программы AcalPred. В таблице приведены значения относительной вероятности предсказания эктодомена как «щелочного» белка. Значения предсказания более 0.5 отмечены красным цветом («щелочные» белки), а менее 0.5 – синим («кислые» белки)

боты фермента [10]. В результате работы программы определена относительная вероятность того, что белок «предпочитает» работать или в щелочной, или в кислой среде, причем суммарная вероятность равна 1. Этот алгоритм создан для растворимых ферментов, поэтому мы взяли последовательности эктодоменов рецепторов семейства IR примерно 20 различных организмов – от лягушки до человека (полные названия организмов и их сокращения приведены в «Экспериментальной части»), и проанализировали их с использованием программы AcalPred. В качестве примера приведен результат анализа эктодоменов семейства рецептора инсулина человека. Так, IR человека был с относительной вероятностью 0.95 классифицирован как «кислый» белок и с вероятностью 0.05 как «щелочной». IGF-IR человека с вероятностью 0.92 принадлежит к «кислым» белкам и с вероятностью 0.08 – к «щелочным», тогда как IRR человека с вероятностью 0.25 отно-

сится к «кислым» белкам и с вероятностью 0.75 – к «щелочным».

Оценка вероятности того, что белок относится к «щелочным», для остальных эктодоменов из различных организмов приведена на рис. 1А. Графическая интерпретация этой таблицы с разделением по вероятности 0.5 (над линией – «щелочной» белок, а ниже линии – «кислый») для этих данных показана на рис. 1Б. Интересно, что семейство рецептора инсулина делится на два класса: а) IR и IGF-IR (кроме IGF-IR лягушки), предположительно, «кислые» белки; б) ортологи IRR, являющиеся «щелочными» белками. Данные результаты свидетельствуют о том, что программа AcalPred может иметь более широкое применение, чем анализ рН-зависимости ферментов, и использоваться для предсказания щелочной активации и регуляции тирозинкиназных рецепторов. В частности, не исключено, что рецептор IGF-IR лягушки, с вероятностью 0.70 отнесенный

к «щелочным» белкам, потенциально может быть сенсором слабощелочной среды.

С целью дальнейшей оценки применимости программы AcalPred к анализу рН-сенсорных свойств рецепторных тирозинкиназ мы сравнили экспериментально определенные свойства ранее полученных химерных белков IR и IRR человека с замещением отдельных доменов внеклеточной части (рис. 2А) [8, 9, 13]. Химерные последовательности были получены в результате замены первых двух доменов L1C, третьего домена L2, всех трех доменов L1CL2, первого фибронектинового повтора FnIII-1 или второго и третьего фибронектиновых повторов в эктодомене IRR на аналогичные участки рецептора IR.

Анализ этих последовательностей программой AcalPred показал, что замена первых двух доменов L1C или второго и третьего фибронектиновых повторов FnIII-2 и FnIII-3 наиболее критична для «щелочности» белка (рис. 2Б). Замена первого фибронектинового повтора FnIII-1 влияет не так сильно, а замена третьего домена L2 не ухудшает предполагаемую чувствительность к щелочным рН (рис. 2Б). Эти данные, в целом, согласуются с нашими экспериментальными результатами. Так, показано, что наиболее критичны замены в области первых двух доменов L1C или второго и третьего фибронектиновых повторов – FnIII-2 и FnIII-3, которые, как мы полагаем, образуют основной сайт рН-чувствительности у рецептора IRR [13]. Замена в IRR домена L2 на аналогичную последовательность из IR оказывала небольшое, но, тем не менее, заметное влияние на чувствительность IRR к щелочным рН [9], в то время как AcalPred не предсказывала изменений. Замена же первого фибронектинового повтора FnIII-1 на аналогичный фрагмент IR приводила к большему, чем замена домена L2, эффекту, сопоставимому с эффектом от замены L1C, но при этом более слабому, чем от замены второго и третьего фибронектиновых повторов FnIII-2 и FnIII-3 [9, 13], что согласовывалось с предсказанием программы. Можно заключить, что в случае анализа химерных рецепторов программа AcalPred обладает предсказательной силой, но при этом следует иметь в виду, что выходящие параметры описывают вероятность, а не дают точной оценки величины рН-зависимости, т.е. получаемые результаты имеют скорее качественный, чем количественный характер.

Эволюционно IRR имеет большее структурное сходство с рецептором IGF-IR, чем с рецептором инсулина. Поэтому, помимо анализа рецептора IRR, в котором домены L1CL2 заменены аналогичными участками рецептора IGF-IR [8], мы дополнительно получили еще два химерных белка, в которых домены L1C или L2 IRR были заменены соответ-

ствующими доменами рецептора IGF-IR (рис. 2А). Полученные белки экспрессировали в эукариотических клетках НЕК293. Далее мы проверили ответ полученных рецепторов на повышение рН внеклеточной среды. Для этого эукариотические клетки, в которых экспрессировали химерные рецепторы, обрабатывали буфером с рН 7.3 или 9.0. Так же как и IRR, химеры L1C_IGF-IR, L1CL2_IGF-IR и L2_IGF-IR активировались в ответ на воздействие щелочных рН (рис. 3А).

Была построена кривая зависимости степени активации каждого химерного рецептора от рН в диапазоне от 7.3 до 9.4. Кривые активации получены для всех трех химерных белков L1C_IGF-IR, L1CL2_IGF-IR и L2_IGF-IR (рис. 3Б). Для каждого рецептора рассчитаны коэффициент Хилла (H) и полумаксимальная эффективная концентрация гидроксильных ионов (EC_{50}) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5, которые позволяют оценить рН-чувствительность различных химерных рецепторов и кооперативность их взаимодействия с агонистом. Анализ кривых показал, что при замене двух доменов L1C или одного домена L2 коэффициент Хилла существенно не изменяется. Так, в случае L1C_IGF-IR коэффициент Хилла составил 2.4 ± 0.6 , для L2_IGF-IR – 2.5 ± 0.4 , тогда как у IRR он равен 2.4 ± 0.4 . При этом величина EC_{50} возрастает более чем в 2 раза при замене доменов L1C и приблизительно на 40% при замене L2 (рис. 3Б и таблица). Наиболее сильным эффектом был при замене всех трех доменов L1CL2 в химерной конструкции: в этом случае коэффициент Хилла снижается до 1.6 ± 0.3 , а EC_{50} возрастает более чем в 2 раза – до 9.8 ± 2.6 мкМ, почти так же, как у химеры с заменой первых двух доменов L1C (таблица) [8]. Возможно, такое падение коэффициента Хилла связано с изменением структуры и взаимного расположения сайтов рН-чувствительности внутри экто-

Значения коэффициента Хилла и полумаксимальной эффективной концентрации для обозначенных рецепторов

Рецептор	Коэффициент Хилла, H	Полумаксимальная эффективная концентрация, EC_{50} , мкМ
IRR	2.4 ± 0.4	4.1 ± 0.4
L1C_IGF-IR	2.4 ± 0.6	9.9 ± 1.5
L2_IGF-IR	2.5 ± 0.4	5.8 ± 0.5
L1CL2_IGF-IR	1.6 ± 0.3	9.8 ± 2.6

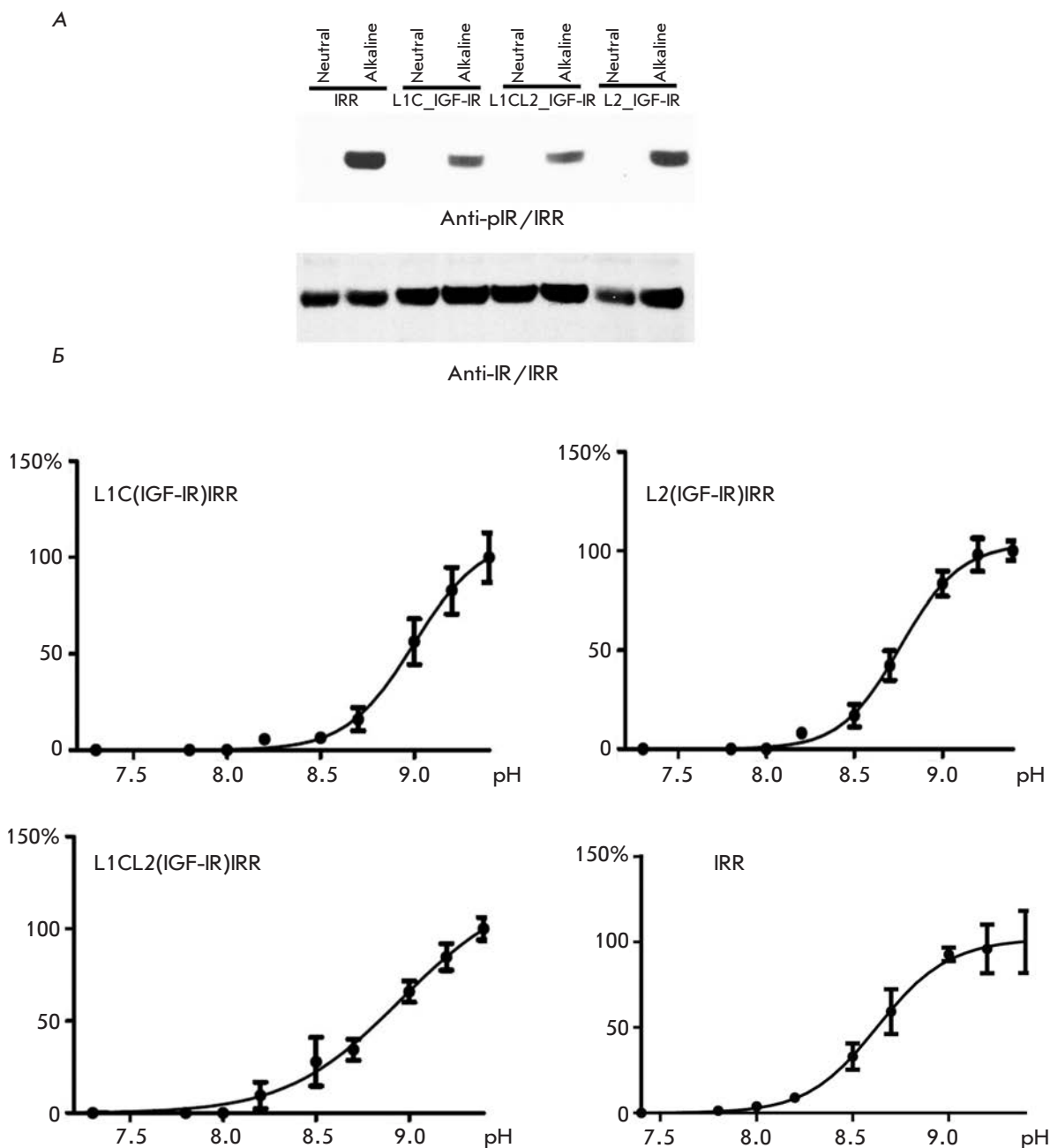


Рис. 3. А — активация химерных рецепторов при щелочных рН. Клетки HEK293, экспрессирующие химерные белки, обрабатывали буфером с рН 7.3 или 9.0, затем лизировали, белки разделяли в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану для проведения Вестерн-блот-анализа. β -субъединицы рецепторов выявляли антителами к С-концевой части IRR, а фосфорилированный рецептор — антителами к фосфорилированной форме IRR. Б — кривые активации IRR и химерных рецепторов. Клетки HEK293, экспрессирующие химерные белки, обрабатывали буфером с рН в диапазоне от 7.3 до 9.4 (7.3; 7.8; 8.0; 8.2; 8.5; 8.7; 9.0; 9.2; 9.4), лизировали, белки разделяли в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану для проведения Вестерн-блот-анализа. β -субъединицы рецепторов выявляли антителами к С-концевой части IRR, а фосфорилированный рецептор — антителами к фосфорилированной форме IRR. Количество фосфорилированного рецептора нормировали по общему количеству рецептора (сигнал от β -субъединицы рецептора). Сигналы, нормированные для каждого значения рН ($n \geq 3$), обрабатывали в программе GraphPad Prism 5 с использованием интерполяции уравнения Хилла. Каждая точка оси Y показывает сигналы от активации рецепторов (%) относительно максимальной средней активации при рН 9.4, принятой за 100%

домена при замене первых трех доменов. Интересно, что замена доменов L1C или L2 в химерных рецепторах IRR соответствующими доменами рецептора инсулина приводила к более серьезным негативным изменениям, чем введение доменов из IGF-IR [9]. Таким образом, наибольший отрицательный эффект наблюдался при замене частей L1C, а наименьший – при замене домена L2.

ВЫВОДЫ

В этой работе мы применили биоинформатический подход к анализу рН-чувствительности рецептора IRR. Алгоритм программы AcalPred, разработанный для предсказания оптимума рН для активности растворимых ферментов, оказался применимым

и для описания рН-зависимых свойств членов семейства рецептора инсулина. Более того, с помощью этой программы можно предсказывать вклад отдельных структурных фрагментов рецептора в его рН-сенсорную функцию. Надо отметить, что с помощью данной программы можно получить в основном качественный результат, а ее количественные выводы не всегда точны. ●

*Работа поддержана РНФ (14-14-01195),
Президиумом РАН «Молекулярная и клеточная
биология» и «Фундаментальные науки –
медицине», РФФИ (гранты № 13-04-01359А,
14-04-01736А, 12-04-91054, 13-04-90481).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurachi H., Jobo K., Ohta M., Kawasaki T., Itoh N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 187. P. 934–939.
2. Hernandez-Sanchez C., Mansilla A., de Pablo F., Zardoya R. // *Mol. Biol. Evolution.* 2008. V. 25. P. 1043–1053.
3. De Meyts P. // *Trends Biochem. Sci.* 2008. V. 33. P. 376–384.
4. Deev I.E., Vasilenko K.P., Kurmangaliev E., Serova O.V., Popova N.V., Galagan Y.S., Burova E.B., Zozulya S.A., Nikol'skii N.N., Petrenko A.G. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2006. V. 408. P. 184–187.
5. Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhovsky D.I., Berchatova A.A., et al. // *Cell Metabolism.* 2011. V. 13. P. 679–689.
6. Deyev I.E., Rzhovsky D.I., Berchatova A.A., Serova O.V., Popova N.V., Murashev A.N., Petrenko A.G. // *Acta Naturae.* 2011. V. 3. P. 114–117.
7. Petrenko A.G., Zozulya S.A., Deyev I.E., Eladari D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1834. P. 2170–2175.
8. Popova N.V., Deyev I.E., Petrenko A.G. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2013. V. 450. P. 160–163.
9. Deyev I.E., Mitrofanova A.V., Zhevlenev E.S., Radionov N., Berchatova A.A., Popova N.V., Serova O.V., Petrenko A.G. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 33884–33893.
10. Lin H., Chen W., Ding H. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e75726.
11. Renteria M.E., Gandhi N.S., Vinuesa P., Helmerhorst E., Mancera R.L. // *PLoS One.* 2008. V. 3. e3667.
12. Deyev I.E., Petrenko A.G. // *Biochimie.* 2010. V. 92. P. 418–422.
13. Deyev I.E., Chachina N.A., Shayahmetova D.M., Serova O.V., Petrenko A.G. // *Biochimie.* 2015. V. 92. P. 1–9.

УДК 611.013

Выявление экспрессии Т-кадгерина в эмбриогенезе у мыши

К. А. Рубина^{1*}, В. А. Смутова¹, М. Л. Семенова², А. А. Поляков³, S. Gerety⁴, D. Wilkinson³,
Е. И. Суркова¹, Е. В. Семина¹, В. Ю. Сысоева¹, В. А. Ткачук¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, кафедра биохимии и молекулярной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³Division of Developmental Neurobiology, MRC National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA

⁴Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge. CB10 1SA

*E-mail: rkseiniya@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2014

После доработки 20.02.2015

РЕФЕРАТ В представленной работе изучена экспрессия Т-кадгерина на ранних этапах развития эмбриона мыши. С использованием методов гибридизации *in situ* и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией установлено, что экспрессия Т-кадгерина в развивающемся головном мозге выявляется, начиная со стадии E8.75, а в сердце – со стадии E11.5, что указывает на возможную роль Т-кадгерина в процессах формирования сосудов в эмбриогенезе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ангиогенез, *in situ*-гибридизация, Т-кадгерин, эмбриогенез.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ T-cad – Т-кадгерин, ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Т-кадгерин впервые обнаружили более 20 лет назад в мозге куриного эмбриона [1]. В ранних работах Раншт [1] было показано, что экспрессия Т-кадгерина в развивающихся сомитах коррелирует с миграцией клеток нервного гребня из нервной трубки. Клетки нервного гребня представляют собой транзиторную мультипотентную популяцию клеток, из которых впоследствии формируются различные ткани, включая черепно-лицевые кости и хрящи, гладкомышечные клетки, меланоциты, периферические нейроны, глию и другие. В более поздних работах этой лаборатории было обнаружено, что мигрирующие клетки нервного гребня и растущие к своим мишеням аксоны мотонейронов выбирают траекторию движения через ростральную часть сомитов, избегая по пути каудальную часть сомитов, где клетки экспрессируют Т-кадгерин. Эксперименты *in vitro* с использованием растворимого Т-кадгерина или Т-кадгерина в качестве субстрата показали, что Т-кадгерин подавляет формирование нейритов и рост аксонов мотонейронов. Это позволило предположить, что Т-кадгерин функционирует как молекула-навигатор для растущих аксонов и мигрирующих клеток нервного греб-

ня [2, 3]. Подобно другим навигационным молекулам, эфринам и их рецепторам [4], Т-кадгерин в развивающейся нервной системе действует как «молекула отталкивания» и негативно регулирует рост аксонов и миграцию клеток.

Следует отметить, что уровень экспрессии Т-кадгерина во взрослом мозге выше, чем в эмбриональном [5]. В нашей лаборатории обнаружено, что во взрослом организме Т-кадгерин экспрессируется не только в нервной системе, но и в сердечно-сосудистой [6, 7]. Иммуногистохимическое окрашивание срезов аорты выявило присутствие Т-кадгерина во всех слоях сосудистой стенки (интима, медиа и адвентиция), в эндотелии, гладкомышечных клетках и перицитах. В адвентиции высокий уровень Т-кадгерина отмечен в стенках *vasa vasorum* [6]. Мы наблюдали также повышение экспрессии Т-кадгерина в сосудах при различных патологиях: при формировании атеросклеротических поражений и постангиопластическом рестенозе – состояниях, связанных с патологическим ангиогенезом у человека [6, 7]. Кроме того, обнаружено, что повышенная экспрессия Т-кадгерина в стенке артерий после баллонной ангиопластики у крыс коррелирует с поздни-

ми стадиями формирования неоинтимы и совпадает с фазой активной миграции и пролиферации сосудистых клеток. Экспрессия Т-кадгерина в *vasa vasorum* адвентиции поврежденных кровеносных сосудов позволяет предполагать его участие в регуляции ангиогенеза или репарации повреждений сосудистой стенки [7].

Известно, что в эмбриогенезе формирование нервной и сердечно-сосудистой систем происходит параллельно, в результате чего сосуды и нервы часто располагаются в непосредственной близости друг от друга. Нервные и сосудистые клетки секретируют нейротрофические и ангиогенные факторы соответственно, что способствует их выживанию и определяет направление роста и миграции [8]. Механизмы регуляции направленного роста аксонов и миграции нервных клеток достаточно хорошо изучены [4, 9, 10], данных о факторах и механизмах, регулирующих направленный рост сосудов, существенно меньше. К навигационным молекулам, участвующим в регуляции формирования нервной и сосудистой систем, традиционно относят такие белки, как семафорины и их рецепторы (плексины и нейропилины), нейтрины и их рецепторы (DCC/неогенин и Unc5), слитлиганды и их рецепторы (Robo) и некоторые другие белки [10]. Данные об экспрессии Т-кадгерина в сердечно-сосудистой системе в эмбриогенезе до сих пор не опубликованы. Не известно, экспрессируется ли Т-кадгерин в формирующемся сердце и сосудах в эмбриогенезе или его роль ограничивается регуляцией траектории роста аксонов и миграции клеток нервного гребня.

В этой связи, используя методы *in situ*-гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией, мы анализировали экспрессию Т-кадгерина на разных стадиях развития мыши. Экспрессия мРНК Т-кадгерина в развивающемся головном мозге обнаруживается, начиная со стадии E8.75. В сердце экспрессия Т-кадгерина выявлена на стадии E11.5, что совпадает с процессами активного формирования и роста сосудов за счет васкуло- и ангиогенеза в сердечно-сосудистой системе и головном мозге.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение датированной беременности мыши

В работе использовали эмбрионы мышей, полученные от гибридов F1 CBA/C57Bl6. Мышей содержали в стандартных условиях при 14-часовом световом дне. В вечернее время суток к самкам подсаживали самцов, на следующее утро выявляли спарившихся мышей по наличию вагинальных пробок. День обна-

ружения вагинальной пробки считали 1/2 первого дня беременности.

Получение эмбрионов мыши на постимплантационных стадиях развития

Постимплантационные эмбрионы извлекали по стандартному протоколу, описанному Манк [11]. Самку умерщвляли путем дисклокации шейных позвонков, вскрывали брюшную полость, извлекали матку с децидуомами и помещали в чашку Петри с охлажденным фосфатно-солевым буфером (ФСБ, Sigma-Aldrich). Далее рога матки надрезали по антимезометриальному краю, обнажая децидуальные капсулы с зародышами, и отделяли их от мезометриальной стенки. Децидуомы переносили в чистую чашку Петри, содержащую холодный ФСБ. Децидуальную капсулу надрезали, захватив ее мезометриальный конец, и аккуратно выталкивали эмбрион в раствор. После этого препаровальными иглами эмбрион освобождали из амниотической оболочки и переносили пипеткой в чистую чашку Петри с ФСБ для отмывки. Эмбрионы фиксировали в 4% растворе формальдегида (PRS Panreac) на ФСБ при температуре +4°C в течение ночи.

Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши антителами против Т-кадгерина

После фиксации эмбрионы промывали 5 раз по 20 мин в ФСБ, содержащем 0.2% детергента Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Для блокирования неспецифического окрашивания образцы помещали в нормальную неиммунную сыворотку козы (Sigma-Aldrich) в разведении 1 : 10 и инкубировали их при температуре +4°C на качалке в течение ночи. Затем эмбрионы инкубировали в растворе моноклональных антител кролика против Т-кадгерина мыши (BioDesign) в разведении 1 : 25. В качестве контроля использовали неиммунные иммуноглобулины IgG кролика (Abd Serotec) в концентрации, эквивалентной концентрации специфических антител. Инкубацию проводили в течение дня при комнатной температуре и при постоянном покачивании. Антитела отмывали в 0.2% растворе Triton X-100 на ФСБ (3 раза по 20 мин при комнатной температуре), а затем (в четвертой смене раствора) на качалке в течение ночи при температуре +4°C. После отмывки эмбрионы помещали в раствор вторых антител козы, конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor® 594, в которых выдерживали весь день на качалке при комнатной температуре. Ядра клеток докрасивали флуоресцентным красителем DAPI (Sigma-Aldrich) в разведении 1 : 1000 в течение 30 мин, а затем промывали 3 раза по 20 мин в 0.2% Triton X-100 на ФСБ и оставляли на ночь в том же раство-

ре при температуре +4°C на качалке. На следующий день эмбрионы заключали в среду Aqua-Poly/Mount (Polysciences). Готовые образцы анализировали при помощи конфокального мультифотонного микроскопа Leica SP5 и программного обеспечения Leica Application Suite Advanced Fluorescence 2.2.0 (Leica Microsystems).

Очистка плазмид для *in situ*-гибридизации

Очистку и выделение плазмид производили с помощью коммерческого набора EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя.

Линеаризация плазмид для *in situ*-гибридизации

In situ-гибридизацию с РНК-содержащими пробами к Т-кадгерину (*sense* и *antisense*) и *Krox20* проводили на эмбрионах мыши по методике, разработанной ранее [12].

Для выявления экспрессии мРНК Т-кадгерина в эмбрионах мыши методом гибридации *in situ* использовали плазмиду рFLCI (ImaGenes, Германия) со встроенной EST-последовательностью (*expressed sequence tag*) кДНК Т-кадгерина. Для положительного контроля использовали плазмиду Bluescript KS со встроенной EST-последовательностью кДНК *Krox20*. EST представляют собой короткие кДНК, используемые для выявления экспрессии генов и доступные в базе данных GenBank.

Для линеаризации плазмидную ДНК обрабатывали рестриктазами: Not1 (Fermentas) – для *Krox20* и BamH1 (Fermentas) – для Т-кадгерина. Состав реакционной смеси для линеаризации: 10-кратный буфер, деионизованная вода («Синтол»), плаزمид (4 мкг), рестриктаза (Not1 или BamH1). Смесь инкубировали в течение 12 ч при температуре +37°C. После инкубации ДНК очищали с использованием коммерческого набора GFX PCR DNA and Gel Purification Kit (GE Healthcare) в соответствии с протоколом производителя. Линеаризованные и нелинеаризованные плазмиды анализировали с помощью электрофореза в 1.2% агарозном геле.

Синтез РНК-содержащей пробы для *in situ*-гибридизации

Реакционная смесь для синтеза меченой дигоксигенином РНК-содержащей пробы включала: 5-кратный транскрипционный буфер, деионизованную свободную от РНКаз воду, линеаризованную плазмиду, смесь нуклеотидов, меченных DIG (10 mM АТФ, 10 mM СТР, 10 mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-11-UTP, pH 7.5, Roche), ингибитор РНКаз (Merck Biosciences), РНК-полимеразу. Смесь инкубировали в течение 2 ч при температуре +37°C.

Для синтеза РНК-содержащей пробы с линеаризованной плазмиды, содержащей последовательность *Krox20*, использовали РНК-полимеразу Т3 (Fermentas). Для синтеза РНК-пробы прямой последовательности Т-кадгерина (отрицательный контроль) с линеаризованной плазмиды использовали РНК-полимеразу Т7 (Promega), а для синтеза обратной РНК-пробы для выявления мРНК Т-кадгерина использовали РНК-полимеразу Т3 (Fermentas). Полученные РНК-пробы очищали на коммерческой колонке RNAspin Mini (GE Healthcare) в соответствии с протоколом изготовителя.

Гибридизация эмбрионов мыши *in situ*

Гибридизацию эмбрионов мыши проводили с РНК-пробой (*antisense*), которую синтезировали на матрице гена Т-кадгерина. РНК-проба *antisense* (обратная последовательность) позволяет выявлять экспрессию на уровне транскрипции. *Sense*-проба (прямая последовательность) не связывается с мРНК в клетке, поскольку она некомплементарна мРНК и используется в качестве отрицательного контроля. Положительным контролем служила РНК-проба, синтезированная на матрице гена *Krox20*, уровень экспрессии которого высок в клетках центральной нервной системы эмбрионов мыши на этих стадиях развития.

Гибридизацию проводили на эмбрионах мыши стадий E8.75, E9.5 и E10.5.

Эмбрионы фиксировали в течение ночи в 4% растворе формальдегида (PRS Panreac) на ФСБ, содержащем также 1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) при температуре +4°C, затем отмывали (2 раза по 5 мин) холодным ФСБ и последовательно фиксировали в растворах метанола возрастающей концентрации (25, 50, 75 и дважды 100%). После этого эмбрионы замораживали и хранили для последующих исследований при температуре –20°C. Непосредственно перед проведением гибридации зародышей подвергали регидратации в растворах метанола с понижающейся концентрацией (75, 50 и 25%), отмывали 3 раза в ФСБ, обрабатывали протеиназой К при комнатной температуре (Qiagen, в концентрации 10 мкг/мл на ФСБ). Затем эмбрионы отмывали в ФСБ, фиксировали в 4% формальдегиде (PRS Panreac) на ФСБ в течение 20 мин и отмывали 2 раза по 5 мин в ФСБ. Далее эмбрионы постепенно переводили в гибридационный буфер, содержащий 50% формамид (Sigma-Aldrich), 5-кратный буфер SSC (исходный раствор: 20-кратный буфер SSC содержит 3 M NaCl, 0.3 M цитрат натрия, pH 7.0), 0.1% Triton X-100 («ДиаЭм»), 50 мкг/мл гепарина (Sigma-Aldrich), 1 мг/мл РНК из дрожжей типа IV (Sigma-Aldrich), 5 mM EDTA (Applichem),

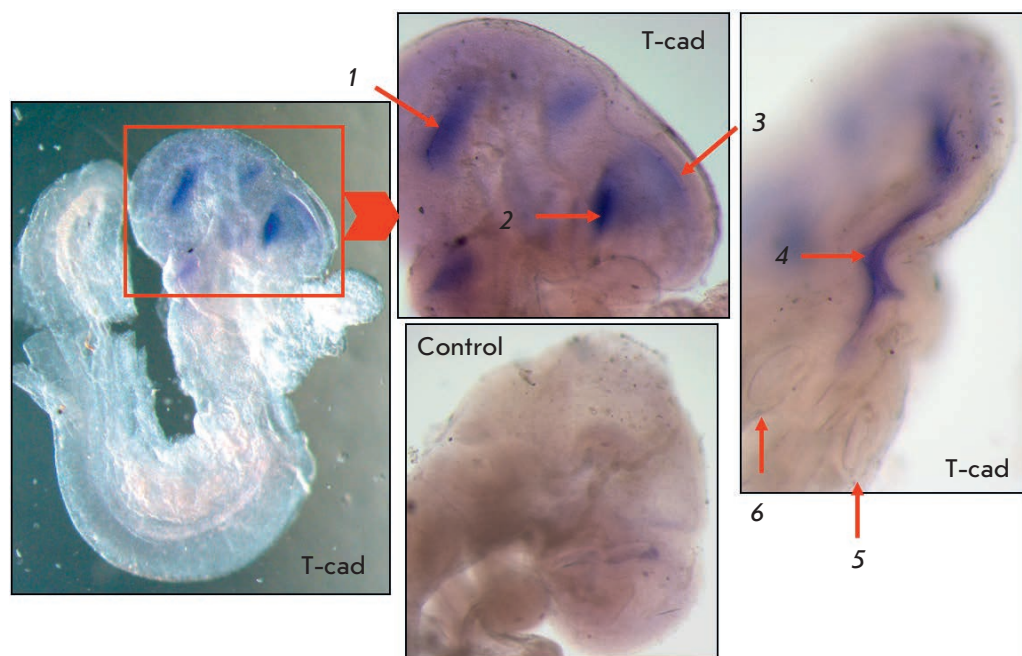


Рис. 1. *In situ*-гибридизация эмбрионов мыши на стадии E8.75. Экспрессия мРНК Т-кадгерина (T-cad): 1 – в области среднего мозгового пузыря; 2 – в основании формирующегося глазного пузыря; 3 – во внутренней выстилке конечного мозга; 4 – в продолговатом мозге; 5, 6 – в слуховых пузырях. Отсутствие специфического окрашивания в отрицательном контроле (control). Увеличение в 3.2, 5 и 6 раз

2% блокирующий раствор (Roche) и 0.1% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate) (Sigma-Aldrich). Эмбрионы инкубировали при комнатной температуре в смеси (1 : 1) гибридационного буфера и ФСБ, затем – в гибридационном буфере. Эмбрионы оставляли в гибридационном буфере на ночь при температуре +65°C. Утром эмбрионы помещали в свежий гибридационный буфер, добавляли РНК-пробу (0.5 мкг пробы на 1 мл буфера) и инкубировали в течение 24 ч при температуре +65°C. После этого эмбрионы отмывали в гибридационном буфере (3 раза по 30 мин при температуре +65°C), а затем в смеси гибридационного буфера и буфера МАВТ (1 : 1) в течение 30 мин при температуре +65°C. Состав буфера МАВТ: 100 мМ малеиновая кислота (Sigma-Aldrich), pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich). Далее эмбрионы промывали в буфере МАВТ 3 раза по 10 мин при комнатной температуре, помещали в блокирующий раствор (2% блокирующий раствор (Roche), содержащий 20% сыворотки овцы (Abd Serotec) и МАВТ) на 2 ч при комнатной температуре, после чего инкубировали в течение 12 ч при +4°C с раствором антител против дигоксигенина, конъюгированных с щелочной фосфатазой в разведении 1 : 200 (Roche), приготовленном на 10% сыворотке овцы. После инкубации с антителами эмбрионы промывали при комнатной температуре в МАВТ, а затем в буфере NTMT до появления окрашивания. Состав буфера NTMT на 1 мл: 100 мМ трис-HCl (Sigma-Aldrich), pH 9.5,

50 мМ MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 100 мМ NaCl, 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich), 4.5 мкл NBT (4-nitro-blue tetrasodium chloride, Vector Laboratories) и 3.5 мкл BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, Vector Laboratories). Реакцию окрашивания останавливали многократным промыванием в ФСБ, после чего эмбрионы фиксировали в 4% формальдегиде (PR5 Panreac) на ФСБ в течение 2 ч при комнатной температуре. Съемку эмбрионов производили с использованием стереомикроскопа (Olympus SZX 16, камера AxioCam HRC, Carl Zeiss) и программы Axio Vision 3.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Используя методы *in situ*-гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией, мы оценили экспрессию Т-кадгерина на стадиях E8.75–E11.5 раннего эмбрионального развития мыши.

Экспрессия Т-кадгерина в эмбриональном головном мозге мыши

Экспрессия мРНК Т-кадгерина обнаружена в формирующемся головном мозге, начиная со стадии E8.75, в частности, в промежуточном и переднем мозге – во внутренней выстилке полости конечного мозга (telencephalon) (рис. 1). мРНК Т-кадгерина выявлялась также в области глазных пузырей – в месте перехода промежуточного мозга в развивающиеся зрительные бугры. В отрицательном контроле (проба sense) наблюдали неспецифическое фоновое

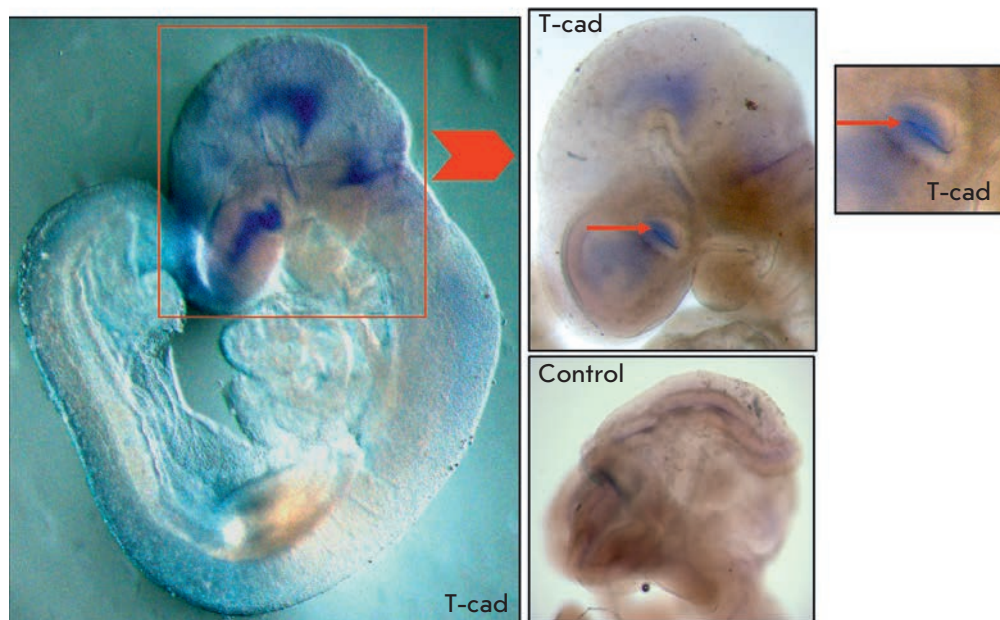


Рис. 2. *In situ*-гибридизация эмбрионов мыши на стадии E9.5. Окрашивание участков головного мозга соответствует локализации мРНК Т-кадгерина (T-cad). Экспрессия наблюдается в основании формирующихся глазных пузырей; в области теменного и затылочного изгибов. Маленькие стрелки указывают на основание формирующегося глазного пузыря. Control – отрицательный контроль. Увеличение в 3,2, 5 и 6 раз

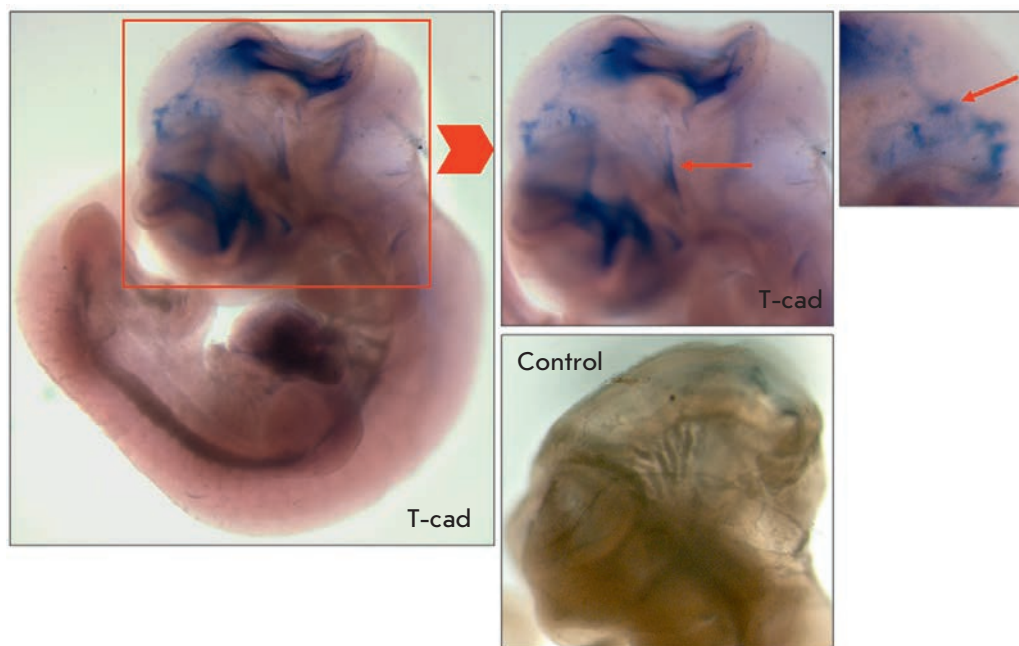


Рис. 3. *In situ*-гибридизация эмбрионов мыши на стадии E10.5. Интенсивная экспрессия Т-кадгерина (T-cad) в формирующейся крыше мозга, в латеральных областях диэнцефалона. Стрелкой указано специфическое окрашивание сосудистого сплетения в области конечного мозга. Отсутствие специфического окрашивания в отрицательном контроле (control). Увеличение в 3,2, 5 и 6 раз

диффузное окрашивание в переднем мозге, отличное от специфического окрашивания с использованием положительного контроля и antisense-пробы на Т-кадгерин.

На стадии E9.5 экспрессия мРНК Т-кадгерина выявлена в переднем мозге, в утолщающейся обонятельной плакоде, в основании глазных пузырей, в области теменного изгиба, в месте перехода продолговатого мозга в спинной – в области затылочного изгиба (рис. 2).

На стадии E10.5 экспрессия мРНК Т-кадгерина наблюдалась в среднем мозге, в формирующейся эпендимной крыше промежуточного мозга (диэнцефалон, diencephalon) и его латеральных областях (рис. 3 и 4). Специфическое окрашивание обнаружено также в области сосудистого сплетения конечного мозга (рис. 3).

В отрицательном контроле специфического окрашивания не обнаружили. В положительном контроле наблюдали характерный для гена *Krox20* паттерн специфического окрашивания (рис. 3 и 4).



Рис. 4. *In situ*-гибридизация эмбрионов мыши на стадии E10.5. T-cad – специфическое окрашивание T-кадгерина в крыше мозга в области затылочного изгиба, во внутренней выстилке конечного мозга; control – отсутствие специфического окрашивания в отрицательном контроле; Krox20 – окрашивание структур центральной нервной системы в положительном контроле. Увеличение в 3.2 раза

Белок T-кадгерин детектировали методом иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против T-кадгерина на целых эмбрионах мыши в сочетании с конфокальной микроскопией. T-кадгерин выявляли, начиная со стадии E9.5, при этом специфическое окрашивание наблюдалось в выстилках развивающегося головного мозга (рис. 5), в том числе в основании формирующихся глазных пузырей.

Уровень экспрессии T-кадгерина во внутренней выстилке головного мозга был высоким, начиная со стадии E11.5: интенсивное специфическое окрашивание наблюдалось в области промежуточного мозга, формирующегося глазного бокала, а также в области среднего и заднего мозга (рис. 6).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессия T-кадгерина на уровне мРНК начинается со стадии E8.75 и выявляется в разных отделах эмбрионального головного мозга. Белок T-кадгерин в эмбрионах детектируется, начиная со стадии E9.5. Максимальная интенсивность экспрессии T-кадгерина выявляется во внутренней выстилке головного мозга.

Экспрессия T-кадгерина в эмбриональном сердце

В сердце эмбрионов мыши T-кадгерин экспрессируется, начиная со стадии E11.5 (рис. 7). На стадиях E8.75, E9.5, E10.5 ни экспрессии мРНК T-кадгерина, ни самого T-кадгерина в формирующемся сердце не обнаружено (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные в нашей работе, свидетельствуют о том, что в формирующемся головном мозге мРНК T-кадгерина экспрессируется, начиная со стадии E8.75 – во внутренней выстилке полости конечного мозга и в промежуточном мозге. До этой стадии экспрессию T-кадгерина выявить не удалось. Известно, что в области изгибов головного мозга на ранних этапах развития происходит ак-

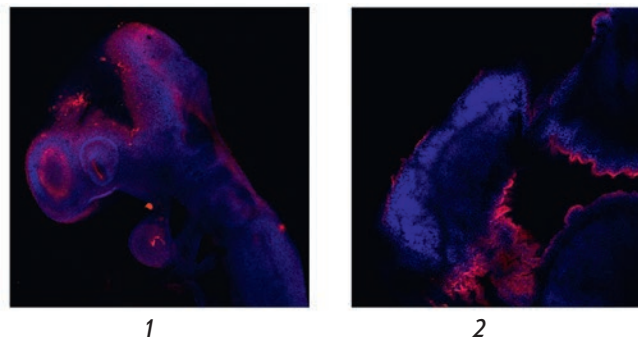


Рис. 5. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши на стадии E9.5 (1) и E12.5 (2). Специфическое окрашивание (красная флуоресценция) соответствует экспрессии T-кадгерина в выстилках мозга на обеих стадиях; экспрессия T-кадгерина в формирующемся глазном пузыре у эмбриона E9.5. Синяя флуоресценция соответствует ядрам, докрашенным DAPI. Увеличение в 5 раз

тивное формирование и рост кровеносных сосудов [13]. Возможно, экспрессия T-кадгерина на стадии E9.5 в этих областях формирующегося мозга связана с интенсивными процессами ангиогенеза и потенциальным участием этого белка в процессах регуляции направленного роста кровеносных сосудов так же, как это происходит при росте аксонов мотонейронов к своим мишеням в нервной системе.

Позднее, на стадии E9.5, мРНК T-кадгерина была идентифицирована в переднем мозге, в обонятельной плакаде, в основании глазных пузырей, в области теменного и затылочного изгибов. Известно, что в области изгибов головного мозга на этой стадии развития происходит активное формирование и рост кровеносных сосудов, что позволяет предполагать возможное участие T-кадгерина в васкуляризации этих структур [13]. Характерно, что экспрессия T-кадгерина на уровне мРНК в области глазных пузырей выявлялась еще на стадии E8.75. Мы предполагаем, что экс-

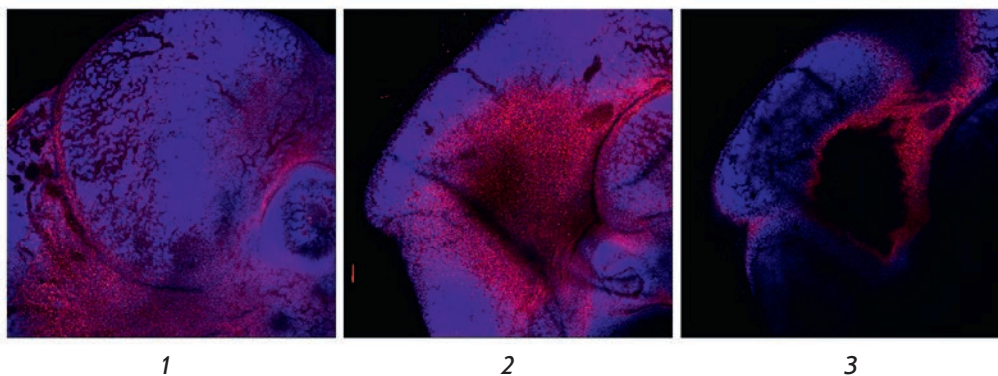


Рис. 6. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши на стадии E11.5. Специфическое окрашивание (красная флуоресценция) соответствует экспрессии белка Т-кадгерина. Синяя флуоресценция соответствует ядрам, докрашенным DAPI. 1 – специфическое окрашивание в области промежуточного мозга, а также в области формирующегося глазного бокала; 2 – специфическое окрашивание в области среднего и заднего мозга; 3 – тот же участок, что и на 2 – на другом уровне оптической плоскости. Увеличение в 5 раз

прессия Т-кадгерина в основании формирующихся глазных пузырей связана с эпителизацией структур будущих глазных бокалов, или Т-кадгерин участвует в формировании сосудистой оболочки глаза. Однако для точного определения роли Т-кадгерина в формировании этих структур необходимы дополнительные исследования.

Далее на стадии E10.5 интенсивное окрашивание, соответствующее мРНК Т-кадгерина, было выявлено в среднем мозге, в формирующейся эпендимной крыше промежуточного мозга и его латеральных областях. Специфическое окрашивание обнаружено также в области сосудистого сплетения конечного мозга. Окрашенные области морфологически соответствовали областям формирования сосудистых сплетений в стенках формирующейся системы желудочков мозга.

Полученные методом гибридизации *in situ* результаты определения экспрессии Т-кадгерина на уровне белка подтверждали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов мыши. Конфокальная микроскопия в сочетании с анализом изображения позволила обнаружить белок Т-кадгерин в выстилках развивающегося головного мозга, начиная со стадии E9.5. Экспрессия Т-кадгерина выявлена, в том числе, и в основании формирующихся глазных пузырей, что соответствует данным, полученным методом *in situ*-гибридизации. Экспрессия Т-кадгерина в формирующемся глазном бокале указывает на возможное участие этого белка в развитии сосудистой оболочки глаза.

Окрашивание эмбрионов антителами выявило интенсивную экспрессию Т-кадгерина во внутренней выстилке головного мозга, начиная со стадии E11.5.

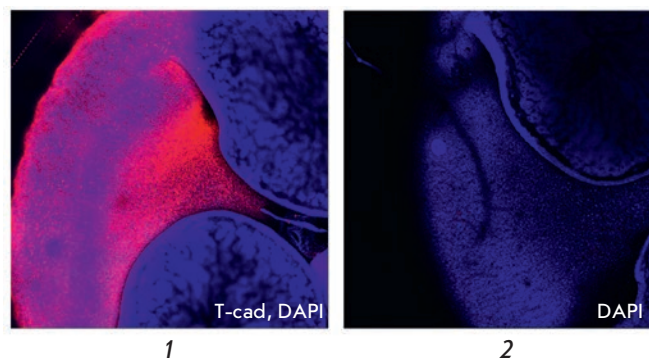


Рис. 7. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши на стадии E11.5. Специфическое окрашивание (красная флуоресценция) соответствует экспрессии белка Т-кадгерина (T-cad). Синяя флуоресценция соответствует ядрам, докрашенным DAPI. 1 – специфическое окрашивание, отражающее экспрессию Т-кадгерина в области сердца; 2 – контрольное окрашивание антителами к иммуноглобулину G. Увеличение в 5 раз

А именно, интенсивное специфическое окрашивание наблюдалось в области промежуточного мозга, формирующегося глазного бокала, а также в области среднего и заднего мозга. Мы предположили, что Т-кадгерин участвует в формировании системы желудочков головного мозга, а именно сосудистых сплетений в стенках желудочков, поскольку известно, что на этом этапе эмбрионального развития здесь происходит активное формирование сосудов мозга [13].

Таким образом, использование методов *in situ*-гибридизации и иммунофлуоресцентного окраши-



Рис. 8. Отсутствие мРНК Т-кадгерина в формирующемся сердце эмбрионов мыши на стадиях E8.75–E10.5 (1, 2, 3). Стрелки и выделенная область указывают на зону формирующегося сердца. Увеличение в 5 (1, 2) и 6 раз (3)

вания в сочетании с конфокальной микроскопией впервые позволило выявить Т-кадгерин в эмбрионах мыши и определить стадию, с которой начинается экспрессия Т-кадгерина на уровне мРНК и белка, а также морфологические области экспрессии этого белка. Экспрессия Т-кадгерина на уровне мРНК обнаруживается, начиная со стадии E8.75, в разных отделах формирующегося головного мозга. Экспрессия белка Т-кадгерина выявляется, начиная со стадии E9.5. Наибольшая экспрессия Т-кадгерина при этом наблюдалась во внутренней выстилке головного мозга, что предполагает возможное участие Т-кадгерина в формировании сосудистых сплетений в стенках желудочков в развивающемся головном мозге.

Методы *in situ*-гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов мыши позволили выявить экспрессию Т-кадгерина в сердце на уровне белка, начиная со стадии E11.5. На стадиях E8.75, E9.5, E10.5 ни экспрессии мРНК Т-кадгерина, ни белка Т-кадгерина в формирующемся сердце не обнаружено.

Экспрессия Т-кадгерина в эмбриональном сердце, впервые выявленная на стадии E11.5, отражает, по всей видимости, активные процессы формирования и роста сердца и его отделов, а также ангиогенеза [14].

Предположительно, между стадиями E10.5–E11.5 эмбрионального развития мыши происходит активация синтеза мРНК Т-кадгерина, после чего происходит быстрое и интенсивное накопление белка Т-кадгерина. Вполне вероятно, что Т-кадгерин также принимает участие в установлении синаптических контактов в формирующейся проводящей системе сердца.

Ранее в лаборатории Раншт были получены мыши с дефицитом Т-кадгерина [15]. Такие мыши были жизнеспособны и фертильны, что характерно для це-

лого ряда животных с нокаутом и указывает на возможные компенсаторные механизмы, реализующиеся в эмбриогенезе. Однако в условиях эксперимента на различных животных моделях, воспроизводящих заболевания сердечно-сосудистой системы у человека, обнаружено, что Т-кадгерин играет важную роль в процессах восстановления кровоснабжения при повреждении. На модели ишемии-реперфузии показано, что Т-кадгерин выполняет кардиопротективную функцию, поскольку размер инфаркта у контрольных мышей был значительно меньше, чем у животных с дефицитом Т-кадгерина [16, 17]. На модели ишемии задней конечности с использованием этих же мышей обнаружено, что Т-кадгерин необходим для полноценной реваскуляризации ишемизированных мышц [18]. Полученные в настоящей работе данные о роли Т-кадгерина как навигационной молекулы, регулирующей рост сосудов в эмбриогенезе, согласуются с результатами, полученными на экспериментальных животных моделях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные об экспрессии Т-кадгерина в развивающемся головном мозге и сердце мыши свидетельствуют о том, что начало экспрессии Т-кадгерина совпадает с активизацией процессов формирования и роста сосудов за счет васкуло- и ангиогенеза в сердечно-сосудистой системе и головном мозге в эмбриогенезе [19]. Эти результаты позволяют выдвинуть предположение о роли Т-кадгерина как молекулы-регулятора процессов формирования и направленного роста сосудов в эмбриогенезе. Механизм, по которому Т-кадгерин осуществляет регуляцию роста нейронов в нервной системе в эмбриогенезе, как показано ранее, заключается в гомофильном узнавании и последующем «отталкивании» Т-кадгерина на клетках [2, 3]. Нами установлен сходный механизм регуляции

роста сосудов *in vivo* в модельных экспериментах на мышцах и регуляции миграции эндотелиальных клеток *in vitro* [20]. Возможно, сходный механизм имеет место и при регуляции роста кровеносных сосудов с участием T-кадгерина в эмбриогенезе. ●

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086) с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ranscht B., Dours-Zimmermann M.T. // *Neuron*. 1991. V. 7. № 3. P. 391–402.
2. Fredette B.J., Ranscht B. // *J. Neurosci*. 1994. V. 14. P. 7331–7346.
3. Fredette B.J., Miller J., Ranscht B. // *Development*. 1996. V. 122. P. 3163–3171.
4. Eichmann A., Makinen T., Alitalo K. // *Genes Devel*. 2005. V. 19. № 9. P. 1013–1021.
5. Takeuchi T., Misaki A., Liang S.B., Tachibana A., Hayashi N., Sonobe H., Ohtsuki Y. // *J. Neurochem*. 2000. V. 74. P. 1489–1497.
6. Ivanov D., Philippova M., Antropova J., Gubaeva F., Iljinskaya O., Tararak E., Bochkov V., Erne P., Resink T., Tkachuk V. // *Histochem. Cell Biol*. 2001. V. 115. P. 231–242.
7. Kudrjashova E., Bashtrikov P., Bochkov V., Parfyonova Ye., Tkachuk V., Antropova J., Iljinskaya O., Tararak E., Erne P., Ivanov D., et al. // *Histochem. Cell Biol*. 2002. V. 118. № 4. P. 281–290.
8. Carmeliet P. // *Nat. Rev. Genet*. 2003. V. 4. № 9. P. 710–720.
9. Poliakov A., Cotrina M., Wilkinson D. // *Developmental Cell*. 2004. V. 7. № 4. P. 465–480.
10. Weinstein B.M. // *Cell*. 2005. V. 120. P. 299–302.
11. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. М.: Мир, 1990. 406 с.
12. Wilkinson D. *In situ* hybridization: a practical approach. Oxford: Oxford Univ. Press, 1998. P. 212.
13. Vasudevan A., Bhide P. // *Cell Adhesion Migration*. 2008. V. 2. № 3. P. 167–169.
14. Burggren W., Keller B. *Development of cardiovascular systems*. Cambridge, UK. Cambridge Univ. Press, 1997. P. 360.
15. Hebbard L.W., Garlatti M., Young L.J.T., Cardiff R.D., Oshima R.G., Ranscht B. // *Cancer Res*. 2008. V. 68. № 5. P. 1407–1416.
16. Denzel M., Scimia M., Zumstein P., Walsh K., Ruiz-Lozano P., Ranscht B. // *J. Clin. Invest*. 2010. V. 120. № 12. P. 4342–4352.
17. Parker-Duffen J., Walsh K. // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2014. V. 28. № 1. P. 81–91.
18. Parker-Duffen J., Nakamura K., Silver M., Zuriaga M.A., MacLauchlan S., Aprahamian T.R., Walsh K. // *Biol. Chem*. 2013. V. 288. № 34. P. 24886–24897.
19. Gilbert S.F. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. P. 817.
20. Rubina K., Kalinina N., Potekhina A., Efimenko A., Semina E., Poliakov A., Wilkinson D.G., Parfyonova Y., Tkachuk V. // *Angiogenesis*. 2007. V. 10. № 3. P. 183–195.

УДК 576.33

Действие гидрофобных моноаминов на протон-активируемые ионные каналы ASIC1b

Э. И. Нагаева*, Н. Н. Потапова, Д. Б. Тихонов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

*E-mail: eline00111@gmail.com

Поступила в редакцию 11.11.2014

После доработки 04.04.2015

РЕФЕРАТ Протон-активируемые ионные каналы (ASICs) широко распространены как в центральной, так и в периферической нервной системе позвоночных животных. Однако фармакология этих рецепторов изучена недостаточно подробно, и актуальным представляется поиск новых модуляторов ASICs. Недавно нами было показано, что некоторые моноамины, являющиеся блокаторами NMDA-рецепторов, способны разнонаправленно влиять на протон-активируемые ионные каналы в зависимости от их субъединичного состава. Изучено действие 9-аминокридина, ИЭМ-1921, ИЭМ-2117 и мемантина как на нативные рецепторы, так и на рекомбинантные гомомерные рецепторы ASIC1a, ASIC2a и ASIC3. В представленной работе протестировано действие этих четырех соединений на гомомерные каналы ASIC1b. Эксперименты проводили методом локальной фиксации потенциала (patch clamp) в конфигурации «целая клетка» на рекомбинантных рецепторах, экспрессированных в культуре клеток линии CHO. Только два из четырех соединений, 9-аминокридин и мемантин, ингибировали каналы ASIC1b. Два других, ИЭМ-1921 и ИЭМ-2117, не проявили активности даже в концентрации 1000 мкМ. В целом, действие соединений на ASIC1b было сходным с их действием на ASIC1a. Особенностью гомомерных ASIC1b-каналов является крутой наклон кривой зависимости активации от концентрации агониста, свидетельствующий о кооперативности активации протонами. В наших экспериментах кривая концентрационной зависимости ингибирования ASIC1b-каналов 9-аминокридином также имела крутой наклон (коэффициент Хилла 3.8), в отличие от ингибирования ASIC1a, где коэффициент Хилла был близок к единице. Это свидетельствует о том, что действие 9-аминокридина связано с изменениями активационных свойств протон-управляемых каналов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ингибирование, ионные каналы, ASIC, 9-аминокридин, мемантин, patch clamp, потенциация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ASIC – acid-sensing ion channel – протон-активируемые ионные каналы; ЦНС – центральная нервная система; ПНС – периферическая нервная система; GFP – green fluorescent protein – зеленый флуоресцентный белок; ИК₅₀ – концентрация, вызывающая 50% ингибирование; pH₅₀ – уровень pH среды, при котором достигается 50% максимальной амплитуды ответа.

ВВЕДЕНИЕ

Протон – наиболее простой нейротрансмиттер [1], действие которого опосредуется через протон-активируемые ионные каналы (ASICs). ASICs – это потенциал-нечувствительные каналы, которые относятся к суперсемейству дегенерин/эпителиальных натриевых каналов (DEG/ENAC) и активируются в ответ на закисление внеклеточной среды. На данный момент идентифицировано четыре гена (*accn1-4*), кодирующих шесть различных субъединиц ASIC: ASIC1a и ASIC1b – продукты альтернативного сплайсинга гена *accn2*, ASIC2a и ASIC2b – продукты альтернативного сплайсинга гена *accn1*, а также субъеди-

ницы ASIC3 и ASIC4 [2]. Функционально активный канал может быть как гомо-, так и гетеротримерным [3], при этом только субъединицы ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a и ASIC3 способны образовывать функционирующий гомомерный канал.

В центральной нервной системе экспрессируются субъединицы ASIC1a, ASIC2a и ASIC2b, преимущественно в таких областях, как гиппокамп, миндалевидное тело, мозжечок, полосатое тело, кора больших полушарий и обонятельные луковицы [4–10]. В периферической нервной системе преобладают субъединицы ASIC1b и ASIC3, их можно встретить в чувствительных нейронах задних корешков

спинного мозга, тройничного и блуждающего нервов. Стоит отметить, что только ASIC3 способны давать стационарный ток в ответ на понижение pH. Эта разновидность протон-активируемых каналов, как и ASIC1b, отвечает за восприятие болевых стимулов, сопровождающих воспаление, переломы, опухоли, гематомы и послеоперационные раны, а также участвует в механорецепции [11, 12]. В центральной нервной системе ASICs вовлечены в такие важные физиологические процессы, как синаптическая передача, синаптическая пластичность, память, обучение [13], страх и депрессия [14], наркотическая зависимость [15] и хемочувствительность [16].

Несмотря на широкое распространение протон-активируемых каналов как в ЦНС, так и в ПНС, фармакология этих рецепторов изучена слабо. Так, на настоящий момент известно, что только гомомеры ASIC1a и ASIC3 могут специфически блокироваться псалмотоксином 1 (PsTx1) – токсином из яда южноамериканского тарантула *Psalmopoeus cambridgei* [17] и токсином APETx2 из яда морской анемоны *Anthopleura elegantissima* [18] соответственно. При этом специфичность псалмотоксина 1 теряется с увеличением концентрации: в концентрации выше 3 нМ он также способен блокировать гетеромеры ASIC1a/2b, а в концентрации более 100 нМ вызывает потенциацию ASIC1b [19]. Самый известный блокатор протон-активируемых каналов амилорид [20] действует на все типы ASICs, а также на другие натриевые каналы из семейства DEG/ENAC [21]. Все попытки синтезировать более специфические структуры на основе амилорида, содержащие одну или две амидиновые группы, не дали желаемых результатов [22, 23]. Говоря о специфичности, следует упомянуть синтетическое соединение 2-гуанидин-4-метилкуиназолин (GMQ), способное избирательно активировать гомомеры ASIC3, взаимодействуя с лигандсвязывающим доменом, отличным от протонсвязывающего [24]. Таким образом, на сегодняшний день фармакологических инструментов, способных дифференцировать разные подтипы протон-активируемых ионных каналов, крайне мало, и поиск новых специфических блокаторов/активаторов представляет актуальную задачу.

Недавно нами было показано, что четыре различных блокатора NMDA-рецепторов (рис. 1А), а именно, 9-аминоакридин [25], ИЭМ-1921 [26, 27], мемантин [28] и ИЭМ-2117 [29, 30] способны разнонаправленно модулировать работу протон-активируемых ионных каналов в зависимости от их субъединичного состава [31]. Так, 9-аминоакридин (9АА), ИЭМ-2117 и мемантин в разной степени ингибировали гомомеры ASIC1a; ИЭМ-1921 не оказывал никакого действия даже в концентрации 1000 мкМ. Ответы ASIC2a,

напротив, потенцировались ИЭМ-1921, ИЭМ-2117 и мемантином и не изменялись при действии 9АА. Влияние протестированных соединений на ASIC3 было более сложным, ввиду наличия пикового и стационарного компонентов тока через эти каналы. ИЭМ-1921 и 9-аминоакридин потенцировали устойчивый компонент, но ингибировали пиковый. ИЭМ-2117 и мемантин потенцировали оба компонента ответа. При этом ИЭМ-2117 был наиболее активным потенциатором и, кроме того, активировал ASIC3-каналы в нейтральной среде (pH 7.4), вызывая стационарный ток.

В настоящей работе мы изучили действие четырех описанных соединений на гомомерный канал, образуемый субъединицей ASIC1b, которая, как и субъединица ASIC1a, является продуктом альтернативного сплайсинга гена *acsn2*. Этот канал интересен еще и тем, что имеет очень характерную кривую активации с высоким коэффициентом Хилла (n_H), равным 4.8 [32]. Анализ действия потенциаторов/ингибиторов на рецепторе с подобной характеристикой может помочь проверить гипотезу о возможном механизме действия лигандов за счет увеличения/снижения сродства протонов к протонсвязывающему сайту ASICs. Мы показали, что действие гидрофобных моноаминов на ASIC1b подобно их действию на ASIC1a за исключением того, что концентрационная кривая ингибирования 9АА имеет значительно больший коэффициент Хилла по сравнению с ASIC1a.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки линии CHO (культура клеток эпителия яичника китайского хомячка) культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Среда для роста клеток состояла из раствора DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с добавлением 10% эмбриональной коровьей сыворотки и 1% стрептомицина/пенициллина. Трансфекцию клеток плазмидами проводили при помощи реагента «Липофектамин 2000» (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Плазмида, несущая конструкцию rASIC1b-pEGFP-C1, любезно предоставлена А. Старущенко. Клетки линии CHO высевали на стекла площадью не более 25 мм², равномерно распределенные по дну чашки Петри диаметром 35 мм. Для экспрессии гомомерных каналов ASIC1b клетки трансфицировали плазмидой (0.5 мкг), несущей ген *ASIC1b*, совместно с плазмидой (0.5 мкг), кодирующей флуоресцентный белок GFP. Электрофизиологические эксперименты проводили через 36–72 ч после трансфекции. Трансфицированные клетки детектировали по зеленому свечению при помощи микроскопа Leica DM IL (Leica Microsystems, Германия).

Токи, вызванные быстрым закислением среды, регистрировали при помощи метода локальной фиксации потенциала (patch clamp) в конфигурации «целая клетка». Для этого использовали усилитель ЕРС-8 (НЕКА Electronics, Германия); сигнал фильтровали в полосе частот 0–5 кГц, оцифровывали с частотой дискретизации 1 кГц и записывали на персональный компьютер при помощи программного обеспечения Patchmaster того же производителя (НЕКА Electronics, Германия). Все эксперименты проводили при комнатной температуре (23–25 °С). Микропипеточный раствор содержал (в мМ): CsF 100, CsCl 40, NaCl 5, CaCl₂ 0.5, EGTA 5, HEPES 10 (рН доводили до 7.2, добавляя CsOH). Внеклеточный раствор содержал (в мМ): NaCl 143, KCl 5, CaCl₂ 2.5, D-глюкоза 10, HEPES 10, MES 10 (рН доводили до 7.35, добавляя NaOH). Все растворы фильтровали через мелкопоровые целлюлозные мембраны при помощи вакуумного стеклянного фильтра (Sartorius AG, Германия).

Растворы с низкими значениями рН, которые использовали для активации каналов, готовили из базового внеклеточного раствора, добавляя HCl. Тестируемые моноамины были синтезированы ранее по заказу нашей лаборатории В.Е. Гмиро в НИИ Экспериментальной медицины города Санкт-Петербурга. Для получения маточного раствора моноамина с концентрацией 5×10^{-2} М навеску его кристаллической формы растворяли в бидистиллированной воде. Далее нужный объем маточного раствора добавляли к рабочим растворам с разными значениями рН. При приготовлении растворов моноаминов в каждом конкретном случае проверяли рН полученной смеси, при обнаружении сдвига доводили рН до необходимого значения при помощи 0.1 н. раствора HCl или 0.2 н. раствора NaOH. Для подачи тестовых соединений использовали многоканальную систему быстрой аппликации веществ ALA-VM8 (ALA Scientific Instruments, США). Интервал между тестовыми аппликациями составил 60 с.

Все данные представлены в виде «значение \pm стандартное отклонение», определенном на основе, как минимум, пяти экспериментов. Статистическую значимость эффектов оценивали при помощи парного *t*-теста с $p = 0.05$ (значение амплитуды ответа в присутствии тестируемого соединения относительно контроля). Форму ответа анализировали путем измерения времени нарастания тока с 10 до 90% от максимальной амплитуды и расчетом постоянной времени спада ответа при помощи моноэкспоненциальной аппроксимации по методу наименьших квадратов.

Для наглядности оценки изменения кинетики ответа под действием изучаемых соединений применя-

ли метод нормализации токов по амплитуде (рис. 2). Для этого вычисляли соотношение контрольного тока в ответ на рН и тока в присутствии исследуемого соединения. Меньший по амплитуде ток перемножали на полученное отношение и в результате получали ответы, равные по амплитуде.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уменьшение рН внеклеточной среды от исходного уровня 7.35 приводило к появлению транзистентных токов в клетках, несущих плазмиду ASIC1b. Пороговые токи, превышающие уровень шума более чем в 2 раза (40–100 пА), наблюдали при предъявлении раствора с рН 6.8. При снижении рН раствора до 6.5 (рис. 3А,Б) регистрировались токи до 1 нА. Такое резкое увеличение ответа связано с высоким углом наклона кривой активации ($n_H = 4.9 \pm 0.2$; $pH_{50} = 6.3 \pm 0.2$, $n = 5$) (рис. 3А). Эти данные согласуются с опубликованными ранее [32]. Классический блокатор протон-активируемых ионных каналов амилорид (30 мкМ) блокировал токи на $53 \pm 7\%$ ($n = 6$) при совместной аппликации с раствором, имеющим рН 6.2. Кинетика спада ответа вследствие десенситизации рецепторов ($\tau = 0.67 \pm 0.12$ с, $n = 5$) также соответствовала ранее опубликованным данным.

Ни одно из четырех исследованных соединений не вызывало токов в нейтральной среде даже в высоких концентрациях (данные не приведены).

ИЭМ-1921 и ИЭМ-2117

Поскольку ASIC1b и ASIC1a – это два варианта альтернативного сплайсинга одного и того же гена *accn2*, можно было предполагать, что действие исследуемых соединений на ASIC1b будет сходным с действием на ASIC1a. Однако это предположение оказалось верным только для некоторых из соединений. Как и в случае с ASIC1a, производное фенилциклогексила ИЭМ-1921 не проявило активности в отношении ASIC1b-каналов в диапазоне концентраций от 10 до 1000 мкМ. Так же вел себя и ИЭМ-2117 (рис. 1Б), хотя в случае с ASIC1a он проявил себя как слабый ингибитор: 1000 мкМ соединения вызывали уменьшение ответа на $34 \pm 10\%$ ($n = 7$).

Мемантин

Единственный применяемый в клинике блокатор NMDA-рецепторов [33], мемантин, не оказывал действия на гомомеры ASIC1b в концентрациях ниже 100 мкМ. Однако в более высоких концентрациях мемантин проявил себя как слабый ингибитор. Так, мемантин в концентрации 300 мкМ ингибировал $19 \pm 6\%$ ($n = 5$) тока, а аппликация 1000 мкМ соединения приводила к снижению амплитуды ответа на $44 \pm 16\%$ ($n = 5$) относительно контроля (рис. 1Б). Поскольку

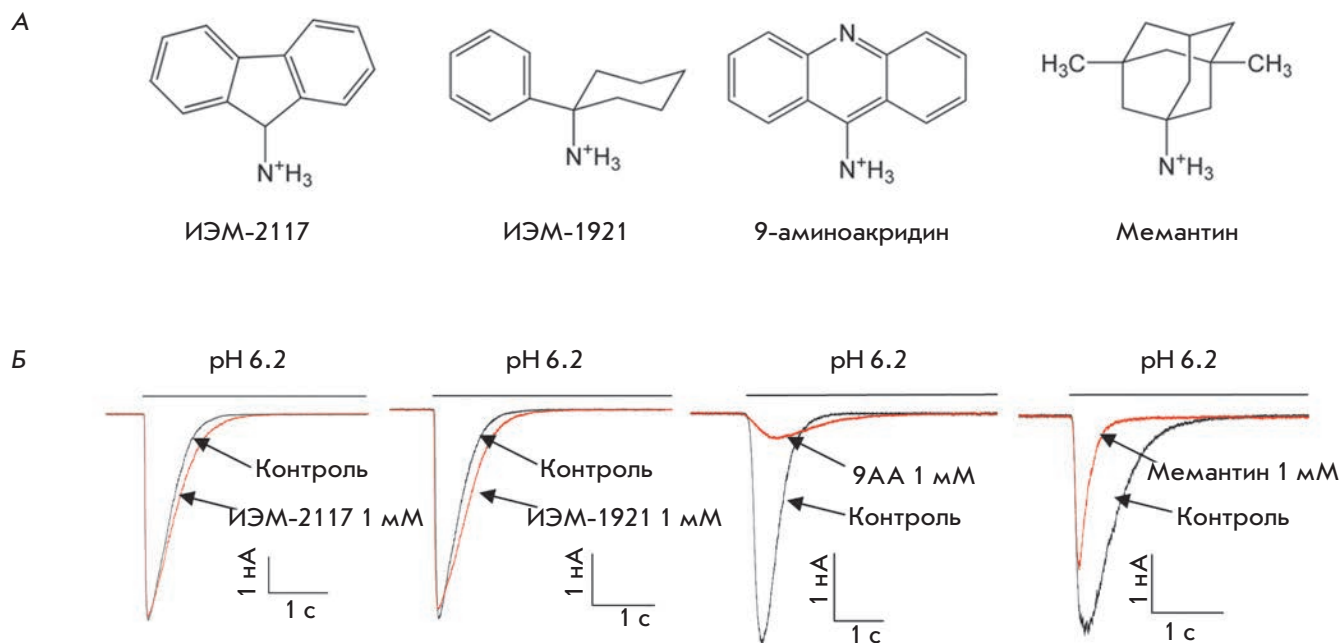


Рис. 1. Действие гидрофобных моноаминов на ASIC1b. А – химические структуры исследованных соединений. Б – примеры токов в контроле (черным) и в присутствии 1000 мкМ исследуемых соединений

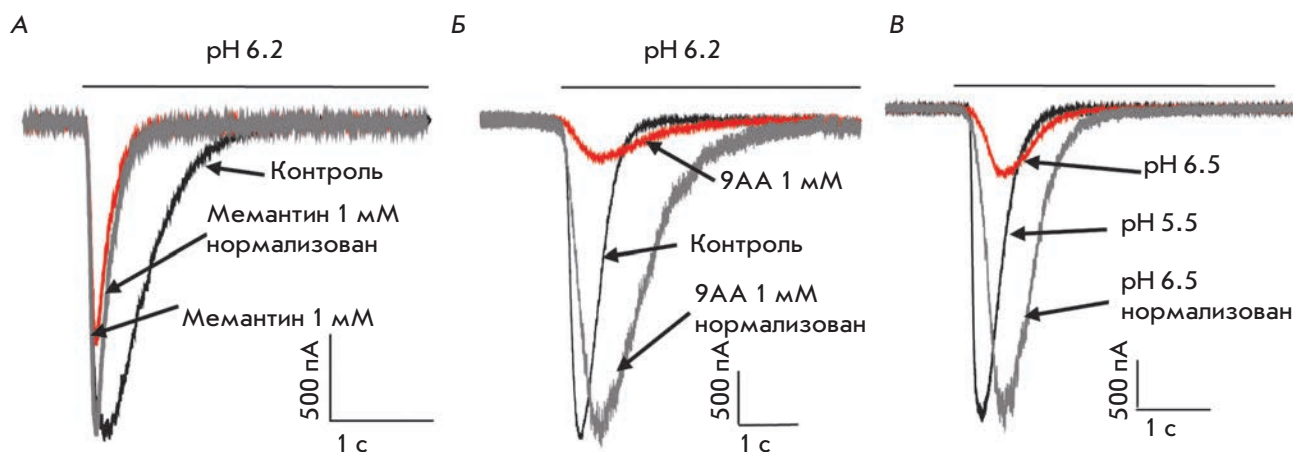


Рис. 2. Изменение кинетики ответа при действии 1000 мкМ мемантина (А) и 1000 мкМ 9АА (Б). Серая линия представляет ответ в присутствии ингибитора, нормализованный по амплитуде до уровня контрольного ответа. Видно, что мемантин, будучи слабым ингибитором, сильно уменьшает постоянную времени спада тока, что выглядит как резкое сужение ответа. 9АА, напротив, расширяет ответ за счет увеличения этой постоянной. В – примеры токов в ответ на более низкую (красный) и более высокую (черный) концентрацию протонов. При нормализации (серый) ответов по амплитуде видно расширение ответа как и в случае с 9АА (Б)

насыщающая концентрация соединения не была достигнута, измерить параметр IK_{50} не представлялось возможным. Помимо ингибирующего эффекта, 1000 мкМ мемантина вызывали уменьшение постоянной времени спада ответа с 0.50 ± 0.12 с ($n = 6$) до 0.15 ± 0.02 с ($n = 5$) (рис. 2А). Подобное изменение

формы ответа наблюдалось нами ранее и для гомомеров ASIC1a.

9-аминоакридин

9АА оказался наиболее активным ингибитором ASIC1b-каналов. 1000 мкМ 9АА снижали амплитуду

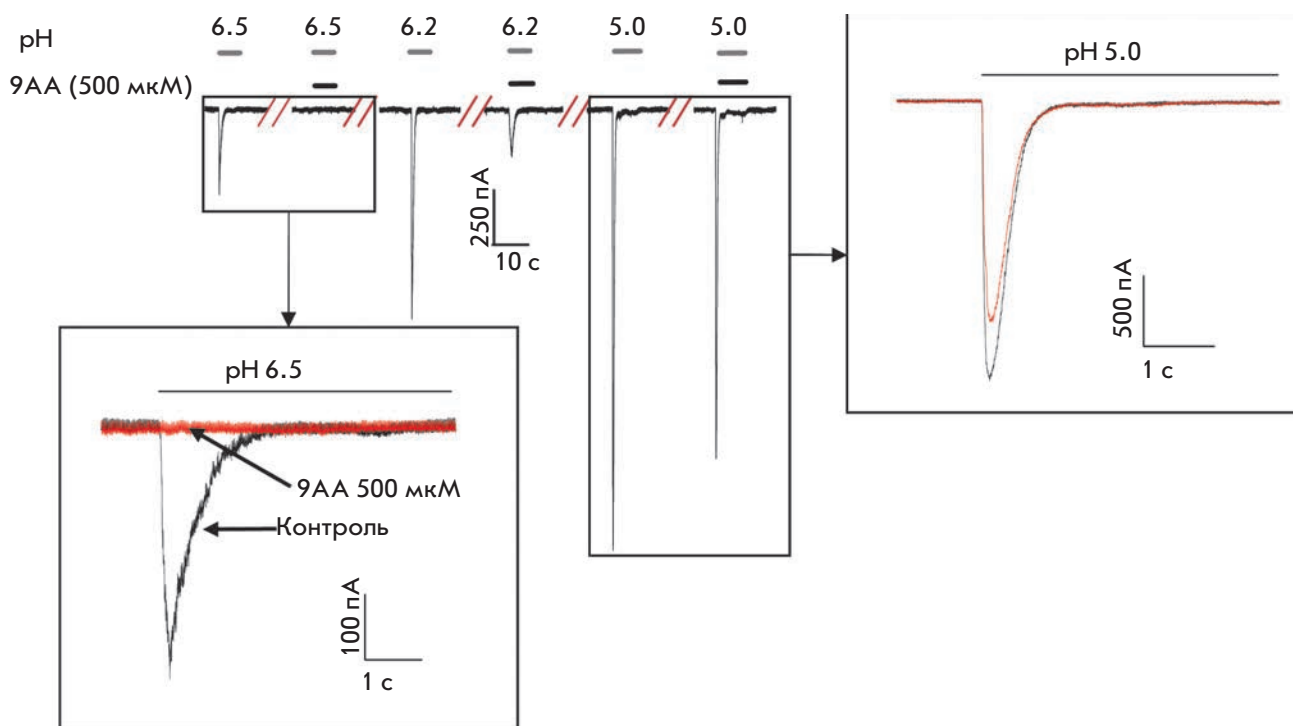


Рис. 4. Действие 9AA на каналы ASIC1b в зависимости от уровня их активации. Примеры токов через ASIC1b-каналы в ответ на разные pH в отсутствие и в присутствии 500 мкМ 9AA. В блоках вынесены увеличенные наложения токов при предъявлении раствора с pH 6.5 (нижний блок) и с pH 5.0 (правый блок). Видно, что при низкой концентрации агониста (pH 6.5) процент ингибирования достигает практически 100% (красная линия). При насыщающей концентрации агониста (pH 5.0) ингибирующий эффект резко снижается

Поскольку действие 9-аминоакридина на гомомеры ASIC1a характеризовалось выраженной pH-зависимостью (ослабление ингибирования при уменьшении значения активирующего pH), мы решили проанализировать этот эффект и на ASIC1b-каналы. В условиях относительно низкой концентрации протонов (pH 6.5) наблюдалось практически полное подавление ответа (на $92 \pm 3\%$, $n = 7$). При более сильном закислении (pH 5.0) выраженность эффекта снижалась до $28 \pm 8\%$ ($n = 5$) (рис. 4). Это обстоятельство свидетельствует в пользу гипотезы о снижении сродства протонов к рецептору как возможному механизму действия 9AA на ASIC1b-каналы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как и можно было предполагать, действие гидрофобных моноаминов на гомомеры ASIC1b во многом напоминает их действие на гомомеры ASIC1a. Производное фенилциклогексила ИЭМ-1921 никак не влияло на активность обоих каналов. Мемантин и 9AA оказывали выраженное ингибирующее действие при совместной аппликации с кислым раствором. Как и в случае с ASIC1a, мемантин не только

снижал амплитуду ответа, но и сильно уменьшал постоянную времени спада тока. 9AA оказался наиболее активным ингибитором: в концентрации 1000 мкМ вызывал $86 \pm 10\%$ ($n = 7$) ответа через ASIC1b и $77 \pm 9\%$ ($n = 6$) через ASIC1a. Действие 9AA характеризовалось выраженной pH-зависимостью в обоих случаях – ингибирующий эффект заметно уменьшался в условиях насыщающей концентрации агониста. Только ИЭМ-2117 показал некоторую субъединичную специфичность и не ингибировал гомомеры ASIC1b. Несмотря на небольшие различия в действии исследованных соединений на два родственных гомомера, можно заключить, что альтернативный сплайсинг не оказывает прямого влияния на действие гидрофобных моноаминов.

Сделать окончательные выводы о механизме действия исследованных соединений на ASIC-каналы на данном этапе не представляется возможным. Вероятно, существуют различия в механизмах действия мемантина и 9AA, поскольку эти соединения по-разному меняют форму ответа на закисление (рис. 2А,Б). Действие мемантина (уменьшение постоянной времени спада) напоминает действие блокато-

ров открытого канала или промоторов десенситизации. Действие 9AA связано, возможно, с изменением сродства к протонам. Аргументами в пользу этой гипотезы являются: (1) корреляция между коэффициентами Хилла для активации каналов и их ингибирования 9AA (рис. 3А,В) и (2) аналогия между изменением формы ответа в присутствии 9AA и при активации канала небольшим закислением (рис. 2Б,В). Для более точных выводов о механизмах и сайтах связывания гидрофобных моноаминов с ASICs требуются дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе в дополнение к полученным ранее результатам мы показали, что классические блокаторы NMDA-рецепторов способны модулировать работу всех функционально активных гомомеров ASIC, и направленность эффекта зависит от субъединичного состава рецептора. Важно отметить, что все исследованные соединения имеют крайне простую химическую структуру, состоящую из одной аминогруппы и гидрофобного «ядра». Такая структура в корне отличается от амидин-содержащих производных амилорида и других

известных модуляторов протон-активируемых ионных каналов. Этот факт позволяет отнести гидрофобные моноамины к новому классу лигандов ASICs. Кроме того, это позволяет предположить, что ASICs могут служить мишенью для многих уже используемых в клинике лекарств (например, трициклических антидепрессантов, некоторых психотропных соединений), а также для эндогенных моноаминов и их производных. Последнее предположение крайне важно для определения физиологической роли протон-активируемых ионных каналов в ЦНС. Как сказано выше, ASICs имеют высокий уровень экспрессии во всех наиболее значимых для жизнедеятельности отделах мозга. Однако диапазон pH, в котором эти каналы активируются, не реализуется в нормальных физиологических процессах. Следовательно, высока вероятность существования эндогенных активаторов/модуляторов этих каналов. Поиск таких эндогенных аминов представляется перспективным. ●

Работа поддержана РФФИ (гранты № 14-04-31861 мол_а, 13-04-00724) и программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Du J., Reznikov L.R., Price M.P., Zha X.-M., Lu Y., Moninger T.O., Wemmie J.A., Welsh M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 24. P. 8961–8966.
- Deval E., Gasull X., Noël J., Salinas M., Baron A., Diochot S., Lingueglia E. // *Pharmacol. Ther.* 2010. V. 128. № 3. P. 549–558.
- Jasti J., Furukawa H., Gonzales E.B., Gouaux E. // *Nature*. 2007. V. 449. № 7160. P. 316–323.
- Alvarez de la Rosa D., Zhang P., Shao D., White F., Canessa C.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 4. P. 2326–2331.
- Baron A., Waldmann R., Lazdunski M. // *J. Physiol.* 2002. V. 539. № 2. P. 485–494.
- Bolshakov K.V., Essin K.V., Buldakova S.L., Dorofeeva N.A., Skatchkov S.N., Eaton M.J., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. // *Neuroscience*. 2002. V. 110. № 4. P. 723–730.
- García-Añoveros J., Derfler B., Neville-Golden J., Hyman B.T., Corey D.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 4. P. 1459–1464.
- Lingueglia E., de Weille J.R., Bassilana F., Heurteaux C., Sakai H., Waldmann R., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 47. P. 29778–29783.
- Price M.P., Snyder P.M., Welsh M.J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 14. P. 7879–7882.
- Wemmie J.A., Askwith C.C., Lamani E., Cassell M.D., Freeman J.H., Welsh M.J. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 13. P. 5496–5502.
- Price M.P., Lewin G.R., McIlwrath S.L., Cheng C., Xie J., Heppenstall P.A., Stucky C.L., Mannsfeldt A.G., Brennan T.J., Drummond H.A., et al. // *Nature*. 2000. V. 407. № 6807. P. 1007–1011.
- Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J. // *Trends Neurosci.* 2006. V. 29. № 10. P. 578–586.
- Wemmie J.A., Chen J., Askwith C.C., Hruska-Hageman A.M., Price M.P., Nolan B.C., Yoder P.G., Lamani E., Hoshi T., Freeman J.H., et al. // *Neuron*. 2002. V. 34. № 3. P. 463–477.
- Wemmie J.A., Coryell M.W., Askwith C.C., Lamani E., Leonard A.S., Sigmund C.D., Welsh M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 10. P. 3621–3626.
- Kreple C.J., Lu Y., Taugher R.J., Schwager-Gutman A.L., Du J., Stump M., Wang Y., Ghobbeh A., Fan R., Cosme C.V., et al. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. № 8. P. 1083–1091.
- Ziemann A.E., Allen J.E., Dahdaleh N.S., Drebot I.I., Coryell M.W., Wunsch A.M., Lynch C.M., Faraci F.M., Howard M.A., Welsh M.J., et al. // *Cell*. 2009. V. 139. № 5. P. 1012–1021.
- Escoubas P., De Weille J.R., Lecoq A., Diochot S., Waldmann R., Champigny G., Moinier D., Ménez A., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 33. P. 25116–25121.
- Diochot S., Baron A., Rash L.D., Deval E., Escoubas P., Scanzello S., Salinas M., Lazdunski M. // *EMBO J.* 2004. V. 23. № 7. P. 1516–1525.
- Baron A., Diochot S., Salinas M., Deval E., Noël J., Lingueglia E. // *Toxicon*. 2013. V. 75. P. 187–204.
- Waldmann R., Champigny G., Bassilana F. // *Nature*. 1997. V. 386. № 6621. P. 173–177.
- Kellenberger S., Schild L. // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. № 3. P. 735–767.
- Chen X., Orser B.A., MacDonald J.F. // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. V. 648. № 1–3. P. 15
- Kuduk S.D., Chang R.K., Wai J.M.-C., Di Marco C.N., Cofre V., DiPardo R.M., Cook S.P., Cato M.J., Jovanovska A., Urban M.O., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. V. 19. № 15. P. 4059–4063.
- Yu Y., Chen Z., Li W., Cao H., Feng E., Yu F., Liu H., Jiang H., Xu T. // *Neuron*. 2010. V. 68. P. 61–72.
- Benveniste M., Mayer M.L. // *J. Physiol.* 1995. V. 483. № 2. P. 367–384.

26. Rogawski M.A., Thurkauf A., Yamaguchi S., Rice K.C., Jacobson A.E., Mattson M.V. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989. V. 249. № 3. P. 708–712.
27. Bolshakov K.V., Kim K.H., Potapjeva N.N., Gmiro V.E., Tikhonov D.B., Usherwood P.N.R., Mellor I.R., Magazanik L.G. // *Neuropharmacology.* 2005. V. 49. № 2. P. 144–155.
28. Bormann J. // *Eur. J. Pharmacol.* 1989. V. 166. № 3. P. 591–592.
29. Barygin O.I., Gmiro V.E., Kim K., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 451. № 1. P. 29–33.
30. Bolshakov K.V., Gmiro V.E., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. // *J. Neurochem.* 2003. V. 87. № 1. P. 56–65.
31. Tikhonova T.B., Nagaeva E.I., Barygin O.I., Potapieva N.N., Bolshakov K.V., Tikhonov D.B. // *Neuropharmacology.* 2015. V. 89. P. 1–10.
32. Hesselager M., Timmermann D.B., Ahring P.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 12. P. 11006–11015.
33. Chen H.S.V., Pellegrini J.W., Aggarwal S.K., Lei S.Z., Warach S., Jensen F.E., Lipton S.A. // *J. Neurosci.* 1992. V. 12. № 11. P. 4427–4436.

УДК 579.246:579.61

Ингибиторы образования биопленок бактериями *Bacillus subtilis* на основе тиопроизводных 2(5H)-фуранона

Е. Ю. Тризна^{1*}, Э. Н. Хакимуллина¹, Л. З. Латыпова¹, А. Р. Курбангалиева¹,
И. С. Шарафутдинов¹, В. Г. Евтюгин¹, Э. В. Бабынин¹, М. И. Богачев², А. Р. Каюмов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

²Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5

*E-mail: trizna91@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2014

После доработки 09.02.2015

РЕФЕРАТ Грамположительные бактерии вызывают широкий спектр инфекционных заболеваний, в том числе и внутрибольничные инфекции. В составе биопленки бактерии становятся устойчивыми к антибиотикам и иммунной системе человека, что вызывает трудности при лечении и определяет необходимость разработки ингибиторов формирования биопленки. Бактерии *Bacillus subtilis* широко используются в качестве модельного организма для изучения образования биопленок. Изучено влияние новых синтезированных 2(5H)-фуранонов на формирование биопленок клетками бацилл. Из 57 проверенных соединений образование биопленки подавляли серусодержащие производные 2(5H)-фуранона F12, F15 и F94, взятые в концентрации 10 мкг/мл. Показано, что F12 и F94 подавляли биосинтез GFP с промотора оперона *eps*, кодирующего гены синтеза экзополисахарида биопленки (EPS). Методом дифференциального флуоресцентного окрашивания установлено, что в присутствии F12, F15 и F94 значительно повышается чувствительность клеток бацилл к воздействию антибиотиков (канамицин и хлорамфеникол). Максимальный эффект оказывал F12. F15 разрушал уже сформированную биопленку и значительно повышал чувствительность бактерий к антибиотикам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибактериальная активность, биопленки, 2(5H)-фураноны, *Bacillus subtilis*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МПК – минимальная подавляющая концентрация; МБПК – минимальная концентрация, подавляющая образование биопленки.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время показано, что большинство бактерий существуют в природе в виде специфически организованных биопленок. Биопленки представляют собой тесно адгезированное к субстрату сообщество дифференцированных микробных клеток, заключенных в полисахаридный матрикс (EPS). Такая форма существования предоставляет бактериям ряд преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина. Это приводит к повышению эффективности биотехнологических процессов, с одной стороны, а с другой, к повышению устойчивости к противомикробным веществам, антисептикам и дезинфектантам, рефрактерности к лечению, что в результате приводит к увеличению частоты внутрибольничных инфекций, создает трудности в микробиологической диагностике инфекционных заболеваний [1–3]. Таким образом, биопленки представляют серьезную проблему и тре-

буют разработки препаратов, разрушающих бактериальные биопленки и подавляющих их образование на предметах медицинского назначения. Бациллы, грамположительные спорообразующие палочки, например *Bacillus anthracis* и *B. cereus*, вызывающие сибирскую язву и тяжелые пищевые токсикоинфекции, также образуют биопленки на различных поверхностях [1]. В качестве модельного объекта для изучения бациллярных биопленок широко используют клетки *B. subtilis* [1].

В настоящее время для борьбы с бактериальными биопленками применяют покрытие поверхностей частицами серебра, иммобилизованными ферментами, разрушающими матрикс биопленки, а также различные низкомолекулярные вещества – ингибиторы генов образования биопленок [4]. Среди таких соединений особое место занимают вещества 2(5H)-фуранонового ряда [5], первоначально выделенные из красной морской водоросли *Delisea pulchra*.

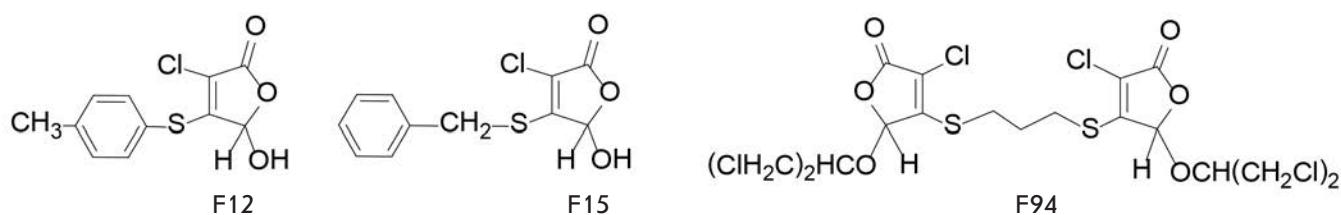


Рис. 1. Структурные формулы фуранонов, подавляющих образование биопленок *B. subtilis* при концентрации 10 мкг/мл

Таблица 1. Минимальные концентрации фуранонов, подавляющие рост и образование биопленок клетками *B. subtilis* 168, цито- и генотоксические свойства соединений

Фуранон	Минимальная подавляющая концентрация (МПК), мкг/мл	Минимальная концентрация, подавляющая образование биопленок (МБПК), мкг/мл	CC ₅₀ для клеток MCF7, мкг/мл	Генотоксичность соединений (превышение над контролем, разы/количество клеток)	
				Тест Эймса*	SOS-хромотест*
F12	25	10	36.9	2.4 (109 ± 25.2)	0.69
F15	25	10	65.7	3.1 (133 ± 25.4)	0.61
F94	50	10	83.9	0.9 (41 ± 4.4)	1.09
Контроль**	–	–	–	1.0 (45 ± 3.5)	1.00
Позитивный контроль***	–	–	–	8.2 (369 ± 15.6)	22.71

*Генотоксичность определяли при концентрации фуранонов 10 мкг/мл, что соответствует их МБПК.

**Диметилсульфоксид в количестве, вносимом в виде раствора фуранона.

***Азид натрия (3 мкг/мл) в тесте Эймса и митомицин С (0.1 мкг/мл) в SOS-хромотесте.

Таблица 2. Влияние фуранонов на толщину биопленки клеток *B. subtilis*

Фуранон	Толщина биопленки, мкм	
	Культивирования с предварительными внесенными фуранонами, 96 ч	Добавление фуранонов к сформированной биопленке с последующей инкубацией в течение 24 ч
Контроль	10 ± 1.6	10 ± 1.3
F12	4 ± 0.4	6 ± 0.3
F15	2 ± 0.3	4 ± 0.2
F94	4 ± 0.6	8 ± 0.7

Показано, что производные фуранонов обладают антимикробным действием в отношении большого числа грамположительных и грамотрицательных бактерий и подавляют образование ими биопленок [5, 6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Фураноны

На рис. 1 представлены структурные формулы исследованных соединений: F12 – 5-гидрокси-4-[(4-

метилфенил)сульфанил]-3-хлор-2(5H)-фуранон [7], F15 – 4-бензилсульфанил-5-гидрокси-3-хлор-2(5H)-фуранон [8] и F94 – 1,3-бис[3-хлор-5-(1,3-дихлорпропан-2-илокси)-2(5H)-фуранон-4-илсульфанил]пропан [9], синтезированы по известным методикам.

Штаммы и условия культивирования

В работе использовали следующие штаммы: *B. subtilis* 168 [10]; *B. subtilis* K511 [11], несущий ген *gfp* под контролем промотора гена *epsA*, активного при образовании биопленок у бацилл.

Для проверки мутагенности соединений использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA100 (*HisG46, rfa, uvr-, pkm 101, bio-*) [12] и *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 [13].

Все бактериальные штаммы культивировали в среде LB (триптон – 1.0 г/л; дрожжевой экстракт – 0.5 г/л; NaCl – 0.5 г/л; pH 8.5) [14]. Образование биопленок бациллами определяли с использованием среды BM (Basal medium), представляющей модифицированную среду SMM [15], с внесением пептона до 7 г/л.

Окрашивание биопленок кристаллическим фиолетовым

Образование биопленок анализировали в 96-луночных пластиковых планшетах (Cellstar Grenier bio-one No. 655 180) методом окрашивания кристаллическим фиолетовым. Бактерии выращивали без качания при 37°C на среде BM в лунках, содержащих по 200 мкл культуры бактерий начальной плотностью 3×10^7 КОЕ/мл. Через 72 ч культивирования удаляли культуральную жидкость, однократно промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) pH 7.4 и просушивали в течение 20 мин. Вносили 150 мкл 0.1% раствора кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich) в 96% этаноле, инкубировали в течение 20 мин. Несвязавшийся краситель смывали PBS. Связавшийся краситель элюировали в 150 мкл 96% этилового спирта и измеряли поглощение при длине волны 570 нм на микропланшетном ридере Tecan infinite 200 Pro (Швейцария). В качестве контроля использовали лунки, в которых клетки не инкубировали, но проводили все манипуляции процесса окрашивания.

Определение минимальной подавляющей концентрации

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) фуранонов определяли методом микро-разведений в среде BM. Концентрации фуранонов после серийных разведений составляли 0.1–500 мкг/мл. Лунки засеивали 200 мкл бактериальной культуры (3×10^7 КОЕ/мл) в среде BM и инкубировали при 37°C. Минимальную подавляющую концентрацию определяли как наименьшую концентрацию фуранона, при которой отсутствовал видимый рост бактерий к 24 ч инкубации. Минимальную концентрацию, подавляющую образование биопленок (МБПК), определяли как наименьшую концентрацию фуранонов, которая полностью подавляла образование биопленок через 72 ч роста.

Определение гено- и цитотоксичности фуранонов

Мутагенность фуранонов в концентрации МБПК оценивали в тесте Эймса [12]. В качестве отрицатель-

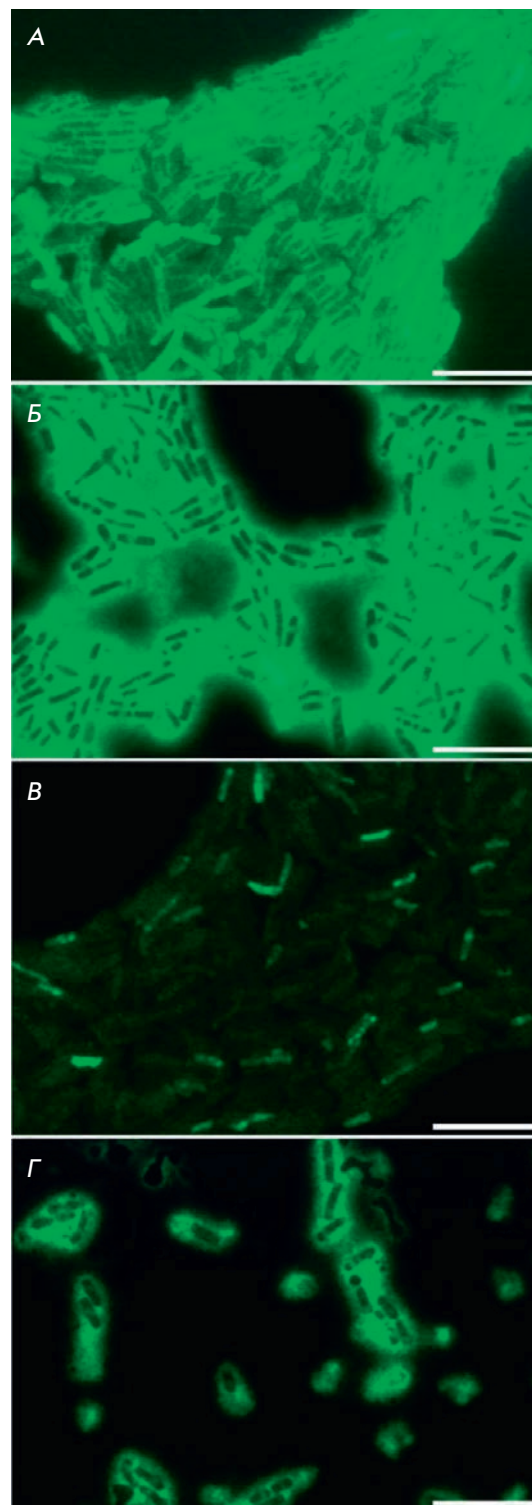


Рис. 2. Влияние фуранонов на интенсивность свечения GFP, экспрессируемого с промотора оперона *eps* в клетках *B. subtilis* K511. Клетки выращивали в течение 72 ч в присутствии F12 (Б), F15 (В), F94 (Г) в концентрации 10 мкг/мл (соответствует МБПК). Контроль (А) – культура, выращенная в отсутствие фуранонов. Масштабная черта 10 мкм

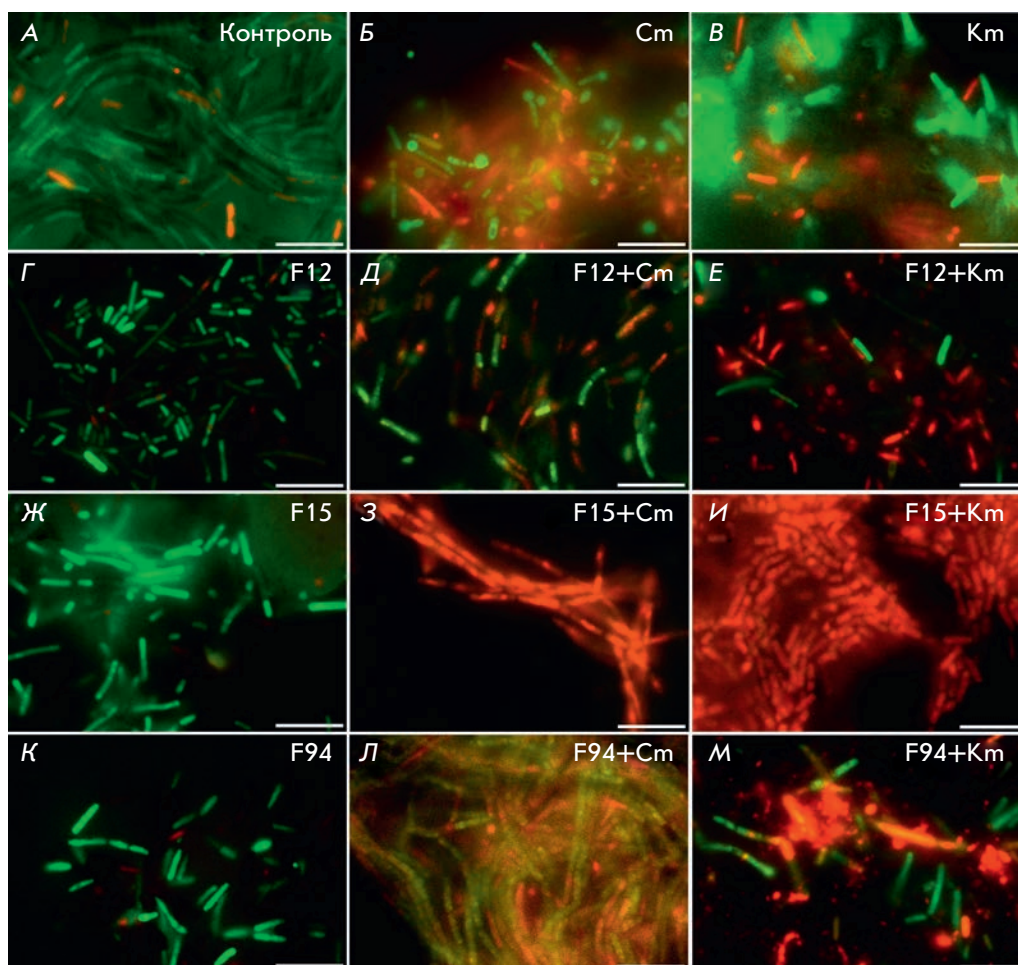


Рис. 3. Влияние фуранонов на образование биопленки бактериями *B. subtilis* и чувствительность к антибиотикам клеток *B. subtilis*, адгезированных на поверхности культуральной чашки. Клетки *B. subtilis* 168 выращивали в течение 72 ч для формирования биопленки (А, Б, В) в присутствии фуранонов (Г, Ж, К) в концентрации 10 мкг/мл (соответствует МБПК), затем вносили хлорамфеникол (См) (Д, З, Л) или канамицин (Км) (Е, И, М). Количество жизнеспособных клеток через 24 ч инкубации с антибиотиком оценивали путем окрашивания клеток йодидом пропидия и флуоресцеиндицетатом. Масштабная черта 10 мкм

ного контроля использовали растворитель диметилсульфоксид (ДМСО), в качестве положительного – азид натрия (NaN_3). Тестируемое вещество считали мутагенным, если число колоний-ревертантов в опыте более чем в 2 раза превышало их число в контроле (растворителе). ДНК-повреждающую активность соединений оценивали в SOS-хромотесте на штамме *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 [13]. Ночную культуру бактерий разводили в среде LB в 10 раз и растили в течение 4 ч в присутствии исследуемых соединений. Затем клетки собирали центрифугированием и определяли в них активность β -галактозидазы согласно [16]. Цитотоксичность веществ определяли на клетках линии MCF7 с помощью метаболического MTS-теста (Promega). Рассчитывали коэффициент цитотоксичности CC_{50} (концентрация вещества, при которой активность снижается в 2 раза).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами ранее были идентифицированы галоген- и серусодержащие производные 2(5H)-фуранона, по-

давливающие образование биопленок *B. subtilis* [6]. Дополнительный скрининг 56 соединений позволил идентифицировать дополнительно два фуранона (F15 и F94), в концентрации 10 мкг/мл подавляющих образование биопленки клетками бацилл (табл. 1). Ф2 и Ф8 (5-гидрокси-4-[(4-метилфенил)-сульфанил]-3-хлор-2(5H)-фуранон и 3,4-дихлор-5-(1,3-дихлорпропан-2-илокси)-2(5H)-фуранон соответственно), охарактеризованные в работе [6], повышали активность системы генетической компетентности бацилл и не были включены в дальнейшее исследование. F15 и F94 не повышали активность фактора транскрипции ComA, активирующего систему развития генетической компетентности бацилл (не показано).

Чтобы установить влияние фуранонов на уровень экспрессии оперона *eps*, кодирующего гены синтеза экзополисахарида биопленки, клетки *B. subtilis* K511, несущие ген *gfp* под контролем промотора гена *epsA*, выращивали в среде ВМ в течение 72 ч в присутствии и в отсутствие фуранонов и анали-

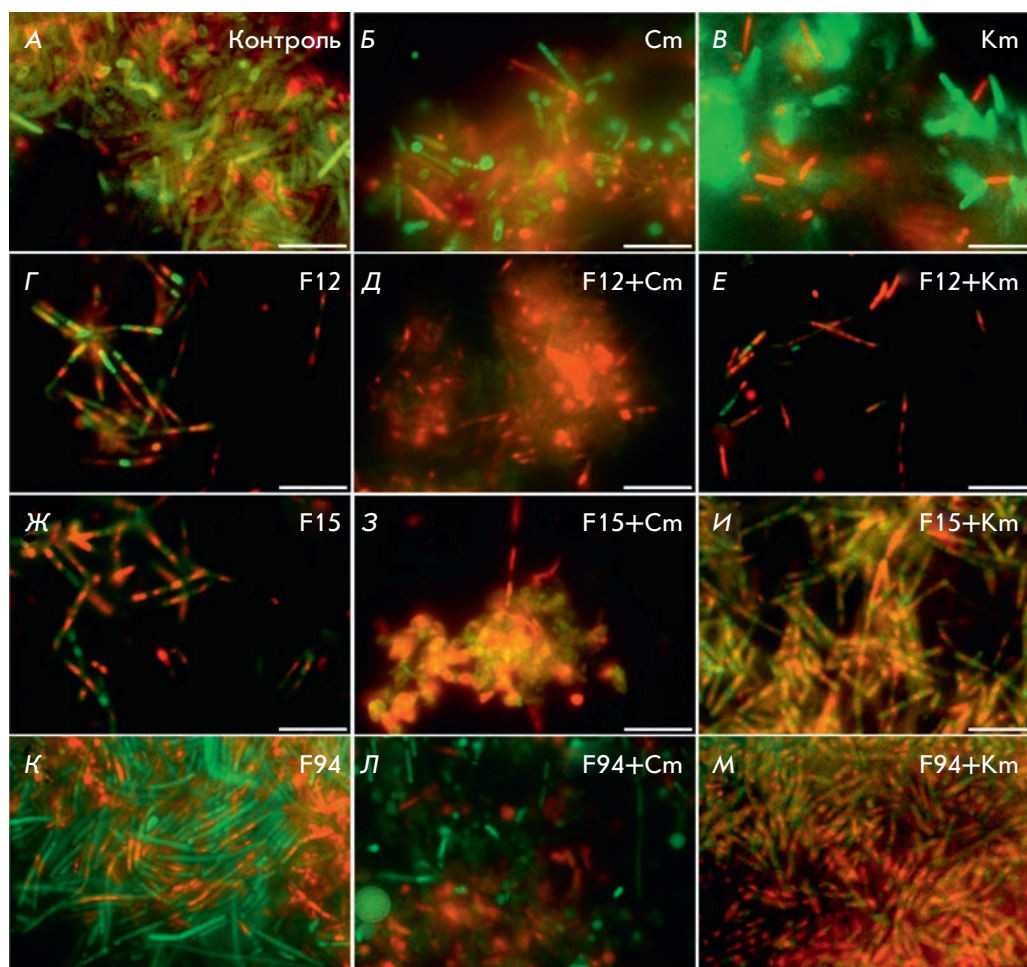


Рис. 4. Фураноны разрушают биопленку и повышают эффективность антибиотиков против клеток *B. subtilis* в составе сформированной биопленки. Клетки *B. subtilis* 168 выращивали в течение 72 ч для формирования биопленки (А, Б, В), затем вносили фураноны до конечной концентрации 30 мкг/мл (трехкратное превышение МБПК) в присутствии хлорамфеникола (См) (Д, З, Л) или канамицина (Км) (Е, И, М). Количество жизнеспособных клеток через 24 ч инкубации с антибиотиком оценивали, окрашивая клетки йодидом пропидия и флуоресцеиндицетатом. Масштабная черта 10 мкм

зировали на флуоресцентном микроскопе (рис. 2). Выявление GFP в клетках в отсутствие фуранонов свидетельствовало об экспрессии оперона *eps* и образовании клетками экзополисахарида – основы матрикса биопленки (рис. 2А). В присутствии фуранонов F12 и F94 GFP не идентифицировался, что говорит о репрессии образования экзополисахарида и, как следствие, о подавлении образования биопленки в присутствии данных соединений (рис. 2Б,Г). По всей видимости, молекулярными мишенями этих соединений являются регуляторные пути адаптации организмов к стрессовым условиям. Так, показано, что F12 ингибирует активность факторов транскрипции *Spo0A* и *TnrA* [6]. Напротив, GFP выявляется и в присутствии F15, но в значительно меньшем количестве по сравнению с контролем, следовательно, подавления оперона *eps* не происходило. Вероятно, соединение F15 ингибирует образование биопленки другим путем, не затрагивая регуляцию оперона *eps*.

Фураноны повышают чувствительность адгезированных клеток к антибиотикам

Известно, что противомикробные средства малоэффективны против бактерий в составе биопленки. Предположительно, подавление образования биопленки должно повышать эффективность антибиотических препаратов. Потенциальный синергизм фуранонов с антибиотиками изучали методом «шахматной доски», где концентрации фуранона и антибиотика (канамицин и хлорамфеникол) варьировали от 0.1 до 2.0 МПК [17]. Однако ни одно соединение не проявило синергизма с противомикробными препаратами в отношении планктонных клеток ($FIC = 1.2 \pm 0.21$).

Чтобы проверить, будут ли фураноны повышать чувствительность к антибиотикам бактерий, адгезированных на поверхностях, бациллы выращивали в среде ВМ в течение 72 ч в присутствии фуранонов в концентрации 10 мкг/мл (МБПК), затем вносили антибиотики (хлорамфеникол и канамицин) до конечных концентраций 10 мкг/мл (установленные

МПК составляли 2.5 мкг/мл). После 24 ч культивирования удаляли культуральную жидкость, биопленку промывали PBS и проводили дифференциальное флуоресцентное окрашивание йодидом пропидия и флуоресцеиндиацетатом для выявления соответственно мертвых и живых клеток в слое микробных клеток, адгезированных на поверхности культуральной чашки. Полученные препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axio Imager 2.0 (рис. 3).

В контрольной пробе наблюдали образование биопленки толщиной до 10 мкм (рис. 3А, табл. 2), при этом внесение хлорамфеникола (рис. 3В) или канамицина (рис. 3В) приводило к гибели лишь незначительной части адгезированных клеток. Напротив, в культуре, выращенной в присутствии F15 (10 мкг/мл), толщина биопленки составляла 2 мкм, и внесение антибиотика приводило практически к полной гибели бактерий (рис. 3З,И), тогда как сам фуранон не вызывал бактерицидного эффекта (рис. 3Ж). В случае F12 и F94 в концентрации 10 мкг/мл эффект был менее выражен. Таким образом, присутствие фуранонов в среде культивирования подавляло образование биопленки на поверхности культуральной чашки и повышало эффективность антибиотиков, по всей видимости, благодаря большей доступности бактериальных клеток для антимикробных соединений.

Также исследовали возможность разрушения бактериальной биопленки в присутствии фуранонов. С этой целью клетки бактерий выращивали в среде ВМ в течение 72 ч, удаляли культуральную жидкость и вносили чистую среду ВМ с добавлением фуранонов (30 мкг/мл), канамицина и хлорамфеникола. Через 24 ч остаточную биопленку промывали PBS и проводили дифференциальное флуоресцентное окрашивание (рис. 4).

В отсутствие фуранонов, как и в предыдущем опыте, антибиотики оказались малоэффективными против клеток, включенных в матрикс биопленки (рис. 4Б,В). Внесение F12 (30 мкг/мл) вызывало значительное разрушение биопленки через 24 ч

(табл. 2), добавление антибиотиков вызывало гибель подавляющего большинства клеток (рис. 4Г–Е). При этом эффект F15 был менее выражен, а F94 практически не повышал чувствительность клеток к антибиотикам и не вызывал разрушения биопленки (рис. 3Ж–М).

Цито- и генотоксические свойства соединений F12, F15 и F94

Определение цитотоксичности F12, F15 и F94 показало, что значения CC_{50} у них в 7 раз превышали концентрации, необходимые для подавления образования биопленок (табл. 1). Хотя SOS-хромотест не выявил ДНК-повреждающей активности у этих соединений, данные теста Эймса свидетельствовали о потенциальной мутагенности F12 и F15.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, серусодержащие фураноны F12 и F15 могут представлять интерес для дальнейшей разработки на их основе ингибиторов бактериальных биопленок. Однако потенциальная мутагенная активность этих фуранонов, выявленная в тесте Эймса, является противопоказанием для прямого использования и требует дальнейшей модификации структуры. ●

Данное исследование выполнено с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003).

Работа поддержана государственной программой повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров, Министерством образования и науки РФ (контракт № 2014/187) и РФФИ (грант № 14-04-31635 мол_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vlamakis H., Chai Y., Beaugregard P., Losick R., Kolter R. // Nat. Rev. Microbiol. 2013. № 11. P. 15–168.
- Каюмов А.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Костров С.В., Шарипова М.Р. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 557–563.
- Schmidt T., Ziganshin A.M., Nikolausz M., Scholwin F., Nelles M., Kleinstaub S., Pröter J. // Biomass Bioenergy. 2014. V. 69. P. 241–248.
- Ma Y., Xu Y., Yestrepesky B.D., Sorenson R.J., Chen M., Larsen S.D., Sun H. // PLoS One. 2012. P. 1–10.
- Lonn-Stensrud J., Landin M.A., Benneche T., Petersen F.C., Scheiel A.A. // J. Antimicrobial Chemotherapy. 2009. № 63. P. 309–316.
- Kayumov A.R., Khakimullina E., Sharafutdinov I., Trizna E., Latypova L., Hoang L., Margulis A., Bogachev M., Kurban-galiev A. // J. Antibiotics. 2014. № 143. doi:10.1038/ja.2014.143 (epub ahead of print)
- Kurbangaliev A.R., Devyatova N.F., Bogdanov A.V., Berd-nikov E.A., Mannafov T.G., Krivolapov D.B., Litvinov I.A., Chmutova G.A. // Phosphorus, Sulfur, Silicon, Relat. Elem. 2007. V. 182. № 3. P. 607–630.
- Латыпова Л.З., Сайгитбаталова Е.Ш., Чулакова Д.Р., Лодоч-никова О.А., Курбангалиева А.Р., Бердников Е.А., Чмутава Г.А. // Журн. орг. химии. 2014. Т. 50. Вып. 4. С. 532–545.
- Хоанг Т.Л., Хазиев Р.М., Зарипова А.Р., Курбангалиева А.Р., Чмутава Г.А. // Сб. тезисов III Всероссийской научной кон-

- ференции (с международным участием) «Успехи синтеза и комплексообразования». Москва, 21-25 апреля 2014. М.: РУДН, 2014. С. 205.
10. Kayumov A., Heinrich A., Sharipova M., Iljinskaya O., Forchhammer K. // *Microbiology*. 2008. V. 154. P. 2348–2355.
11. Kobayashi K. // *Mol. Microbiol.* 2008. № 69. P. 1399–1410.
12. Ames B.N., McCann J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1976. № 271. P. 5–13.
13. Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T., Shinagawa H. // *Mutat Res.* 1985. № 147. P. 219–229.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. P. 4–16.
15. Kayumov A., Heinrich A., Sharipova M., Iljinskaya O., Forchhammer K. // *Microbiology*. 2008. V. 154. P. 2348–2355.
16. Fedorova K., Kayumov A., Woyda K., Ilinskaja O., Forchhammer K. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 1293–1298.
17. Prichard M.N., Jr., Shipman C. // *Antiviral Res.* 1990. № 14. P. 181–206.

УДК 539.2 577 601

Применение атомно-силовой микроскопии для 3D-анализа результатов гибридизации нуклеиновых кислот на микрочипах

Е. В. Дубровин^{1*}, Г. В. Преснова², М. Ю. Рубцова², А. М. Егоров^{2,3}, В. Г. Григоренко², И. В. Яминский^{1,2}

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

³Российская медицинская академия последипломного образования, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

*E-mail: dubrovin@polly.phys.msu.ru

Поступила в редакцию 20.09.2014

После доработки 25.02.2015

РЕФЕРАТ Олигонуклеотидные микрочипы считаются в настоящее время одним из наиболее эффективных методов генодиагностики. Способность атомно-силовой микроскопии (АСМ) характеризовать трехмерную морфологию отдельных молекул, находящихся на поверхности носителя, позволяет использовать ее как эффективный инструмент 3D-анализа поверхности микрочипа для детекции нуклеиновых кислот. Высокое разрешение АСМ открывает потенциальные возможности для снижения порога детекции ДНК-мишени, повышения соотношения сигнал/шум. В представленной работе разработан подход к оценке результатов гибридизации нуклеиновых кислот, меченных золотыми наночастицами, на кремниевых микрочипах на основе АСМ-исследования поверхности как на воздухе, так и в жидкости, учитывающий их трехмерную структуру. Для количественной оценки результатов гибридизации предложен критерий, интерпретируемый как доля площади поверхности, занимаемой наночастицами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ДНК, атомно-силовая микроскопия, гибридизация, наночастицы золота, олигонуклеотидные микрочипы, β -лактамазы СТХ-М-типа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АСМ – атомно-силовая микроскопия; ГОПС – γ -глицидоксипропилтриметоксисилан; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Технология олигонуклеотидных микрочипов – относительно новый метод, который появился в середине 1990-х годов и основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов с нуклеиновыми кислотами-мишенями [1]. Этот метод позволяет анализировать одновременно фрагменты последовательностей большого количества нуклеиновых кислот и представляет собой мощный инструмент для клинической диагностики [2], определения чувствительности к лекарственным средствам [3], токсикологических исследований [4], а также применяется в других научных и научно-практических областях биологии и медицины [5].

ДНК-микрочип состоит из твердой подложки, на которой иммобилизовано большое количество олигонуклеотидных зондов известной последовательности.

Эти зонды способны гибридизоваться с комплементарными фрагментами молекул ДНК или РНК из анализируемого образца. Наиболее распространенный метод детекции результата гибридизации зонда с ДНК-мишенью – использование флуоресцентных красителей [6]. В качестве метки в технологии микрочипов применяют также радиоизотопы [7], ферменты [8] и наночастицы золота [9]. Наряду с флуоресцентной и оптической детекцией используют детекцию электрохимическую [10] и с помощью поверхностного плазмонного резонанса [11]. Поверхность микрочипов в последние годы активно изучают с помощью микроскопии высокого разрешения. Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) использовали для изучения поверхности микрочипов из стекла с олигонуклеотидными зонда-

ми, мечеными биотином и выявленными с использованием полимеров стрептавидина с пероксидазой и усиления на основе реакции восстановления серебра [12]. Было показано, что формирующиеся в процессе усиления наночастицы серебра адсорбируются на поверхности и отчетливо различимы на поверхности данным методом. Сканирующая электронная микроскопия была использована для регистрации гибридизации модельной одноцепочечной ДНК длиной 46 нуклеотидов в формате сэндвич. Для этого олигонуклеотидные зонды первого типа иммобилизовали на носителе, ДНК выявляли с использованием вторых олигонуклеотидных зондов, меченных наночастицами золота [13]. Для регистрации ДНК предложен простой способ подсчета числа частиц на единицу поверхности, что обеспечило высокую чувствительность метода и лучшее соотношение сигнал/шум по сравнению с использованием флуоресцентного зонда.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ), основанная на принципе работы профилометра – прибора для измерения неровностей поверхности, имеет приблизительно такое же латеральное разрешение, как и СЭМ, однако заметно превосходит ее по вертикальному разрешению. Кроме того, АСМ не требует вакуумного окружения для исследования образцов, позволяя изучать их в различных условиях: как на воздухе, так и в жидкости.

Следует отметить, что атомно-силовая микроскопия накопила большой опыт изучения адсорбированных на подложках молекул ДНК и РНК без использования каких-либо меток [14–16]. В ряде работ АСМ использовали как средство визуализации и анализа биоспецифических взаимодействий, таких, как связывание фрагментов бактериальных клеток из раствора с антителами [17], бактериофагов с клеткой-хозяином [18] и других взаимодействий рецептор–лиганд [19]. Описано применение АСМ для анализа топографии поверхности ДНК-микрочипов, что позволяло оптимизировать технологию их приготовления [20, 21]. Преимуществом метода является отсутствие специальной пробоподготовки поверхности микрочипов и относительно простая процедура сопряжения микрочипа с микроскопом для последующего анализа (например, в большинстве случаев достаточно просто прикрепить носитель на специальную магнитную шайбу). АСМ-анализ поверхностей ДНК-микрочипов после их экспонирования в анализируемый раствор позволил сделать вывод о гибридизации зонда с комплементарными ДНК-мишенями [22] или введенными в них наночастицами золота [23]. В ряде работ АСМ позволила выработать количественные критерии оценки гибридизации ДНК-мишени на поверхности микрочипа. Использование

количественного подхода при АСМ-анализе ДНК-микрочипов крайне важно, так как позволяет количественно сравнивать эффективность гибридизации, в том числе при значительно меньших (по сравнению с общепринятыми методами детектирования) концентрациях мишени. Например, в качестве количественного критерия использовалась высота слоя на поверхности биочипа, полученная в результате АСМ-нанолитографии [24]. В случае, когда гибридизованные мишени как-либо морфологически выделяются на поверхности, таким критерием может быть количество связавшихся ДНК-мишеней [25] или ассоциированных с ними наночастиц [26] на единицу поверхности. В настоящей работе мы развиваем основанный на использовании АСМ подход к исследованию поверхностей кремниевых олигонуклеотидных микрочипов после проведения гибридизации с возможностью количественного анализа ее результатов. Особенностью развиваемого подхода является учет суммарной площади, занимаемой связавшимися с поверхностью микрочипа мишенями (связанными с ними наночастицами).

Мы предполагали, что уникальная способность АСМ визуализировать одиночные мишени (наночастицы) на поверхности микрочипа и получать информацию об их высоте и других размерах позволит внести дополнительный основанный на морфологии критерий при отборе «истинных» мишеней и, таким образом, снизить порог обнаружения мишеней, повысить соотношение сигнал/шум, а также уменьшить количество материала, необходимого для изготовления микрочипов. В качестве модельных ДНК использовали нуклеиновые кислоты, кодирующие бактериальные β-лактамазы типа СТХ-М, которые отвечают за развитие устойчивости к цефалоспоринам у грамотрицательных бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний [27, 28].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Наночастицы золота получали по методу Френса, основанному на восстановлении золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия [29]. Размеры наночастиц золота определяли методом СЭМ в растровом сканирующем электронном микроскопе *Supra-40* (Carl Zeiss, Германия) со встроенным в колонну микроскопа детектором вторичных электронов *InLens*.

Для получения конъюгата стрептавидина с наночастицами золота стрептавидин (2 мг в 200 мкл 10 мМ К-фосфатном буфере pH 7.2) модифицировали 3.2 мг меркаптоянтарной кислоты в присутствии 3 мг карбодиимида в течение ночи при +4°C. После этого добавляли 10 мкл 10 мМ EDTA, перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, полученный раствор диализовали против фосфатного буфера

с EDTA. Доводили pH раствора коллоидного золота до 7.0 свежеприготовленным раствором Na_2CO_3 и добавляли стрептавидин, модифицированный меркаптоантарной кислотой. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре раствор центрифугировали (30 мин, 11000 об/мин, 4°C). Затем супернатант удаляли, осадок растворяли в 10 мМ К-фосфатном буфере pH 7.2.

Для идентификации нуклеиновых кислот, кодирующих β -лактамазы СТХ-М-типа, использовали зонд 5'-TTTTTTTTTTTTTTT-ATATCGCGGTGATCTGGCC-3'. Для контроля неспецифической гибридизации использовали зонд 5'-TTTTTTTTTTTTTTT-CTAGACAGCCACTCATA-3'. Эти зонды модифицировались аминогруппой на 5'-конце.

Аmplификацию генов β -лактамаз СТХ-М-типа размером 870 п.н. с одновременным включением биотина проводили методом ПЦР как описано в [30].

Поверхность кремниевых пластин очищали кислородной плазмой в установке реактивного ионного травления RDE-300 (Alcatel, Франция) в течение 30 мин. Затем поверхность кремния химически модифицировали [31]. Для этого кремний обрабатывали 10 мМ раствором 3-глицидопропилтриметоксисилана (ГОПС) в сухом толуоле в течение 12 ч при 80°C, затем отмывали и выдерживали при 100°C в течение 10 мин. Олигонуклеотидные зонды, модифицированные на 5'-конце аминогруппой, наносили на поверхность модифицированного кремния из растворов с концентрацией 20 пмоль/мкл в 0.25 М Na-фосфатном буфере, содержащем 0.3 М Na_2SO_4 . После иммобилизации блокировали свободные центры связывания белков на поверхности кремния в растворе, содержащем 1% БСА и 1% казеин в 10 мМ К-фосфатном буфере pH 7.2, содержащем 0.15 М NaCl. На олигонуклеотидном микрочипе проводили гибридизацию 1 нМ ДНК, меченой биотином, в буфере 0.05 М NaH_2PO_4 , 0.5 М NaCl, 0.005 М EDTA, pH 7.4 при температуре 45°C в течение 2 ч. Отмывку проводили 10 мМ К-фосфатным буфером pH 7.2, содержащим 0.15 М NaCl и 0.1% Твин 20. Затем микрочип инкубировали с раствором конъюгата стрептавидина с наночастицами золота в концентрации 40 нг/мл по белку в течение 45 мин при 37°C и отмывали.

В работе использовали атомно-силовой микроскоп Nanoscope IIIa (Digital Instruments, США) в режиме прерывистого контакта (tapping mode). Сканирование проводили на воздухе с использованием коммерческих кантилеверов frN10 («Микромаш», Эстония), в жидкости – кантилеверами NP-S1 (Veeco, США) с частотой сканирования 2.1 Гц, 512 × 512 точек. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программного

обеспечения Фемтоскан Онлайн (Центр перспективных технологий, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гибридизационный анализ на кремниевых микрочипах проводили с использованием олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на поверхности кремния, модифицированного γ -глицидоксипропилтриметоксисиланом (ГОПС). Структура олигонуклеотидного зонда для выявления нуклеиновых кислот, кодирующих β -лактамазы СТХ-М-типа, и контрольного зонда приведена в разделе «Экспериментальная часть». Реакцию гибридизации проводили с ДНК-мишенью размером 870 п.н., в которую вводили биотин в процессе ПЦР. Молекулы биотина в образовавшихся на носителе дуплексах выявляли конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота. В работе использовали наночастицы золота сферической формы размером 27 ± 3 нм. После проведения гибридизации и выявления дуплексов конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота поверхность микрочипов исследовали с помощью АСМ.

На рис. 1 представлены полученные в буфере АСМ-изображения поверхности микрочипов до и после гибридизации с мечеными золотыми наночастицами нуклеиновыми кислотами, кодирующими β -лактамазы СТХ-М-3. Морфологически

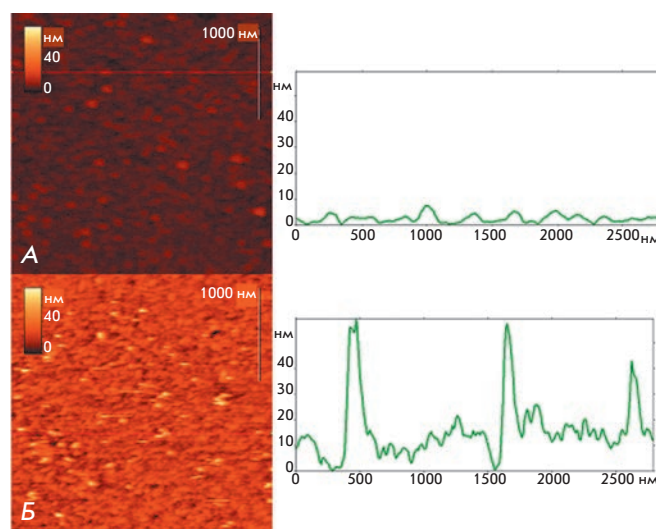


Рис. 1. АСМ-изображения поверхности микрочипов, полученные в буфере до (А) и после (Б) гибридизации с ДНК-мишенью, меченой биотином, и взаимодействия с конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота. Справа приведены вертикальные профили поверхности микрочипов вдоль линии, проведенной на соответствующем изображении слева

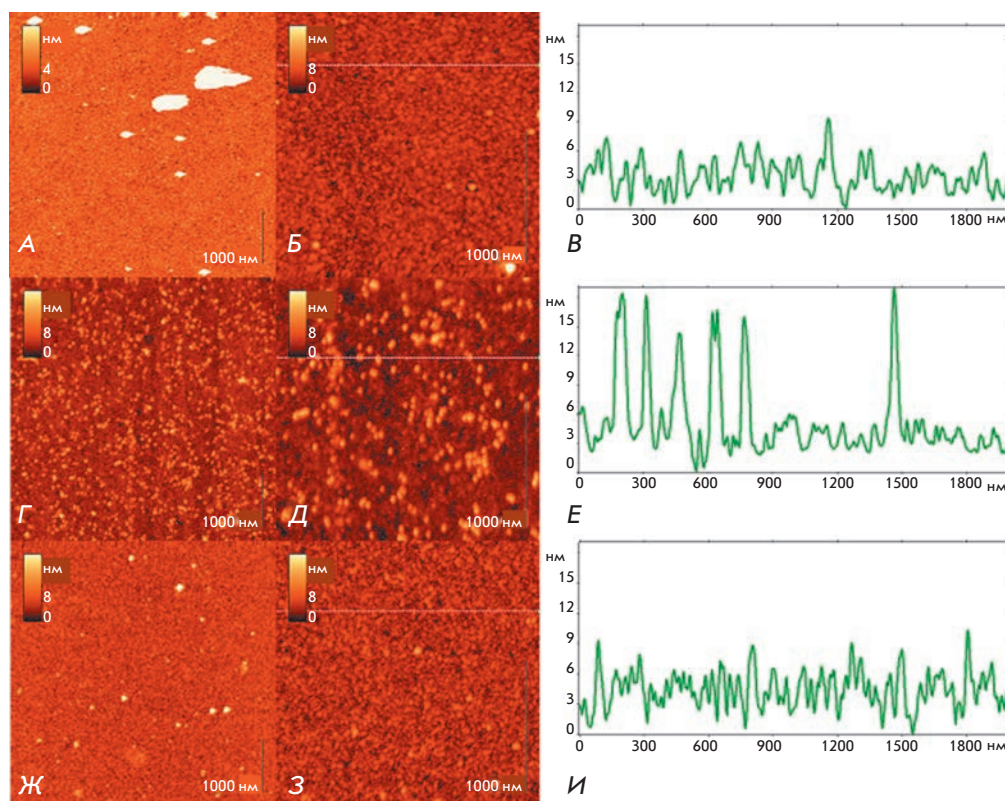


Рис. 2. АСМ-изображения и вертикальные профили поверхности кремниевых микрочипов. А–В — иммобилизованные олигонуклеотидные зонды на γ -ГОПС-модифицированном кремнии до экспонирования в анализируемый раствор; Г–Е — после экспонирования в анализируемый раствор ДНК-мишени и введения наночастиц в дуплексы; Ж–И — участки микрочипов без олигонуклеотидных зондов на поверхности после их экспонирования в анализируемый раствор ДНК-мишени и конъюгата стрептавидина с наночастицами золота

поверхность микрочипов с дуплексами ДНК состоит из плотно уложенных глобул диаметром 5–10 нм, которые представляют собой кремний, модифицированный γ -ГОПС и олигонуклеотидами. Сходные структуры наблюдали ранее в случае других олигонуклеотидных микроматриц на кремнии [22]. После гибридизации с меченой ДНК на этой поверхности появляются наночастицы, которые являются маркерами продуктов гибридизации. Их высота составляет 30–50 нм (рис. 1Б). Изображения наночастиц в жидкой среде нестабильны, нечетки и изобилуют многочисленными сбоями сканирования, что выражается в появлении светлых полос. Это, скорее всего, связано с тем, что наночастицы в составе ДНК плохо фиксированы на поверхности, поскольку в гибридизации участвует только небольшой участок нуклеиновой кислоты протяженностью 18 нуклеотидов из 870. В связи со слабой адгезией на поверхности высота наночастиц, измеряемая методом АСМ, превышала значение 27 ± 3 нм, полученное для этих частиц методом СЭМ. Выявление на поверхности микрочипов наночастиц золота в составе дуплексов ДНК является важным результатом, поскольку доказывает наличие связывания комплементарных участков ДНК и олигонуклеотидов *in situ*. Количественную оценку результатов гибридизации ДНК предпочтительней проводить после высушивания поверхно-

сти микрочипа, чтобы повысить стабильность АСМ-изображений золотых наночастиц.

Типичные АСМ-изображения и профиль поверхности олигонуклеотидных микрочипов до проведения гибридизации, полученные на воздухе, представлены на рис. 2А–В. В данном случае микрочип имеет однородную поверхность, состоящую из глобул высотой до 10 нм, на которой встречаются объекты случайной формы высотой до 330 нм (белые структуры на рис. 2А). Глобулярная поверхность в целом повторяет вид поверхности, наблюдавшейся в буфере (рис. 1А), при этом высокие объекты, вероятно, представляют собой примеси из буферных растворов, загрязнения из воздуха и появляются случайным образом в процессе приготовления микрочипов и проведения процесса идентификации ДНК. Метод АСМ позволяет напрямую контролировать общую площадь таких структур, которая мала по сравнению с рабочей поверхностью микрочипа.

Изображения поверхности микрочипов с дуплексами ДНК, мечеными золотыми наночастицами, представлены на рис. 2Г–Е. На них наблюдается большое количество отдельных сферических частиц высотой от 10 до 30 нм, а также их небольшие агрегаты, объединяющие до 10–15 частиц. Учитывая диаметр используемых нами золотых наночастиц (27 ± 3 нм) и возможность их частичного погруже-

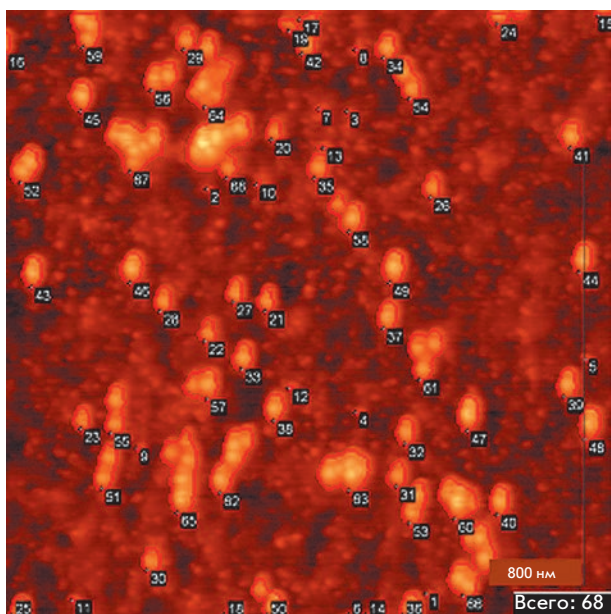


Рис. 3. Алгоритм выделения объектов на АСМ-изображении. Выделенные объекты обведены

ния в олигонуклеотидную матрицу при гибридизации зондов с ДНК-мишенями, можно интерпретировать наблюдаемые на АСМ-изображениях сферические частицы как золотые наночастицы – маркеры гибридизованных молекул ДНК.

Для контроля специфичности гибридизации и выявления дуплексов на рис. 2Ж–И приведены АСМ-изображения и профиль поверхности контрольной области микрочипа, на которую олигонуклеотидные зонды не наносились, при этом гибридизация с ДНК-мишенью с последующим введением золотых наночастиц производилась стандартным образом. На данных изображениях на фоне модифицированного γ -ГОПС кремния наблюдается небольшое (по сравнению с рис. 2Г–Е) количество объектов различного размера.

Для интерпретации результатов гибридизации зондов с мишенями, содержащими золотые наночастицы в качестве меток, мы разработали метод количественного анализа АСМ-изображений поверхности микрочипов. Суть его состоит в 3D-анализе поверхности микрочипа, т.е. в учете высот и площадей объектов, выявляемых на поверхности носителя после проведения всех стадий анализа. Метод АСМ позволяет получать информацию о высоте объекта с высокой точностью до долей нанометра, это позволяет отсортировать наблюдаемые на поверхности микрочипов объекты по высоте. Таким образом, становится возможным выявление результатов комплементарной гибридизации по высоте наночастиц,

используемых в качестве метки, в этом случае можно не учитывать неспецифически связавшиеся с поверхностью микрочипа объекты, имеющие меньшую высоту.

Для анализа АСМ-изображений, представленных на рис. 2А,Г,Ж, выделяли все наблюдаемые объекты. Математически суть такого выделения сводилась к поиску нулевого уровня фона на гистограмме как наиболее вероятного распределения высот всех 512×512 точек АСМ-изображения и построению пороговой плоскости, выше которой все части поверхности принимаются за объекты. В используемой нами программе обработки изображения (см. методику) данный алгоритм интегрирован в полуавтоматическую функцию. Все выделенные объекты характеризуются рядом легко вычисляемых геометрических характеристик, таких, как высота, площадь, объем, периметр, форм-фактор, отражающий форму объекта, и другие. На рис. 3 приведен пример автоматического выделения объектов на АСМ-изображении, содержащем золотые наночастицы.

Диапазон высот, внутри которого выделенные объекты будут считаться метками, выбирается индивидуально в каждой задаче, исходя из информации об используемых метках и особенностей строения микроматрицы. В качестве нижнего и верхнего предела этого фильтра мы использовали значения 10 и 30 нм. Выбор верхнего предела (30 нм) связан с известным из данных СЭМ распределением диаметра наночастиц золота 27 ± 3 нм. В связи с тем, что объекты, имеющие высоту свыше 30 нм, практически не наблюдались на АСМ-изображениях микрочипов после гибридизации с мечеными золотыми наночастицами ДНК-мишенями, мы не рассматривали возможность «вертикального» расположения агрегатов наночастиц на поверхности. Поскольку измеряемая с помощью АСМ высота объектов может быть занижена (в силу деформации поверхности кантилевером), а также, принимая во внимание возможное частичное погружение золотых наночастиц в олигонуклеотидную (и ГОПС-) матрицу, выбор нижней границы (10 нм) диапазона был сделан эмпирически на основе анализа нижней границы распределения высот наночастиц золота на соответствующем АСМ-изображении. В принципе, данный шаг (выбор диапазона высот фильтра) также можно алгоритмизировать, задавшись пороговым значением доли наблюдаемых объектов внутри данного диапазона по отношению ко всем наблюдаемым объектам на поверхности. На поверхностях с маленьким количеством примесей такое пороговое значение будет близко к единице, т.е. большинство наблюдаемых объектов будут соответствовать наночастицам (выбранный нами диапазон соответствует пороговому значению 0.9).

Гистограммы распределения высот объектов в выбранном диапазоне приведены на *рис. 4* для рабочей поверхности микрочипов до гибридизации (*рис. 4А*), после гибридизации (*рис. 4Б*), а также для контрольной поверхности микрочипов без иммобилизованных зондов, экспонированной в раствор с ДНК-мишенью в тех же экспериментальных условиях (*рис. 4В*). Гистограммы суммируют данные, полученные из АСМ-изображений, в трех различных точках каждой из поверхностей. Для наглядности гистограммы приведены в одном масштабе. Для количественного сравнения эффективности гибридизации использовали суммарную площадь отобранных с учетом высоты объектов (s_i), нормированную на площадь всего АСМ-изображения S_i : $k = \sum s_i / S$ и выраженную в процентах. Таким образом, агрегаты наночастиц будут учитываться более эффективно, так как их площадь пропорциональна числу входящих в них частиц. По смыслу параметр k отражает долю площади, занимаемой наночастицами-метками, в общей поверхности микрочипа. В связи с эффектом уширения выступающих объектов кантилевером атомно-силового микроскопа следует иметь в виду, что параметр k служит оценкой сверху для доли площади, занимаемой наночастицами. Параметр k с погрешностями для проведенных экспериментов представлен на *рис. 5*. Доля площади, занимаемой золотыми наночастицами при комплементарной гибридизации, оценивается в 8%, при отсутствии комплементарного связывания – 0.5%, тогда как площадь поверхности фоновых частиц не превышает 0.2%. При этом соотношение сигнала к шуму составило 16 и 40 соответственно. Для сравнения, в работе [13] соотношение сигнал/шум при флуоресцентной детекции составило 10 (при концентрации мишени 1 нМ).

Предлагаемый нами подход позволяет использовать количественный критерий для оценки гибридизации олигонуклеотидных зондов с ДНК-мишенями и дает возможность сравнивать эффективность идентификации ДНК на различных микрочипах. Важное отличие развитого нами подхода от общепринятых способов детекции гибридизации зонда с ДНК-мишенью, описанных во «Введении» (например, флуоресцентная и оптическая детекция), состоит в возможности визуализации единичных актов связывания мишени. Благодаря этому порог детекции ДНК-мишеней может быть значительно снижен по сравнению с общепринятыми способами, которые подразумевают наличие сигнала одновременно от большого количества связавшихся мишеней. Например, в работе [13], где для оценки эффективности гибридизации использовали прямой подсчет наночастиц по ПЭМ-изображениям, минимальный порог чувствительности обеспечивался по детекции

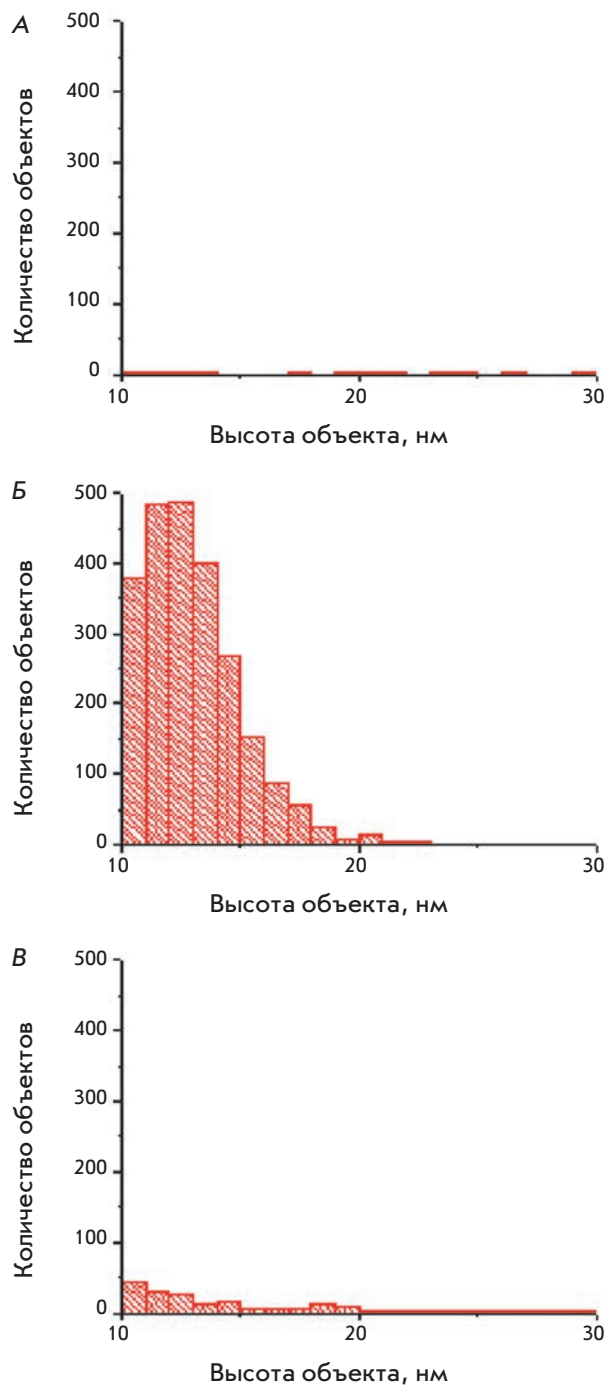


Рис. 4. Гистограммы распределения по высотам объектов в диапазоне 10–30 нм, наблюдаемых на АСМ-изображениях поверхности микрочипов до (А) и после (Б) гибридизации с ДНК-мишенью и конъюгатом стрептавидина с золотыми наночастицами, а также для контрольной поверхности микрочипов без олигонуклеотидных зондов после экспонирования в анализируемый раствор ДНК-мишени (В). Данные для каждой гистограммы суммированы по трем АСМ-изображениям размером $5 \times 5 \text{ мкм}^2$

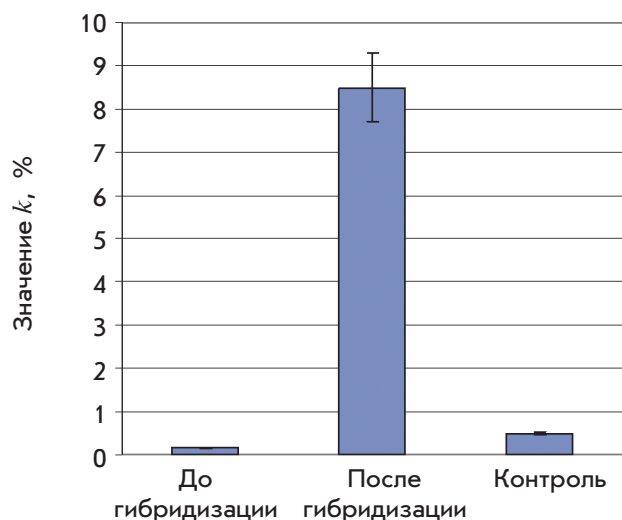


Рис. 5. Значение параметра k (в процентах) для поверхности микрочипов до и после гибридизации с ДНК-мишенью и конъюгатом стрептавидина с золотыми наночастицами, а также для контрольной поверхности микрочипов без олигонуклеотидных зондов после экспонирования в раствор ДНК-мишени. Параметр рассчитывали по трем АСМ-изображениям размером $5 \times 5 \text{ мкм}^2$

в среднем одной наночастицы на квадратный микрометр, при этом минимальная детектируемая концентрация оказалась в 1000 раз меньше, чем при использовании флуоресцентных меток.

Стоит подчеркнуть, что использование развитого нами подхода (и параметра k) не ограничено системами с использованием наночастиц в качестве маркеров ДНК. Этот же подход может быть применен для детекции молекул или других мишеней без использования меток. В таком случае параметр k (или его аналог, где в числителе суммируются не площади, а объемы) будет характеризовать количество связанного материала (мишени).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе метод АСМ был применен к исследованию олигонуклеотидных микрочипов для идентификации ДНК, кодирующих бактериальные β -лактамазы СТХ-М-типа. Введение в дуплексы ДНК наночастиц золота позволяет использовать метод АСМ для эффективной детекции результатов гибридизации ДНК-мишеней с олигонуклеотидными зондами как в жидком, так и воздушном окружении. Для количественного описания процессов гибридизации нуклеиновых кислот разработан подход к оценке результатов гибридизации с применением трехмерного анализа АСМ-изображений поверхности микрочипа, учитывающий высоту и площадь наночастиц золота, используемых в качестве метки. Этот метод позволяет игнорировать неспецифически связавшиеся с поверхностью и отличающиеся от меток по высоте частицы, а также учитывать агрегаты наночастиц-мишеней, что позволяет увеличить чувствительность детекции. Для изученных в работе кремниевых микрочипов параметр k , соответствующий доле площади, занимаемой наночастицами после гибридизации с меченой специфической ДНК, был равен 8%, в то время как контрольные значения не превысили 0.5%. Способность получать трехмерную морфологию отдельных гибридизованных молекул ДНК является основным преимуществом АСМ перед другими методами детекции связывания на олигонуклеотидных микрочипах. Получение информации о трехмерном строении объекта позволяет использовать более точные морфологические критерии при выявлении гибридизованных молекул ДНК. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 15-04-07678) и частично грантом Президента РФ для государственной поддержки молодых ученых (МК-312.2013.2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. // Science. 1995. V. 270. P. 467–470.
- Yoo S.M., Choi J.H., Lee S.Y., Yoo N.C. // J. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 19. № 7. P. 635–646.
- Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M. // Science. 1999. V. 284. P. 1520–1523.
- Nuwaysir E.F., Bittner M., Trent J., Barnett J.C., Afshari C.A. // Mol. Carcinog. 1999. V. 24. P. 153–159.
- Iida K., Nishimura I. // Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2002. V. 13. P. 35–50.
- Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J. // Chem. Rev. 2008. V. 108. P. 109–139.
- Herwig R., Aanstad P., Clark M., Lehrach H. // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. e117.
- Ryan O., Smyth M.R., Fagain C.O. // Essays Biochem. 1994. V. 28. P. 129–146.
- Lytton-Jean A.K., Han M.S., Mirkin C.A. // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 6037–6041.
- Liao J.C., Mastali M., Gau V., Suchard M.A., Möller A.K., Bruckner D.A., Babbitt J.T., Li Y., Gornbein J., Landaw E.M., et al. // J. Clin. Microbiol. 2006. V. 44. P. 561–570.
- Malic L., Cui B., Veres T., Tabrizian M. // Opt. Lett. 2007. V. 32. P. 3092–3094.
- Hering K.K., Moller R., Fritzsche W., Popp J. // ChemPhys-Chem. 2008. V. 9. P. 867–872.

13. Kim H., Takei H., Yasuda K. // *Sens. Actuators. B.* 2010. V. 144. P. 6–10.
14. Adamcik J., Klinov D.V., Witz G., Sekatskii S.K., Dietler G. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 5671–5675.
15. Dubrovin E.V., Staritsyn S.N., Yakovenko S.A., Yaminsky I.V. // *Biomacromolecules.* 2007. V. 8. P. 2258–2261.
16. Dubrovin E.V., Gerritsen J.W., Zivkovic J., Yaminsky I.V., Speller S. // *Colloids Surf. B.* 2010. V. 76. P. 63–69.
17. Dubrovin E.V., Feduykina G.N., Kraevskiy S.V., Ignatyuk T.E., Yaminsky I.V., Ignatov S.G. // *Open Microbiol. J.* 2012. V. 6. P. 22–28.
18. Dubrovin E.V., Popova A.V., Kraevskiy S.V., Ignatov S.G., Ignatyuk T.E., Yaminsky I.V., Volozhantsev N.V. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 10. e47348.
19. Dupres V., Verbelen C., Dufrêne Y.F. // *Biomaterials.* 2007. V. 28. P. 2393–2402.
20. Oh S.J., Cho S.J., Kim C.O., Park J.W. // *Langmuir.* 2002. V. 18. P. 1764–1769.
21. Legay G., Finot E., Meunier-Prest R., Cherkaoui-Malki M., Latruffe N., Dereux A. // *Biosens. Bioelectron.* 2005. V. 21. P. 627–636.
22. Lenigk R., Carles M., Ip N.Y., Sucher N.J. // *Langmuir.* 2001. V. 17. P. 2497–2501.
23. Festag G., Steinbruck A., Wolff A., Csaki A., Moller R., Fritzsche W. // *J. Fluoresc.* 2005. V. 15. P. 161–170.
24. Han W.H., Liao J.-M., Chen K.-L., Wu S.-M., Chiang Y.-W., Lo S.-T., Chen C.-L., Chiang C.-M. // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 2395–2400.
25. Cook M.A., Chan C.-K., Jorgensen P., Ketela T., So D., Tyers M., Ho C.-Y. // *PLoS One.* 2008. V. 3. e154.
26. Lavalley V., Chaudouët P., Stambouli V. // *Surf. Sci.* 2007. V. 601. P. 5424–5432.
27. Bush K. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2013. V. 1277. P. 84–90.
28. Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Бахман Т.Т., Шмид Р.Д., Егоров А.М. // *Успехи биол. химии.* 2010. Т. 50. С. 303–348.
29. Frens G. // *Nat. Phys. Sci.* 1973. V. 241. P. 20–22.
30. Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. № 4. P. 1252–1260.
31. Lamture J.B., Beattie K.L., Burke B.E., Eggers M.D., Ehrlich D.J., Fowler R., Hollis M.A., Kosicki B.B., Reich R.K., Smith S.R., et al. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 2121–2125.

УДК 577.113.7+616-006.6

Перераспределение свободных и связанных с форменными элементами циркулирующих ДНК при доброкачественных и злокачественных заболеваниях предстательной железы

О. Е. Брызгунова^{1#}, С. Н. Тамкович^{1,2*#}, А. В. Черепанова¹, С. В. Ярмошук³,
В. И. Пермькова¹, О. Ю. Анисеева³, П. П. Лактионов^{1,3}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

³Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

*E-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru

Авторы внесли равный вклад.

Поступила в редакцию 03.12.2014

После доработки 19.03.2015

РЕФЕРАТ Показано, что концентрация свободно циркулирующих ДНК (сцДНК) в плазме крови коррелирует с концентрацией ДНК, связанных с поверхностью клеток крови (скпДНК). Обратная корреляция между концентрацией сцДНК и активностью дезоксирибонуклеаз крови при отсутствии корреляции между дезоксирибонуклеазной активностью крови и концентрацией скпДНК свидетельствует о том, что нуклеазы крови являются важным регулятором концентрации сцДНК, однако они не гидролизуют скпДНК и не влияют на процесс диссоциации ДНК с клеточной поверхности. Возможность перераспределения молекул ДНК между пулами сц- и скпДНК показывает, что для анализа концентраций маркерных ДНК и нормирования данных предпочтительно использовать общий пул циркулирующих ДНК, состоящий из сц- и скпДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дезоксирибонуклеазная активность, плазма, рак предстательной железы, циркулирующие ДНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ сцДНК – свободно циркулирующие ДНК; скпДНК – связанные с поверхностью клеток ДНК; ОЗПЖ – онкологические заболевания предстательной железы; ФБ-ЭДТА – 10 мМ фосфатный буфер (рН 7.5), содержащий 0.15 М NaCl и 5 мМ ЭДТА.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в крови здоровых доноров и онкологических больных постоянно циркулируют внеклеточные ДНК. Такие циркулирующие ДНК обнаружены как в составе апоптотических телец, нуклеосом, макромолекулярных белковых комплексов плазмы крови [1, 2], так и на поверхности форменных элементов [1]. Ранее мы показали, что при развитии онкологических заболеваний, таких, как рак молочной железы [3, 4] и легкого [5], увеличивается концентрация сцДНК и снижается концентрация скпДНК. Взаимоотношения этих пулов циркулирующих ДНК исследованы не были.

В представленной работе изучено распределение циркулирующих ДНК между плазмой и поверхно-

стью форменных элементов крови при развитии онкологических заболеваний предстательной железы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы крови здоровых мужчин ($n = 40$) в возрасте 37–71 (47.4 ± 1.3) лет и концентрацией простатспецифического антигена (ПСА), соответствующей клинической норме и не превышающей 2.8 нг/мл, получены из ЦКБ СО РАН. Образцы крови первично обратившихся больных с онкологическими заболеваниями предстательной железы в возрасте 45–84 (70.2 ± 1.4) лет получены из Муниципальной клинической больницы № 1; концентрация ПСА в группе больных с доброкачественной гиперплазией ($n = 25$) и раком ($n = 16$) предстательной железы составила

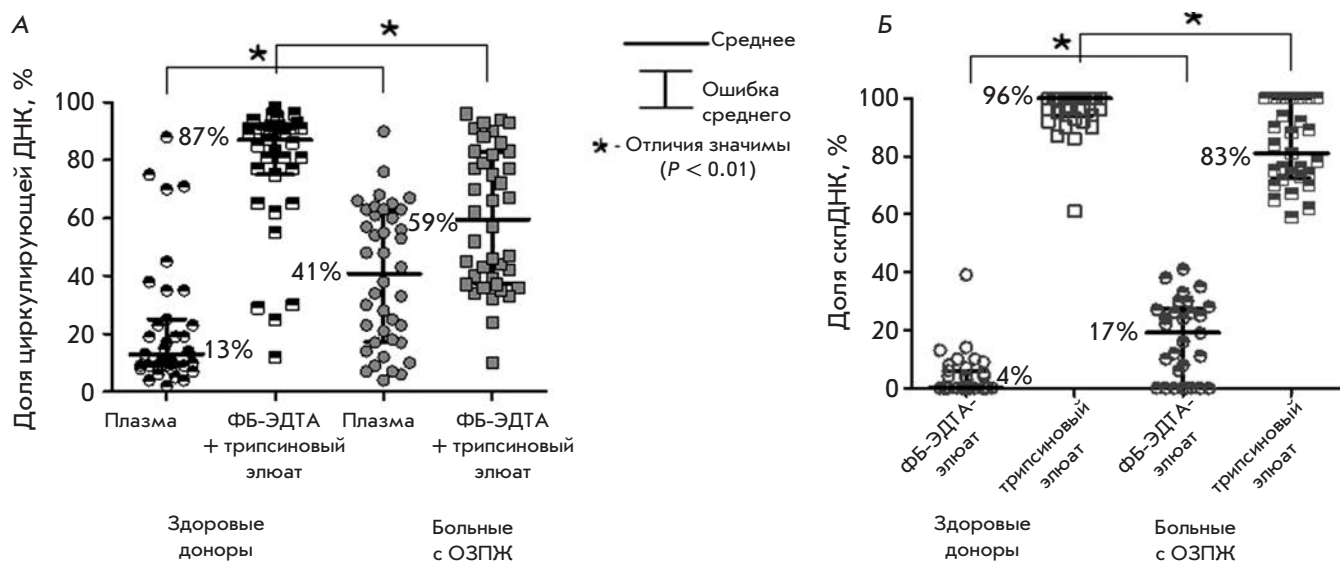


Рис. 1. Относительное содержание сцДНК и скпДНК (А) и скпДНК (Б) в крови здоровых доноров и пациентов с ОЗПЖ

0–31.7 и 0–103.1 нг/мл соответственно (повышена в 36 и 81% случаев). Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан. Стадию заболевания определяли по TNM-классификации.

Сбор и обработку крови, выделение сцДНК из плазмы, скпДНК из ФБ-ЭДТА-элюата и скпДНК из трипсинового элюата с поверхности форменных элементов крови проводили согласно [5]. Концентрацию внеклеточной ДНК определяли при помощи флуоресцирующего интеркалирующего красителя PicoGreen [5]. С учетом соотношения объемов плазмы, элюатов с поверхности клеток крови и суммарного объема крови минимальный уровень ДНК, детектируемой в плазме, составил 0.4 нг/мл крови, в ФБ-ЭДТА-элюате – 2 нг/мл крови и в трипсиновом элюате – 20 нг/мл крови. Интегральную активность ДНКаз в плазме крови здоровых доноров и больных определяли при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) как описано в работе [6]. Чувствительность ИФА, определенная как минимальная статистически значимо определяемая активность ДНКазы I в образце, составляла 0.004 ед. акт./мл образца. Коэффициент вариации в каждой точке не превышал 4%.

Результаты обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 5 с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что в крови здоровых доноров, а также у больных раком легкого [5], желудка

и кишечника [7] постоянно присутствуют циркулирующие ДНК, которые находятся не только в плазме крови, но и входят в состав комплексов, связанных с поверхностью форменных элементов крови. Часть скпДНК диссоциирует после обработки клеток ФБ-ЭДТА-буфером и, по-видимому, связана с фосфолипидами и другими анионами клеточной мембраны через «мостики» из ионов двухвалентных металлов [8] или низкоаффинно, и элюируется в 9 раз большим объемом буфера (по сравнению с объемом плазмы); другая часть скпДНК удаляется с клеточной поверхности при обработке клеток 0.125% раствором трипсина и, по-видимому, входит в состав комплексов с поверхностными белками форменных элементов крови [1].

В представленной работе изучены корреляционные связи между концентрацией сцДНК и скпДНК в крови в норме и при развитии онкологических заболеваний предстательной железы (ОЗПЖ). Поскольку концентрации сцДНК и скпДНК у пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы не отличались статистически значимо от их концентрации в крови больных раком предстательной железы (данные не представлены), эти группы больных были объединены в общую группу пациентов с ОЗПЖ. При оценке отношения концентраций сцДНК и суммарной циркулирующей ДНК всей крови (сц + скпДНК) обнаружено статистически значимое ($P < 0.01$) увеличение доли сцДНК при ОЗПЖ ($40 \pm 4\%$) по сравнению с нормой ($22 \pm 4\%$) (рис. 1А).

Обнаружили, что ФБ-ЭДТА-элюат с поверхности форменных элементов (т.е. «слабо» связанные скпДНК) у здоровых доноров и пациентов с ОЗПЖ содержит 4 ± 1 и $17 \pm 3\%$ от общего количества свя-

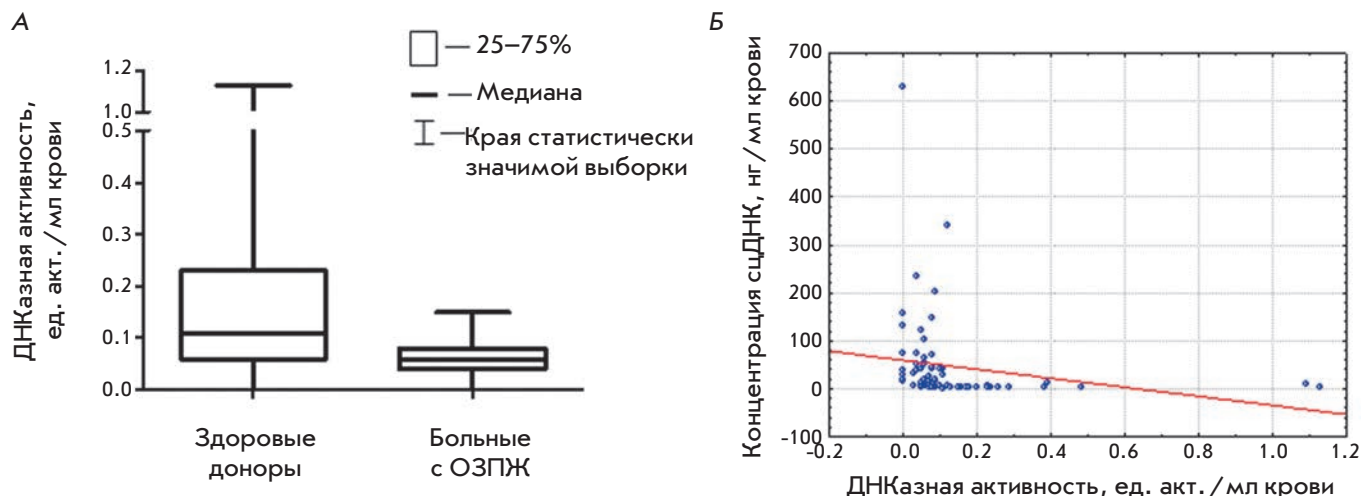


Рис. 2. Активность дезоксирибонуклеаз в плазме крови здоровых доноров и больных с ОЗПЖ (А); зависимость концентрации сцДНК от DNазной активности плазмы крови здоровых доноров и пациентов с ОЗПЖ (Б)

занных с клетками крови циркулирующих ДНК соответственно (рис. 1Б), и эти отличия между здоровыми и больными мужчинами статистически значимы ($P < 0.01$).

Обнаруженное нами уменьшение доли скпДНК с одновременным увеличением доли сцДНК в крови при ОЗПЖ может быть следствием гидролиза скпДНК под действием дезоксирибонуклеаз крови. Данные о способности DNаз гидролизовать нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью клеток, противоречивы. Одни авторы полагают, что DNазы могут гидролизовать скпДНК [9], согласно другим – DNазы слабо влияют на концентрацию скпДНК [8, 10].

Активность DNаз крови определяли с использованием разработанного ранее иммуноферментного анализа, основанного на гидролизе ПЦР-фрагмента ДНК, модифицированного остатками биотина и флуоресцеина [6]. Определение концентрации сцДНК и активности DNаз плазмы крови здоровых доноров и онкологических больных выявило существование заметной (по шкале Чеддока) обратной корреляции между этими параметрами ($R = -0.57$, $P < 0.01$) (рис. 2).

Эти данные показывают, что DNазы, несмотря на статистически значимое ($P < 0.01$) снижение их активности в крови больных ОЗПЖ по сравнению со здоровыми донорами (рис. 2), могут гидролизовать сцДНК и, по-видимому, являются одним из факторов негативной регуляции концентрации сцДНК.

Изучение зависимости между активностью DNаз плазмы крови и концентрацией скпДНК показало, что активность DNаз слабо коррелирует с концентрацией ДНК, связанных с поверхностью форменных элементов за счет ионных взаимодействий, и практически не коррелирует с концентрацией ДНК, связанных

с белками клеточной поверхности ($R = -0.36$, $P < 0.01$ и $R = -0.28$, $P < 0.01$ соответственно). Эти данные свидетельствуют о том, что DNазы практически не гидролизуют скпДНК, «прочно» связанные с белками клеточной поверхности, не вносят существенного вклада в процесс фрагментации скпДНК, ее диссоциации с поверхности клеток, а концентрация сцДНК не может возрастать за счет гидролиза скпДНК, прочно связанной с клеточной поверхностью.

Данные экспериментов *in vitro* [11] и результаты изучения скпДНК крови (рис. 1) показывают, что основная часть скпДНК удаляется с поверхности клеток при обработке клеток трипсином, т.е. связана с белками клеточной поверхности. Исходя из данных о корреляции между концентрацией скпДНК ФБ-ЭДТА-элюата и активностью DNаз, можно предположить, что часть «слабо» связанных скпДНК может обмениваться с ДНК внеклеточной среды и плазмы крови. Подтверждением этого предположения служит заметная (по шкале Чеддока) прямая корреляция между изменением концентрации сцДНК плазмы и концентрации «слабо» связанных скпДНК (ФБ-ЭДТА-элюат) ($R = 0.67$, $P < 0.01$) у пациентов с ОЗПЖ (рис. 3А).

Кроме того, нами обнаружена прямая корреляция между концентрацией скпДНК в ФБ-ЭДТА-элюате и трипсиновом элюате у пациентов с ОЗПЖ ($R = 0.65$, $P < 0.001$) (рис. 3Б), что может свидетельствовать о перераспределении ДНК между этими фракциями скпДНК.

Таким образом, полученные данные указывают на возможность частичного обмена сцДНК и скпДНК крови. Косвенно этот факт подтверждается также данными о размере фрагментов циркулирующей

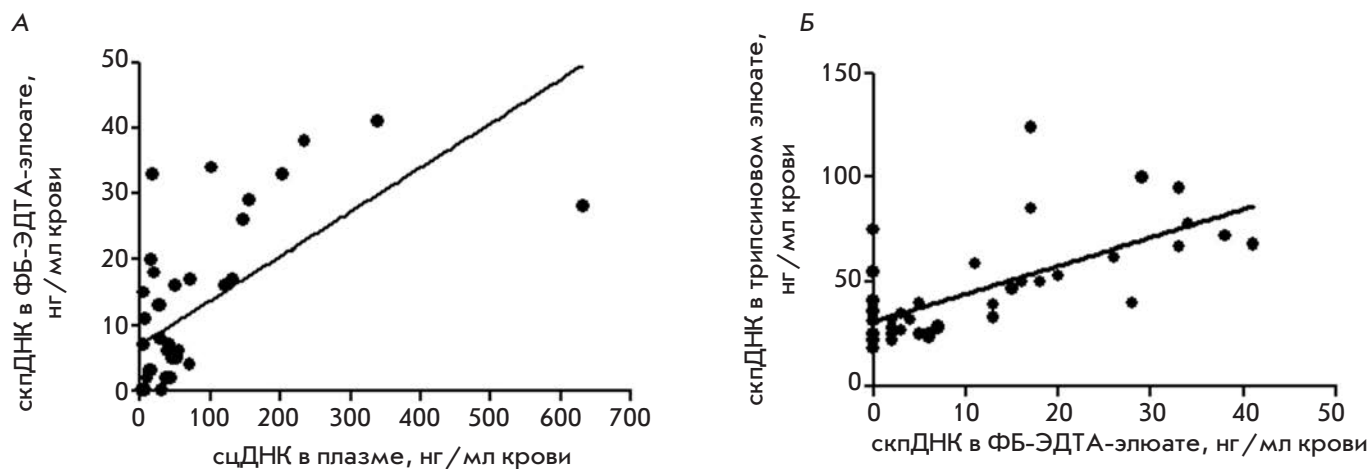


Рис. 3. Зависимость концентрации сцДНК в плазме крови от концентрации скпДНК в ФБ-ЭДТА-элюате (А); зависимость концентрации скпДНК в ФБ-ЭДТА-элюате от концентрации скпДНК в трипсиновом элюате (Б)

ДНК. скпДНК трипсинового элюата представлены преимущественно высокомолекулярной ДНК размером около 10–20 т.п.н., а сцДНК и скпДНК ФБ-ЭДТА-элюата содержат кроме высокомолекулярной ДНК фрагменты размером 200–500 п.н. [3], которые, по видимому, и могут циркулировать в составе того или другого пула циркулирующих ДНК.

Причины снижения доли скпДНК в общем пуле циркулирующих ДНК в крови больных ОЗПЖ не известны. Вполне вероятно, что они могут быть связаны с изменением строения цитоплазматических мембран клеток крови. Действительно, показано, что при развитии онкологических заболеваний изменяется соотношение липидов в мембранах клеток крови, что приводит к увеличению вязкости липидного бислоя, нарушению межмолекулярных белок-липидных взаимодействий и, как следствие, дезорганизации белкового состава, нарушению функционирования катионтранспортирующих мем-

бранных систем и дезорганизации поверхностной архитектоники клеток [12].

Известно, что пул скпДНК служит ценным источником диагностического материала [4]. Возможность обмена сцДНК и скпДНК позволяет предположить, что в будущем наиболее точная диагностическая информация может быть получена при анализе суммарной циркулирующей ДНК крови. Действительно, при условии, что сцДНК и скпДНК могут обмениваться (и механизмы этого процесса пока неизвестны), для измерения относительных концентраций маркеров правильнее использовать суммарную циркулирующую ДНК крови (сцДНК + скпДНК). ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-01460), БОР (№ VI.62.1.4), а также стипендиями Президента РФ для молодых ученых и аспирантов (СП-1528.2013.4, СП-5711.2013.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. // Молекуляр. биология. 2008. Т. 42. № 1. С. 12–24.
2. Geary R., Watanabe T., Truong L., Freier S., Lesnik E.A., Sioufi N.B., Sasmor H., Manoharan M., Levin A.A. // Pharm. Exp. Therap. 2001. V. 296. № 3. P. 890–897.
3. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004. V. 1022. P. 221–227.
4. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // Br. J. Cancer. 2006. V. 94. № 10. P. 1492–1495.
5. Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'ialov A.A., Vlassov V.V., Cherdyntseva N.V., Laktionov P.P. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1137. P. 214–217.
6. Cherepanova A., Tamkovich S., Pyshnyi D., Kharkova M.,

- Vlassov V., Laktionov P. // J. Immunol. Methods. 2007. V. 325. № 1–2. P. 96–103.
7. Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е., Рыкова Е.Ю., Колесникова Е.В., Шелестюк П.И., Лактионов П.П., Власов В.В. // Биомед. хим. 2005. Т. 51. № 3. С. 321–328.
8. Беляев Н.Д., Будкер В.Г., Горохова О.Е., Соколов А.В. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. С. 1667–1672.
9. Aggarwal S., Wagner R., McAllister P., Rosenberg B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 3. P. 928–932.
10. Dorsch C. // Thromb. Res. 1981. V. 24. № 1–2. P. 119–129.
11. Морозкин Е.С., Сильников В.Н., Рыкова Е.Ю., Власов В.В., Лактионов П.П. // Бюл. экп. биол. мед. 2009. Т. 147. № 1. С. 67–70.
12. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Федорова Т.С., Кравец Е.Б., Иванов В.В., Жаворонок Т.В., Часовских Н.Ю., Чудакова О.М., Бугусова В.Н. и др. // Бюл. сиб. медицины. 2006. Т. 2. С. 62–69.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, мини-обзоры, краткие сообщения, 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.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией 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 (примерно 40 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 (20 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10. Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

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 (8 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись следует присылать в редакцию в электронном виде: текст в формате Word 2003 for Windows, рисунки в формате TIFF. Отдельным файлом присылается перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, списка литературы и подписей к рисункам.

При подаче статьи авторы заключают с редакцией договор о передаче права на использование произведения. Форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru. Договор, подписанный от имени всего авторского коллектива первым или последним автором, следует выслать на адрес редакции: 119311, Москва, а/я 136, редакция журнала *Acta Naturae*, или принести в редакцию по адресу: Москва, Ленинские горы, Научный парк МГУ, влад. 1, стр. 75Г, офис 628.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт — курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт — заглавный, 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 коррек-

турой. 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 сноска, 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: сноска (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: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – 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 μ М; нм, но не nm).

- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные 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 (А, Т, G, С, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (АТФ, АМФ и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, 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. Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. 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 редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Рукопись, направленная авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, рецензируется повторно, после чего редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости ее для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты поступления рукописи в редакцию и принятия рукописи в печать после положительного решения рецензента.

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 первоначальным вариантом статьи, а также ответами на все замечания.

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, телефоны: (495) 727-38-60, (495) 930-87-07.

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ



Что нового в области нанотехнологий?

узнай всего за 9600 рублей

9600 РУБЛЕЙ – ЦЕНА ГОДОВОЙ ПОДПИСКИ, ВКЛЮЧАЯ НДС

Подписка в редакции:

119234, Москва, Ленинские горы,
Научный парк МГУ, владение 1,
строение 75Б, офис 321

Телефон/ факс: +7 (495) 930 87 07

E-mail: nsoboleva@strf.ru

Web-site: www.nanoru.ru, www.nanorf.ru

Альтернативные агентства:

Урал-пресс www.ural-press.ru,

Информнаука www.informnauka.com

На электронную версию журнала можно подписаться через Научную электронную библиотеку: elibrary.ru



НАМ 10 ЛЕТ

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2004
№ 3, № 4

Свойства плазменные эмиттеры и молекулярных лучей через квантовые структуры в условиях взаимодействия с поверхностной световой волной

Акция! ОДИН НОМЕР БЕСПЛАТНО читайте на стр. 112

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2010
№ 3, № 4

Самосборка молекул полиметиновых красителей в растворах. Кинетический аспект агрегации

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2011
№ 3, № 4

Наночастицы на основе сукцинимидного хитозана с дисперсионными характеристиками и свойствами

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2012
№ 3, № 4

«Молекулярные химеры»: новые стратегии конструирования функциональных материалов с. 105

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2013
№ 3, № 4

Журнал выходит на iPad и Android-устройствах

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2010
№ 3, № 4

Получение волокон композитного диоксида титана

НАМ 10 ЛЕТ

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2014
№ 3, № 4

Журнал выходит на iPad и Android-устройствах

Амфифильные диблоксополимеры как основа высокоэффективных наноструктурированных мембран для топливных элементов: мезоскопическое моделирование

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2008
№ 3, № 4

Россия выходит в свитч высокотехнологичных ИТ-устройств

Светоиндуцированная нелинейность квантовых точек CdSe/ZnS с миллисекундным временем релаксации

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2010
№ 3, № 4

Самосборка упорядоченных слоев микросфер диоксида вольфрама

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2013
№ 3, № 4

Влияние размера нанопор носителя на активность гетерогенного фотосенсибилизатора

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2009
№ 3, № 4

Материальная энергетика

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ
Июль-август 2014
№ 3, № 4

Журнал выходит на iPad и Android-устройствах

Многосаговое атомистическое моделирование иерархических наноматериалов для оптических хемосенсоров