

# Письмо редакторов

**Д**орогие читатели *Acta Naturae*! Позвольте предложить вам очередной, 21-й номер журнала (как видите, счет пошел на третий десяток!). Научная часть номера, как всегда, отличается значительным разнообразием. Предлагаем вам два обзора. Первый из них – В.К. Ильина и Н.В. Кирюхиной – посвящен фундаментальным медицинским аспектам пребывания человека в искусственной среде обитания. Учитывая прогресс в космических исследованиях, в частности в подготовке к межпланетным полетам, такую проблематику следует считать весьма актуальной. Несомненно, этот материал будет интересен и экологам. Забегая вперед, необходимо также отметить, что обзор весьма созвучен тематике раздела «Форум» данного номера. Второй обзор (Б.Б. Вартапетян и др.) посвящен созданию растений, толерантных к анаэробному стрессу, где авторы обобщают результаты главным образом собственных исследований в этой области. Генетическая и клеточная инженерия растений увлекательная область, вокруг которой не утихают споры. На наш взгляд, обзор носит принципиальный характер и будет интересен читателям.

Экспериментальные сообщения покрывают широкий спектр дисциплин и подходов. Здесь и структурная, и функциональная геномика (статьи А.В. Недолужко и др., О.В. Арковой и др., Е.А. Никитиной и др.), и различные аспекты фундаментальной медицины (сообщения Е.А. Трифоновой и др., С.С. Попова и др.). В этом номере велико число статей, посвященных новым методам в молекулярной и клеточной биологии, а также биотехнологическим приемам получения целевых продуктов, вопросам биофармацевтики. Интересны, на наш взгляд, работы, связанные с созданием моделей для исследования заболеваний человека (статьи Е.А. Никитиной с соавт. и М.С. Сыркиной с соавт.). Заслуживает внимание работа по направленной доставке препаратов (М.Н. Гарас с соавт.) и работа по экспрессии опухолевого антигена HER2 (В.В. Долгих с соавт.). Продолжают интересовать читателей и работы в области теломераз (С.А. Евфратов с соавт.).

12 июня в День России состоялось торжественное вручение Государственных премий Российской Федерации в Кремле. Среди лауреатов этого года вице-президент РАН, академик Анатолий Иванович Григорьев, председатель Редакционного совета нашего журнала. Пользуясь случаем, мы поздравляем Анатолия Ивановича с высокой наградой. Желаем ему крепкого здоровья, успехов в науке и выражаем благодарность за большую работу по становлению и регулярной поддержке нашего журнала. В номере в разделе «Форум» читатели найдут интервью с лауреатом. На наш взгляд, это интересный, увлекательный рассказ о проблемах космической медицины, в которой наша страна всегда занимала лидирующие позиции.

В заключение хочется кратко остановиться на потенциальной роли журнала в демонстрации результатов отечественной науки в области «живого». В связи с прохождением конкурсов Российского научного фонда и ряда программ Минобрнауки, требующих весьма высоких количественных публикационных показателей, в редакцию стало поступать значительное число статей. Появляются и статьи из зарубежья. Наш журнал индексируется теперь во всех базах данных (PubMed с открытым доступом к полной версии, SCOPUS, Web of Science, РИНЦ), что делает его привлекательной площадкой для публикации результатов работ по грантам. Нам бы не хотелось в этой связи допускать элементы дублирования и публикацию второстепенных материалов. Редакционная коллегия и Редакционный совет придерживаются жесткого требования «peer-review» и для вынесения решения используют мнения двух независимых рецензий. В ряде случаев мы отправляем материал третьему рецензенту. При этом нами введена практика отклонения статьи на стадии, предшествующей отправке рецензентам. Такое решение принимается членами редколлегии в случае, если статья заведомо не соответствует методическому уровню современных исследований или носит сугубо специальный характер.

Интересного чтения и до следующей встречи! ●

*Редколлегия*

15-17 ОКТЯБРЯ 2014  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ  
ЭКСПОФОРУМ



ПЕТЕРБУРГСКИЙ  
МЕЖДУНАРОДНЫЙ  
ФОРУМ  
ЗДОРОВЬЯ



**МЕДИЗ  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ**  
Медицина и здоровье  
[www.mediz-spb.ru](http://www.mediz-spb.ru)



**ФАРМАЦИЯ**  
[www.pharma.primexpo.ru](http://www.pharma.primexpo.ru)



**БИОИНДУСТРИЯ**  
[www.bio.expoforum.ru](http://www.bio.expoforum.ru)



**ЛЕЧЕБНО-  
ОЗДОРОВИТЕЛЬНЫЙ  
ТУРИЗМ**  
[www.healthtourism.primexpo.ru](http://www.healthtourism.primexpo.ru)



**VISUS-EXPO**  
[www.kmc-med.com](http://www.kmc-med.com)



**ЭСТЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА**  
[www.primexpo.ru](http://www.primexpo.ru)

[www.pmfz.expoforum.ru](http://www.pmfz.expoforum.ru)

**+7 812 240 40 40**

**EXPOFORUM**



**0+**





## Мишень-специфичная доставка генов с помощью рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц, способных эффективно связываться с наноантителами

М. Н. Гарас, С. В. Тиллиб, О. В. Зубкова, В. Н. Рогожин, Т. И. Иванова, Л. А. Васильев, Д. Ю. Логунов, М. М. Шмаров, И. Л. Тутыхина, И. Б. Есмагамбетов, И. Ю. Грибова, А. С. Банделюк, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург

Предложен новый подход к получению таргетных носителей с использованием рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц (РПАН) на основе генома аденовируса человека серотипа 5 с модифицированным геном капсидного белка рIX. Полученный препарат РПАН Ad5-EGFP-pIX-ER представляет собой универсальную платформу, которая посредством специфического присоединения на поверхности РПАН молекул наноантител против определенного поверхностного антигена может обеспечить доставку целевого гена в заданные клетки.

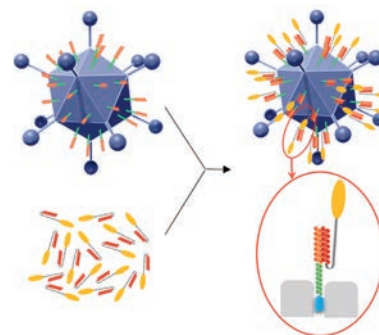
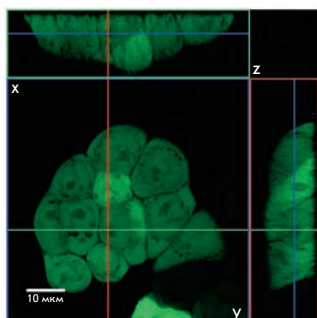


Схема образования комплекса Ad5-EGFP-pIX-ER/aCEA-RE



Локализация флуоресценции EGFP в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29

## Клеточные модели для исследования роли экстрацеллюлярного домена муцина MUC1 человека в метастазировании

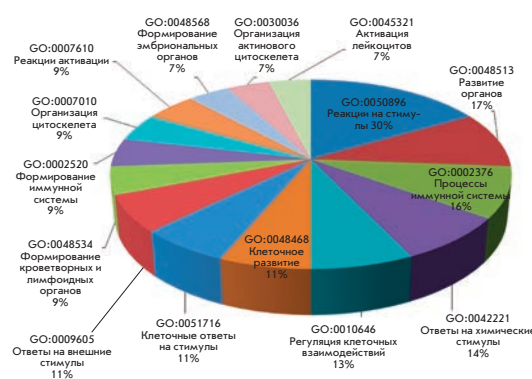
М. С. Сыркина, М. А. Рубцов, Д. М. Поташникова, Ю. Д. Кондратенко, А. А. Докрунова, В. П. Вейко

На основе экспрессионного вектора pEGFP-N3 получены генетические конструкции, кодирующие различные комбинации функциональных фрагментов муцина MUC1 человека, а также маркеры для идентификации синтезируемых химерных белков. Этими конструкциями трансфицировали клетки линии HT-29. Полученные клетки могут служить моделью MUC1-экспрессирующей формы рака, а также использоваться для исследования роли различных функциональных фрагментов муцина MUC1 в метастазировании.

## Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией

Е. А. Трифонова, Т. В. Габидулина, Н. И. Ершов, В. Н. Сереброва, А. Ю. Ворожищева, В. А. Степанов

Преэклампсия – одно из наиболее тяжелых гестационных осложнений, занимает ведущее место среди причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. Представленная работа – первое в России полногеномное исследование дифференциальной экспрессии генов в тканях плаценты при физиологическом и осложненном течении беременности. Выявлены 63 гена, экспрессия которых статистически значимо различается в плацентарной ткани женщин с преэклампсией и с физиологическим течением беременности.



Основные биологические процессы, в которые вовлечены дифференциально экспрессирующиеся гены, ассоциированные с преэклампсией

# Acta Naturae

ТОМ 6, № 2 (21), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 2014

## Учредители:

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

## Редакционный совет:

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

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

## Редакционная коллегия:

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

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

*Руководитель проекта:* С.Б. Невская  
*Выпускающий редактор:* Н.Ю. Деева  
*Директор по стратегическому развитию:*  
Е.Л. Пустовалова

*Подготовка иллюстраций:* И.А. Соловей, К.К. Опарин  
*Верстка:* К.К. Опарин

*Корректур:* Р.С. Шаймарданова  
*Дизайн-проект:* Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы,  
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.  
Телефон/факс: +7 (495) 930 87 07.  
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, 2014

Номер подписан в печать 4 июня 2014 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/](http://vak.ed.gov.ru/ru/help_desk/list/)

Публикация в журнале бесплатная  
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 0.477

## СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов. . . . . 1

### ФОРУМ

Космическая медицина:  
прошлое, настоящее, будущее . . . . . 6

### ОБЗОРЫ

В. К. Ильин, Н. В. Кирюхина  
Синдром нарушения колонизационной  
резистентности человека в искусственной  
среде обитания и его профилактика. . . . . 11

Б. Б. Вартапетян, Ю. И. Долгих, Л. И. Полякова,  
Н. В. Чичкова, А. Б. Вартапетян

Биотехнологические подходы в создании рас-  
тений, толерантных к гипоксии и аноксии . . 21

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. В. Недолужко, Е. С. Булыгина, А. С. Соколов,  
С. В. Цыганкова, Н. М. Груздева, А. Д. Резепкин,  
Е. Б. Прохорчук

Секвенирование полного митохондриального  
генома древнего человека, представителя  
новосвободненской культуры, указывает  
на ее возможную связь с культурой  
воронковидных кубков. . . . . 34

## СОДЕРЖАНИЕ

- О. В. Аркова, Н. А. Кузнецов, О. С. Федорова,  
Н. А. Колчанов, Л. К. Савинкова  
**Взаимодействие ТВР с ТАТА-боксом промотора гена триозофосфатизомеразы человека в норме и при патологии, определенное в режиме реального времени** ..... 40
- С. А. Евфратов, Е. М. Смекалова, А. В. Головин,  
Н. А. Логвина, М. Э. Зверева, О. А. Донцова  
**Структурные особенности гена теломеразной РНК *Heterocephalus glaber*** ..... 45
- Д. В. Капустин, А. И. Простякова, Я. И. Алексеев,  
Д. А. Варламов, В. П. Зубов, С. К. Завриев  
**Высокоэффективный метод одностадийного выделения ДНК для ПЦР-диагностики *Mycobacterium tuberculosis*** ..... 52
- Е. А. Никитина, А. В. Медведева, Г. А. Захаров,  
Е. В. Савватеева-Попова  
**Локус *agnostic* дрозофилы: вовлеченность в становление когнитивных нарушений при синдроме Уильямса** ..... 58
- М. С. Сыркина, М. А. Рубцов,  
Д. М. Поташникова, Ю. Д. Кондратенко,  
А. А. Докрунова, В. П. Вейко  
**Клеточные модели для исследования роли экстрацеллюлярного домена муцина MUC1 человека в метастазировании** ..... 67
- Е. А. Трифонова, Т. В. Габидулина, Н. И. Ершов,  
В. Н. Сереброва, А. Ю. Ворожищева,  
В. А. Степанов  
**Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией** ..... 77
- З. О. Шенкарев, Е. Н. Люкманова,  
А. С. Парамонов, П. В. Пантелеев, С. В. Баландин,  
М. А. Шулепко, К. С. Минеев, Т. В. Овчинникова,  
М. П. Кирпичников, А. С. Арсеньев  
**Липид-белковые нанодиски: новые возможности для структурно-функциональных исследований водорастворимых мембраноактивных пептидов** ..... 91
- М. Н. Гарас, С. В. Тиллиб, О. В. Зубкова,  
В. Н. Рогожин, Т. И. Иванова, Л. А. Васильев,  
Д. Ю. Логунов, М. М. Шмаров, И. Л. Тутьихина,  
И. Б. Есмагамбетов, И. Ю. Грибова,  
А. С. Бандельюк, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург  
**Мишень-специфичная доставка генов с помощью рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц, способных эффективно связываться с наноантителами** ..... 102
- В. В. Долгих, И. В. Сендерский, Г. В. Тец, В. В. Тец  
**Оптимизация схемы выделения и рефолдинга внеклеточного домена HER2, экспрессированного в клетках *Escherichia coli*** ..... 114
- С. С. Попов, К. К. Шульгин, А. Н. Пашков,  
А. А. Агарков  
**Воздействие мелаксена на активность каспаз и глутатионовой антиоксидантной системы при токсическом поражении печени** ..... 118
- Правила для авторов** ..... 128



### РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

См. статью Недолужко и др.

## Космическая медицина: прошлое, настоящее, будущее

Интервью лауреата Государственной премии  
Российской Федерации в области науки и технологий  
2014 года академика Анатолия Ивановича Григорьева

Анатолий Иванович Григорьев – крупный ученый, внесший выдающийся вклад в решение фундаментальных и прикладных задач космической физиологии и медицины. Им создано новое научное направление – гравитационная физиология. Он установил ряд важных закономерностей в функционировании вестибулярной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем, водно-солевого и минерального обмена в условиях измененной гравитации. Экспериментальные исследования и теоретические работы А.И. Григорьева нашли широкое применение в решении проблем сохранения здоровья космонавтов во время длительных полетов. Под его руководством обоснована, разработана и реализована система медицинского обеспечения экипажей в полетах продолжительностью до года и более. Исследования А.И. Григорьева, его многочисленные научные труды и активная практическая деятельность по медицинскому обеспечению пилотируемых космических полетов, участие в международном сотрудничестве снискали ему заслуженное признание в стране и за рубежом.



Первые орбитальные космические полеты поставили задачу проведения научных исследований по изучению влияния факторов полета на организм человека, выяснения основных закономерностей адаптации организма человека к условиям пребывания в космическом пространстве, разработки на этой основе научно обоснованной системы медицинского обеспечения здоровья космонавтов и ее внедрения.

Проблема медицинского обеспечения является многоплановой и включает ряд взаимосвязанных направлений. О них в беседе с корреспондентом журнала *Acta Naturae* рассказал академик Анатолий Иванович Григорьев.

**Корреспондент *Acta Naturae* (AN)** – Какие на Ваш взгляд научные исследования направлены на обоснование системы медицинского обеспечения здоровья космонавтов?

**А.И. Григорьев** – Во все периоды пилотируемой космонавтики формирование и модернизация системы медицинского обеспечения здоровья космонавтов базировались на результатах фундаментальных исследований в области космической физиологии, биологии, биохимии, биофизики и других научных дисциплин, выполненных в наземных модельных экспериментах, а также на биологических спутниках и в косми-

ческих полетах. Это позволило выяснить влияние факторов космического полета на различные функциональные структуры организма, изучить закономерности адаптации организма в ответ на их воздействие, обосновать подходы к разработке системы поддержания здоровья космонавтов в длительных полетах.

В первые годы освоения космического пространства осуществлялись кратковременные пилотируемые полеты на космических кораблях «Восток», «Восход» и «Союз» с относительно «простой» системой медицинского обеспечения и контроля состояния здоровья.



На следующем этапе перед пилотируемой космонавтикой была поставлена задача увеличения продолжительности полетов и числа членов экипажа. Это потребовало разработки системы надежного медицинского обеспечения для экспедиций продолжительностью в несколько месяцев. Для решения данной задачи в Институте медико-биологических проблем (ИМБП) были разработаны экспериментальные наземные модели, имитирующие эффекты невесомости. Ими стали клиностатическая и антиортостатическая гипокинезия (постельный режим) и «сухая» иммерсия (погружение испытуемого в специальную ванну с водой).

С 1966 по 1976 год была проведена большая серия экспериментов по клиностатической гипокинезии продолжительностью от 15 до 120 сут, в которых изучали состояние различных систем организма в этих условиях в сочетании с применением средств профилактики (физические упражнения, использование фармакологических препаратов). В 1980-е годы в ИМБП была проведена серия экспериментов с клиностатической гипокинезией продолжительностью от 3 до 120 сут по изучению сердечно-сосудистой системы, обмена веществ и особенностей их регуляции. Это позволило разработать и апробировать схему применения водно-солевых добавок в сочетании с воздействием отрицательного давления на нижнюю часть тела (ОДНТ), которая стала неотъемлемой частью системы профилактики на заключительном этапе продолжительных космических полетов (КП).

**Корреспондент АН** – Какое на Ваш взгляд исследование можно выделить из общей череды работ прошлых лет?

**А.И. Григорьев** – В 1988 году был проведен беспрецедентный по продолжительности 370-суточный эксперимент с антиорто-

статической гипокинезией, в котором была изучена динамика изменений основных систем организма, включая водно-солевой метаболизм и минеральный обмен. В эксперименте была показана возможность использования альтернативных технологий профилактики, позволяющих целенаправленно повышать физиологические возможности организма космонавта, в том числе для улучшения переносимости перегрузок во время спуска с орбиты. В продолжительном 56-суточном эксперименте с «сухой» иммерсией мы детально изучили состояние сердечно-сосудистой системы, водно-солевого обмена и функции почек и испытали средства профилактики – физические упражнения и искусственная гравитация, создаваемая с помощью центрифуги малого радиуса.

**Корреспондент АН** – Анатолий Иванович, Вы являетесь создателем нового научного направления – гравитационной физиологии. Расскажите, пожалуйста, про основные достижения данной области.

**А.И. Григорьев** – Гравитационная физиология занимается изучением закономерностей регуляции функций организма при измененной гравитации. Важные научные данные были получены в исследованиях на 11 биологических спутниках, которые проводились с участием специалистов российских и зарубежных научных центров (координатор Е.А. Ильин). Исследования велись по многим медико-биологическим дисциплинам с использованием биологических объектов широкого эволюционного диапазона (от микроорганизмов до приматов). В результате этих исследований совместно с Ю.В. Наточиним были получены важные данные для понимания механизмов адаптации обмена веществ при воздействии на живые организмы измененной

гравитацией, что стало значительным вкладом в теорию космической биологии.

К важным общетеоретическим достижениям можно отнести следующие: выявление у человека в длительных КП изменений чувствительности исполнительных органов к биологически активным веществам, определение роли сдвигов водно-солевого обмена в развитии вестибулярных расстройств, ортостатической неустойчивости и снижении переносимости ускорений, выяснение механизмов перестройки систем транспорта воды и ионов в почке, установление путей минимализации физиологических функций в этих условиях. Мы реализовали программы изучения сердечно-сосудистой системы и метаболизма в длительных полетах и установили ранее неизвестные механизмы эндокринной регуляции обмена веществ в условиях невесомости. При изучении влияния микрогравитации на мультипотентные стромальные клетки человека (ММСК) совместно с Л.Б. Буравковой были обнаружены структурные и молекулярно-генетические изменения в ММСК костного мозга человека. Эти данные свидетельствуют о наличии гравитационно-зависимых внутриклеточных механизмов, которые обуславливают как ранние, так и поздние ответные реакции клеток-предшественников на моделирование эффектов микрогравитации, свидетельствующие об особой роли актинового цитоскелета как базовой структуры клеток, в том числе и стволовых, в качестве гравитационно-сенсорной клеточной структуры. Исследования молекулярных механизмов изменений, обнаруженных в ММСК в этих условиях, показали транзитное изменение уровня экспрессии структурных и регуляторных генов, связанных с актиновым цитоскелетом. Впер-

вые было установлено, что это воздействие приводит к достоверному изменению паттерна экспрессии генов – «маркеров стволовых клеток», в том числе генов, кодирующих белки, принимающие участие во внутриклеточной сигнализации, клеточной адгезии, регуляции пролиферации и дифференцировки стволовых клеток.

Выполненные имитационные эксперименты и полетные исследования позволили нам обосновать, а в последующем – разработать и внедрить в практику полетов методы медицинского контроля, прогноза и управления состоянием человека, создать комплекс технологий профилактики неблагоприятного воздействия невесомости, что способствовало осуществлению длительных полетов на орбитальной станции (ОС) «Мир» и позволило нашей стране занять лидирующие позиции в пилотируемой космонавтике.

**Корреспондент AN** – В период с 1996 по 2008 год Вы являлись руководителем медицинского обеспечения космических полетов на ОС «Мир» и МКС, расскажите, пожалуйста, подробнее об этом.

**А.И. Григорьев** – Нашим коллективом была разработана система медицинского обеспечения экипажей при длительных орбитальных полетах, которая включает следующие компоненты:

- медицинский отбор, периодические и предполетные медицинские освидетельствования космонавтов, медицинская сертификация;
- медико-биологическая подготовка экипажей;
- обеспечение здоровья и работоспособности космонавтов в орбитальном полете: мониторинг здоровья, медицинская диагностика, система профилактических мероприятий, управление функциональным состоянием, психологическая поддержка,

медицинская помощь (при необходимости), обеспечение радиационного контроля и контроля среды обитания;

- проведение послеполетной медицинской реабилитации с целью восстановления здоровья членов космических экипажей;
- медико-санитарное сопровождение разработки пилотируемых космических аппаратов;
- медико-техническое сопровождение разработок бортовых средств медико-биологического обеспечения.

**Корреспондент AN** – Анатолий Иванович, известно, что с 1990 по 2008 год Вы были председателем Главной медицинской комиссии Российского космического агентства по сертификации кандидатов в космонавты и космонавтов. Расскажите, пожалуйста, про медицинский отбор и подготовку космонавтов.

**А.И. Григорьев** – Разработанная совместно со специалистами ЦПК им. Ю.А. Гагарина система медицинского отбора космонавтов включает всесторонние медицинские обследования космонавтов для оценки соматического и психического здоровья, определение функциональных резервов организма по результатам переносимости специальных нагрузочных тестов. При модернизации системы отбора используются самые современные достижения медицинской науки и технологий. С целью прогноза переносимости космонавтами экстремальных условий КП наряду с обширными физиологическими и биохимическими исследованиями проводится изучение параметров их генотипа. По всей видимости, «генетической предрасположенности» индивидуума к перенесению перегрузок, связанных с предполетной подготовкой и собственно непосредственно с длительным пребыванием в космосе, будет уделяться все большее внимание.

**Корреспондент AN** – Как проходит медицинский контроль состояния здоровья экипажей в полете?

**А.И. Григорьев** – Основой медицинского контроля в КП стал комплексный мониторинг, направленный на оценку текущего состояния здоровья космонавтов, динамическое наблюдение за основными функциями их организма и средой обитания, контроль процессов регуляции и адаптации к условиям жизнедеятельности. Структура медицинского мониторинга позволяет диагностировать неблагоприятные состояния, которые могут развиваться в полете, и при необходимости проводить экстренные обследования по показаниям. Разработана и эффективно функционирует система минимизации медицинских рисков при возможных отказах средств жизнеобеспечения и технических проблемах при полетных операциях. Также были разработаны режимы, средства и методы профилактики, апробированные в наземных экспериментах и реализованные в полетах. В сотрудничестве с О.Г. Газенко, А.С. Барером, Л.И. Какуриным, И.Б. Козловской, И.Д. Пестовым, Б.В. Моруховым и другими сотрудниками ИМБП разработана и успешно реализована на всех этапах длительных полетов система профилактических мероприятий. Бортовая система профилактики включает физические тренировки с использованием бегущей дорожки, велоэргометра и силовых тренажеров, создание нагрузки по продольной оси тела с помощью костюма «Пингвин», низкочастотную электростимуляцию мышц, воздействие отрицательного давления на нижнюю часть тела с помощью пневмовакуумного костюма «Чибис», лекарственные препараты и другие средства профилактики возможных нарушений функционального



состояния в космическом полете. Важным назначением системы на начальном этапе полета являются профилактика и купирование проявлений адаптационного синдрома, а на завершающем – мероприятия для предупреждения послеполетной ортостатической неустойчивости (ОДНТ и водно-солевые добавки).

Исследования, выполненные во время и после КП, показали, что российская система профилактики эффективна для предотвращения или снижения отрицательных эффектов воздействия невесомости и других неблагоприятных факторов длительных КП и стала основой для медицинского обеспечения экипажей международной космической станции.

**Корреспондент АН** – Скажите, а как построена система оказания медицинской помощи?

**А.И. Григорьев** – Бортовая система оказания медицинской помощи построена по нозологическому принципу. Она разрабатывалась на основе современных передовых достижений клинической медицины с учетом специфических условий космического полета. Российская система оказания медицинской помощи включает бортовую аптечку и набор лечебных и профилактических специализированных медицинских упаковок для неотложной помощи, упаковок с сердечно-сосудистыми средствами, желудочно-кишечными, с антисептическими и другими средствами. Набор средств медицинской помощи на ОС «Мир» и МКС обеспечивал в ряде случаев проведение лечебных мероприятий при острых и неотложных состояниях и повреждениях, что позволяло устанавливать диагнозы и контролировать целенаправленное лечение. В создание системы оказания медицинской помощи на орбитальных станциях существенный вклад внесли исследования, проведенные со-

вместно с И.П. Неумывакиным, Л.Л. Стажадзе, В.В. Богомоловым, И.Б. Гончаровым, А.Д. Егоровым и сотрудниками ряда клиник Москвы и Санкт-Петербурга.

**Корреспондент АН** – Анатолий Иванович, а как обстоит дело с внедрением новых дистанционных технологий в обеспечение медицинского контроля космонавтов?

**А.И. Григорьев** – Начиная с 1990-х годов совершенствуется и внедряется космическая телемедицина, что позволило значительно оптимизировать вопросы медицинского обеспечения во время КП и в местах посадки. Внедрение в практику КП методов телемедицины значительно дополняет возможности диагностики и анализа эффективности оказания медицинской помощи.

**Корреспондент АН** – А как Вы осуществляете контроль среды обитания? Радиационный контроль?

**А.И. Григорьев** – Большое внимание уделяется мониторингу среды обитания ОС, включая оценку качества воздушной среды и оперативный контроль концентраций токсичных веществ. Была разработана классификация уровней загрязнения среды и созданы средства индивидуальной защиты. В течение полетов регулярно осуществляется оценка качества воды и уровня микробной контаминации на борту. Регулярно оценивается уровень шумов в жилых отсеках ОС и разрабатываются способы отопротекции в случае его превышения. Были разработаны научно-методические материалы по обеспечению радиационной безопасности экипажей орбитальных комплексов, создана постоянно действующая Служба радиационной безопасности космических полетов, оснащенная средствами для непрерывного контроля радиационных условий на трассе полета и в обитаемых отсеках, включая оценку доз облучения и радиа-

ционного риска членов экипажа, разработку и реализацию рекомендаций по максимальному снижению радиационной опасности для экипажа. Учитывая перспективу межпланетных экспедиций, в последние годы мы большое внимание уделяем изучению влияния тяжелых заряженных ионов на живые системы.

**Корреспондент АН** – Является ли медицинская послеполетная реабилитация столь же острой проблемой сейчас?

**А.И. Григорьев** – Сотрудники ИМБП детально проанализировали изменения после длительных полетов в состоянии многих систем организма, которые требуют для своего восстановления проведения специальных мероприятий по реабилитации здоровья космонавтов в послеполетный период, усовершенствовали ряд средств и методов для послеполетной реабилитации, создали медико-эвакуационный комплекс и медицинскую аппаратуру для обследования и оказания медицинской помощи космонавтам на месте приземления, разработали методы оказания медицинской помощи после полета. Эти работы получили дальнейшее развитие в связи с полетами на МКС. Сотрудники ИМБП (Б.М. Федоров, Т.Д. Васильева, В.В. Богомолов) и ЦПК им. Ю.А. Гагарина (В.В. Моргун, В.И. Почуев, О.В. Котов) выполнили цикл исследований по разработке комплекса методов и средств восстановления здоровья космонавтов после длительных полетов, в котором используются индивидуальные схемы и режимы мероприятий в период реадаптации.

Основным итогом разработанной нами системы медицинского обеспечения здоровья экипажей в полетах на ОС «Мир» и МКС является сохранение здоровья и работоспособности членов экипажей для эффективного выполнения полетных программ, а также бла-

гоприятного течения реадaptации на фоне проведения адекватных восстановительно-лечебных мероприятий. Важно отметить активную роль космонавтов, особенно врачей-космонавтов, в реализации этой системы. Подтверждена эффективность российской системы медицинского отбора, оперативного медицинского контроля здоровья экипажей в длительных полетах, системы полетной профилактики и послеполетной реабилитации. Об этом также свидетельствует успешное осуществление сверхдлительных полетов, в том числе уникальных по сложности полетов В.В. Полякова (438 сут за один полет) и С.К. Крикалева (803 сут за шесть полетов).

**Корреспондент АН** – Анатолий Иванович, а как космическая медицина проходит путь от орбитальных станций к межпланетным полетам?

**А.И. Григорьев** – Достижения в создании и успешной эксплуатации российской системы медицинского обеспечения здоровья космонавтов в длительных космических полетах служат реальной предпосылкой для разработки концепции медико-биологического обеспечения межпланетных экспедиций. В ИМБП проводятся исследования и разработки в этом направлении. Наиболее значимым стал проведенный в 2010–2011 годах международный 520-суточный эксперимент по модели-

рованию межпланетного полета (проект «Марс-500»). В нем была отработана система медицинско-го обеспечения здоровья экипажа, смоделированы технологические операции по «высадке» на Марс, получены важные данные о динамике состояния основных систем организма в условиях длительной изоляции. Эксперимент получил высокую оценку мировой научной общественности.

**Корреспондент АН** – А можно ли использовать достижения космической медицины в клинической практике?

**А.И. Григорьев** – Мы активно предлагаем использовать наши достижения в практическом здравоохранении. Вместе с клиницистами ряда медицинских учреждений нам удалось добиться практической реализации в системе отечественного здравоохранения многих уникальных достижений, полученных во время КП и при моделировании жизнедеятельности организма в наземных условиях. В частности, совместно с И.Б. Козловской и Е.П. Тихомировым разработан ряд средств для профилактики и коррекции двигательных расстройств (специальные нагрузочные костюмы, средства нейромышечной стимуляции и др.), которые в ходе испытаний удалось адаптировать к потребностям клиники для детей с церебральным параличом (К.А. Семенова) и лиц, перенесших

черепно-мозговые травмы и инсульт (А.Б. Гехт, Л.А. Черникова, В.М. Шкловский и др.). Сейчас эти средства успешно «нарабатываются» на созданном при ИМБП производстве (И.В. Саенко).

Совместно с В.С. Огановым получены новые экспериментальные данные для анализа деструктивных и адаптивных процессов костных структур человека и сдвигов минерального обмена при снижении гравитационной нагрузки, разработана система коррекции нарушений опорно-двигательного аппарата при невесомости и гипокинезии.

**Корреспондент АН** – Анатолий Иванович, разрешите поздравить Вас с высокой правительственной наградой, поблагодарить за это интервью и пожелать новых творческих успехов в той области знаний, где наша страна долгие годы находилась на передовых рубежах и, судя по приведенным Вами данным, не сдает своих позиций и сегодня.

**А.И. Григорьев** – Спасибо за поздравление. Мне хотелось бы отметить, что эта работа – труд большого коллектива – не только ИМБП, но и всех сотрудников институтов и промышленных предприятий – нашей «кооперации», которую мне посчастливилось возглавлять многие годы. Хочу поблагодарить всех моих коллег и поздравить их с нашим общим успехом! ●

УДК 613.693

# Синдром нарушения колонизационной резистентности человека в искусственной среде обитания и его профилактика

В. К. Ильин, Н. В. Кирюхина\*

Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76А

\*E-mail: kiryukhina\_nataliya@hotmail.com

Поступила в редакцию 07.08.2013

После доработки 12.03.2014

**РЕФЕРАТ** Пребывание человека в среде с измененными параметрами сопровождается снижением колонизационной резистентности кишечника и покровных тканей, что приводит к дисбиотическим изменениям. Для коррекции дисбактериозов различной этиологии и локализации применяют пробиотики – препараты микрофлоры защитных групп. Однако эффективность пробиотика во многом зависит от адгезивной способности пробиотического штамма и отсутствия конкурентных отношений с индигенной микрофлорой, которые можно обеспечить путем индивидуального подбора препарата. Для оптимизации результатов профилактики и лечения предложено в качестве пробиотиков использовать аутомикрофлору человека. Применение индивидуализированного подхода к выбору препарата позволит повысить эффективность терапии, а также понизить риск развития неблагоприятных эффектов у каждого отдельного человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аутоштаммы, аутопробиотики, дисбактериоз, измененные условия обитания, нарушение колонизационной резистентности.

## ВВЕДЕНИЕ

При освоении человеком космоса, океана и земных недр создаются биоизолированные искусственные антропоэкосистемы с модифицированными параметрами среды обитания [1]. В этих условиях филогенетически сложившееся взаимоотношение коактантов экологической системы человек–микроорганизмы претерпевает существенные изменения. У человека оно принимает форму синдрома нарушения колонизационной резистентности. Поэтому не вызывает сомнения необходимость изучения состояния естественных барьеров колонизации, формируемых у человека, на пути инфекционного агента для выработки стратегии экологического подхода к проблемам профилактики инфекций у человека, находящегося в экстремальных условиях обитания.

van der Waaij дает следующее определение термина «колонизационная резистентность»: это «резистентность, с которой сталкиваются потенциально патогенные микроорганизмы при попытке колонизировать “места обитания” на слизистой оболочке одного из трех трактов, имеющих открытое сообщение с внешним миром: дыхательного, мочеполового и пищеварительного» [2]. Характеризуя инфекционную резистентность человека, van der Waaij называет

два основных ее барьера: барьер, сформированный комменсальной микрофлорой, и барьер, который образуется за счет факторов клеточного и гуморального иммунитета. В качестве естественного барьера В.М. Бондаренко указывает также эпителий слизистой оболочки, от физиологического состояния которого в значительной степени зависит возможность его пенетрации клетками возбудителя [3]. Исследования Noble позволяют причислить к барьерам колонизации и кожные покровы [4].

Необходимо подробнее остановиться на первом и основном барьере колонизации – барьере, сформированном микробными ассоциациями, состоящими из комменсалов человеческого организма. Система взаимоотношений как в самих этих ассоциациях, так и между ее коактантами и хозяином достаточно сложна. При заражении возбудитель попадает в организм в виде популяций генетически гетерогенных особей вместе с продуктами питания, водой, частицами капельного и пылевого аэрозолей и др. Формирование первичного инфекционного очага происходит путем вытеснения нормальной микрофлоры и захвата возбудителем нового ареала обитания. Адгезия, колонизация и последующее размножение возбудителя, синтезирующего токсические субстанции, обу-



словливают развитие в организме патоморфологических изменений, которые в случае представителей группы условно-патогенных микробов характеризуются отсутствием специфичности и мозаичностью поражения различных органов и тканей. При нарушении общей резистентности организма, снижении уровня защитной микрофлоры, увеличивается популяция условно-патогенных микроорганизмов, которые могут транслоцироваться в другие биотопы [5]. По аналогичному пути развивается эндогенная инфекция, этиологическим агентом которой является аутохтонная микрофлора.

Согласно современным представлениям, естественную микрофлору любых биотопов подразделяют по происхождению на постоянную (резидентную) и случайную (транзиторную). Если резидентная микрофлора включает в себя представителей, специфичных для данного биотопа, то транзиторная состоит из занесенных извне микроорганизмов. Резидентная микрофлора биотопа относительно стабильна, но физиологическая роль микроорганизмов, ее составляющих, далеко не равнозначна. Поэтому в резидентной микрофлоре различают облигатную и факультативную.

Облигатная микрофлора – главная составляющая любого микробиоценоза, она противодействует заселению биотопа случайными микроорганизмами, участвует в процессах ферментации, иммуностимуляции. Например, к облигатной микрофлоре толстого кишечника относят бифидобактерии, лактобациллы, типичные кишечные палочки, пептострептококки, зубактерии, большинство видов бактероидов и энтерококков [6]. Естественная микрофлора пищеварительного тракта выполняет важные физиологические функции: обеспечение колонизационной резистентности слизистой; стимуляция процесса формирования иммунной системы новорожденных и поддержание иммунного тонуса у взрослых при помощи мурамилпептида из клеточных стенок бактерий и других адьювантно-активных макромолекул; участие в обменных процессах (продукция ферментов, участвующих в метаболизме белков, липидов, нуклеиновых и желчных кислот), поддержание водно-солевого баланса, синтез витаминов группы В, К и D; регуляция газовой среды кишечника, участие в биохимических процессах пищеварения (ферментация пищевых субстратов, регуляция моторно-эвакуаторной функции кишечника); инактивация экзогенных и эндогенных токсических продуктов при помощи механизмов биотрансформации и биодеградации.

Присутствие в кишечнике достаточного количества прикрепленных к его стенке резидентных микроорганизмов предотвращает размножение патогенных

агентов, их инвазию в энтероциты и прохождение через кишечную стенку путем создания в своем биотопе рН-среды, неблагоприятной для посторонней микрофлоры, а также путем выработки бактериоцинов (антибиотических субстанций) и лишения конкурирующих микроорганизмов питательных веществ и мест адгезии. Полезная метаболическая активность включает продукцию витамина К, биотина, ниацина, пиридоксина и фолиевой кислоты; гидролиз желчных солей и холестерина, регуляцию его уровня; участие в рециркуляции гормонов. Дефицит полезной микрофлоры в кишечном микробиоценозе приводит к нарушению рециркуляции эстрогенов, секретирующихся в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) с желчью, и развитию соответствующих патологических состояний в женской половой сфере. Нормально функционирующая резидентная микрофлора контролирует продукцию токсинов в кишечнике, предупреждая их избыточную выработку и попадание в кровоток. В результате метаболизма резидентной микрофлоры, обладающей детоксицирующими и протеолитическими свойствами, в кишечнике происходит протеолиз эндотоксинов, аллергенов и антигенов. Это касается также всасывания в кишечнике частично переваренных белков, в том числе способствующих развитию пищевой непереносимости и сопутствующих ей кожных заболеваний. Естественно, при нарушении микробиоценоза эти субстанции попадают в кровь.

Заслуживает внимание детоксицирующая и защитная роль индигенной микрофлоры в предотвращении негативного влияния радиации, химических загрязнителей пищи, канцерогенных факторов, токсичных эндогенных субстратов, непривычной и экзотической пищи, загрязненной воды за счет стимулирования иммунного ответа и повышения неспецифической иммунорезистентности – потенцирования продукции интерферона, интерлейкинов, увеличения фагоцитарной способности макрофагов.

Необходимо подробнее остановиться на основных группах протективной микрофлоры, на основе которой в настоящее время создаются популярные пробиотические средства.

Бифидобактерии – основная группа бактерий кишечника, она составляет 25% всей микробной популяции в кишечнике взрослых и 95% у новорожденных. Бифидобактерии продуцируют уксусную и молочную кислоты. Развивающаяся как следствие этого кислая реакция среды создает антибактериальный эффект. Бифидобактерии способны выделять продукты метаболизма, которые непосредственно ингибируют развитие грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных микроорганизмов. Бифидобактерии превращают потенциально токсичный аммиак (или амины) в ион аммония  $\text{NH}_4^+$ ,

неспособный проникать через слизистую в кровоток. Более того, эти бактерии не образуют алифатических аминов, сероводорода и нитритов. Бифидобактерии продуцируют витамины, в основном группы В, а также пищеварительные ферменты, такие, как казеинфосфатаза и лизоцим. Бифидобактерии восстанавливают нормальную кишечную микрофлору после антибиотикотерапии [6].

Энтерококки, ранее относимые к стрептококкам группы D, – многочисленная группа бактерий рода *Enterococcus*, включающая виды *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. irae*, *E. malodoratus* и *E. mundtii*. В клиническом материале от человека встречаются *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gilvus* и *E. pallens*. У новорожденных энтерококки выявляются уже с первых дней жизни, и у детей первого года, находящихся на грудном вскармливании, их уровень колеблется от  $10^6$  до  $10^7$  КОЕ/г. У детей с искусственным вскармливанием уровень энтерококков может достигать  $10^8$ – $10^9$  КОЕ/г. Популяционный уровень энтерококков в кишечнике здорового человека остается стабильным, достигая  $10^7$ – $10^8$  КОЕ/г фекалий. Энтерококки находятся практически в каждом отделе кишечника. К основным свойствам энтерококков относятся: участие в синтезе витаминов и метаболизме сахаров (лактозы); иммуностимуляция – поддержка уровня цитокинов широкого спектра; высокая антагонистическая активность против стафилококков, листерий, кишечных палочек благодаря выработке бактериоцинов; противовоспалительные свойства; высокий уровень устойчивости к факторам внешней среды (температуре, рН). В норме количество энтерококков в кишечнике не должно превышать общее количество кишечных палочек [6].

Значительную долю популяции протективных групп микроорганизмов в большинстве биотопов человека формируют лактобациллы. Лактобациллы – грамположительные палочки, факультативные анаэробы. Лактобациллы различаются по потребности в питательных веществах и факторах роста. Лактобациллы обладают протеолитической активностью, обусловленной действием вырабатываемых протеаз, пептидаз; при помощи липолитической активности расщепляют жир молока и некоторые триглицериды; а с помощью экзонуклеазной активности синтезируют ДНК-азу и(или) РНК-азу, образуют псевдокаталазу; продуцируют ферменты, сбрасывающие гексозы, дисахариды и полисахариды. Антагонистическое действие лактобацилл обусловлено высокой кислотообразующей активностью, выработкой антибиотических веществ (например, ацидофилин – *Lactobacillus acidophilus*, лактолин – *L.*

*plantarum*, бревин – *L. brevis*), пероксида водорода, лизоцима [6].

Механизмы колонизационной резистентности организма можно разделить на прямые и непрямые. К прямым относятся продукция бактериями ингибиторов, нарушающих метаболизм патогенных и условно-патогенных бактерий, конкурентные взаимоотношения с патогенными бактериями за питательные субстраты, за места адгезии, прямую деградацию токсинов, антиэндотоксическое действие, препятствование транслокации микроорганизмов в другие участки организма. К непрямым эффектам относятся активация иммунной системы, стимуляция системы мононуклеаров, интерфероногенная функция, ингибирование конъюгации желчных кислот и др. Естественно, что множественность механизмов, обеспечивающих колонизационную резистентность, предполагает и многообразие вариантов, комбинаций в конкретных ситуациях, определяющих состояние колонизационной резистентности, которая, скорее всего, зависит от количества и качества микрофлоры и условий ее обитания.

Перечисленные выше функции, благотворно влияющие на здоровье человека, являются стабильными, если поддерживается качественное и количественное постоянство микрофлоры. Естественно также, что не все положительные функции микрофлоры представлены во всех биотопах или проявляются в одинаковой степени. Они определяются анатомо-физиологическими и биохимическими особенностями биотопов, т.е. желудочно-кишечного, урогенитального трактов, кожи, дыхательных путей и т.д.

#### **НАРУШЕНИЕ КОЛОНИЗАЦИОННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ**

В экстремальных условиях нарушаются барьерные функции организма, связанные с нормальным функционированием кожи, кишечника и слизистых оболочек, непосредственно контактирующих с окружающей средой [7]. Показано, что при стрессовых воздействиях (психоэмоциональных и физических) наблюдаются активация эндогенной микрофлоры в кишечном резервуаре, проникновение бактерий в кровяное русло с последующим выведением через мочевые пути [8]. Если воздействующие факторы, прямо или опосредованно влияющие на фиксацию, выживание и функционирование нормальной микрофлоры, по своей интенсивности превышают компенсаторные механизмы экосистемы макроорганизм–микрофлора, то они будут индуцировать микроэкологические нарушения, характер проявления, степень выраженности и длительность которых зависят от дозы и продолжительности воз-



Рис. 1. Схема развития синдрома колонизационной резистентности в условиях космического полета

действия. Способность противостоять повреждающим воздействиям зависит от многих условий, характеризующих состояние организма. Результаты обследования космонавтов, водолазов, спортсменов выявили признаки развития вторичного иммунодефицита и нарушения регуляторных механизмов. Реакция каждого индивида зависела от его генетического и иммунологического потенциала, а также от состояния микробиоценоза [9, 10].

В настоящее время синдром нарушения колонизационной резистентности рассматривается как патологическое состояние, которое выявляется у людей экстремальных профессий – космонавтов, водолазов, подводников, кессонщиков и др. Дисбактериоз – одно из важнейших проявлений синдрома нарушения колонизационной резистентности, характеризуется исчезновением или снижением количества некоторых облигатных представителей нормальной микрофлоры, увеличением частоты выявления концентрации представителей факультативной микрофлоры и возможности появления необычных для данного биотопа видов бактерий.

Весь комплекс факторов, воздействующих на организм человека и животных в космических полетах или длительных погружениях методом сатурации, достаточно необычен, к нему нет каких-либо эволюционно выработанных адаптационных приспособлений [11]. Кроме того, имеются данные о причастности

нервно-функционального напряжения, гипокинезии, повышенных физических нагрузок, длительного пребывания в условиях изоляции с измененными параметрами газовой среды и микроклимата к формированию дисбактериоза [12]. В этих же исследованиях показано, что при нервно-эмоциональном напряжении имеет место снижение количества бифидобактерий и лактобацилл, в отдельных случаях до их полной эрадикации. Изменения в аэробной микрофлоре в сторону повышения содержания отдельных ее представителей происходят и под влиянием повышенных физических нагрузок. Выраженные изменения в микрофлоре возникают и у людей при пребывании в гермокамере с измененными параметрами газовой среды и микроклимата. Это общие изменения микрофлоры кишечника, возникающие при пребывании человека в экстремальных ситуациях, а пусковым механизмом развития дисбактериоза является снижение количества бифидобактерий и лактобацилл. Степень выраженности дисбиотической перестройки микрофлоры в значительной степени определяется исходным состоянием микробиологического статуса.

Характер изменений при стрессе обсуждается в обзоре Н.Н. Лизько [13]. Стрессовые ситуации создают условия для изменения адгезивных свойств бактерий и клеточной адгезивности макроорганизма. Например, физико-химическое состояние кишечного





Рис. 2. Схема развития синдрома колонизационной резистентности в условиях наземных гермопомещений

муцина может быть нарушено желчными кислотами, протеолитическими ферментами и изменениями pH. Резкую редукцию мукозной составляющей (муцина) и снижение кислых мукополисахаридов на поверхности мукозного слоя и покрывающих его клеток считают показателем стрессовой реакции. Имеются прямые доказательства существования некоторой предрасположенности к изменению адгезии во время стресс-индуцированных сдвигов в процессах пищеварения. Выявлены значительные изменения иммунореактивности в ответ на стресс-активацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы. Снижение иммунологической резистентности может влиять на топографическое распределение некоторых микробных популяций в ЖКТ. Следствие этого – эндогенная контаминация и метаболические последствия усиленного бактериального роста в тонком кишечнике.

Таким образом, синдром нарушения колонизационной резистентности развивается практически во всех случаях использования человеком искусственно измененной среды обитания. При этом развитие этого синдрома определяется как специфическими факторами, т.е. факторами измененной среды обитания (радиация, микрогравитация, гипокинезия для космических полетов; сочетанное воздействие измененной газовой среды и повышенного давления для сатурационных длительных погружений и др.),

так и неспецифическими, главным образом, стресс-индуцированными факторами и факторами замкнутого объема. Они воздействуют практически на все барьеры колонизации.

Так, в условиях космического полета (рис. 1) комплекс специфических (микрогравитация, гипокинезия, радиационный фон, колонизация бактериально-грибковыми ассоциациями элементов среды обитания) и неспецифических (стресс, факторы замкнутого объема) факторов оказывает влияние на состояние всех трех барьеров колонизации. Усиленный микробный обмен, экзогенная контаминация, стресс-индуцированный дисбактериоз и усиление потенциала патогенности в системе человек-микроорганизмы ведут к ослаблению первого барьера, формируемого протективной микрофлорой. Второй барьер (эпителий покровных тканей и слизистых оболочек) также теряет протективные функции из-за ряда патофизиологических процессов (перераспределение жидкостей, нарушение кальциевого обмена, усиление десквамации эпителия, нарушение физиологической функции кишечника). Третий барьер, представленный факторами клеточного и гуморального иммунитета, также нарушается, что выражается в изменении фагоцитоза, бактерицидной активности сыворотки, понижении активности киллерных клеток и снижении продукции интерлейкинов, активации остеокластактивиру-

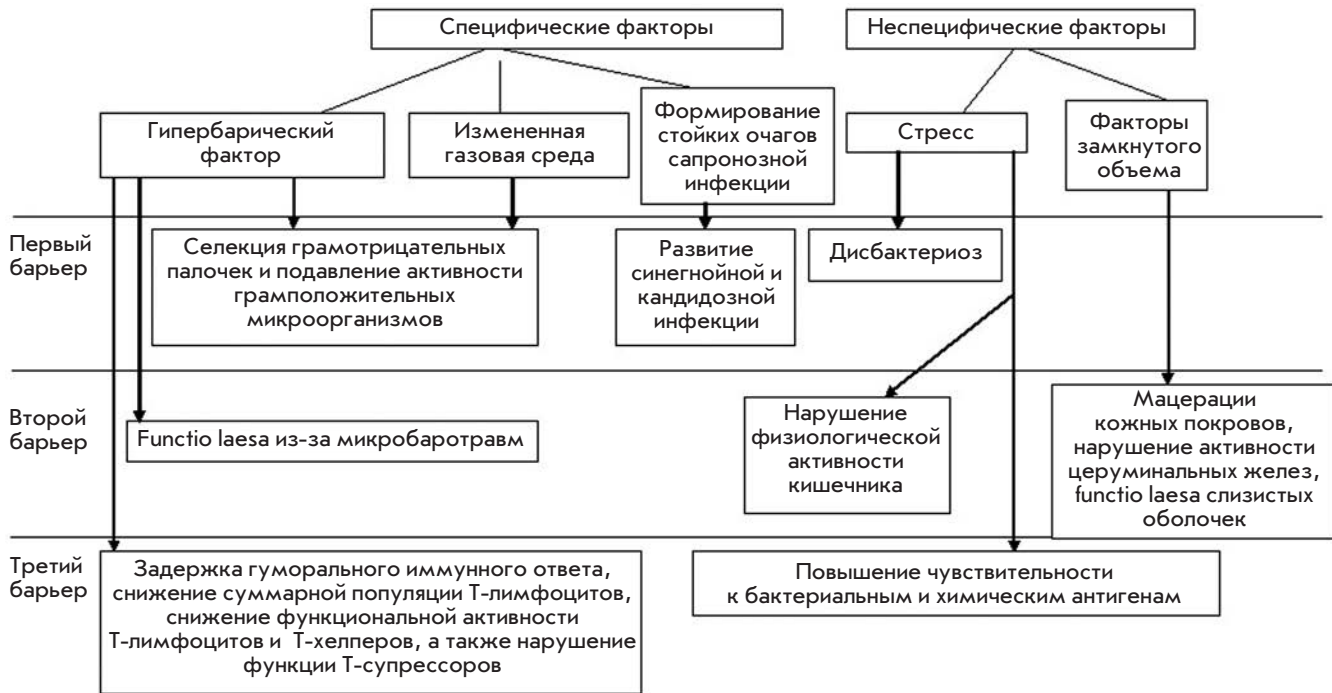


Рис. 3. Схема развития синдрома колонизационной резистентности в условиях гипербарии

ющего фактора и развитию токсико-аллергических состояний.

В условиях эксплуатации обитаемых наземных гермопомещений (рис. 2) специфические факторы среды (увеличение концентрации продуктов метаболизма, дезадаптация, ограничение гигиенических процедур) и стресс способствуют усилению микробного и как результат плазмидного обмена, что приводит уже в первые дни изоляции к спонтанному формированию штаммов по типу госпитальных, увеличению массивности микробных очагов, замене менее вирулентных штаммов на более вирулентные в пределах одного вида, системным дисбактериозом и др. Физиологический статус покровных тканей также нарушается. Нарушается и иммунитет, что выражается в снижении функциональной активности Т-лимфоцитов и цитотоксической активности естественных киллерных Т-клеток; уменьшении продукции интерлейкина 2; повышении уровня иммуноглобулинов класса А, М, G; ослаблении фагоцитоза и бактерицидной активности сыворотки крови; повышении чувствительности к бактериальным и химическим антигенам.

Наиболее выраженным и опасным является формирование синдрома нарушения колонизационной резистентности в условиях длительных погружений методом сатурации (рис. 3), при котором комплекс специфических факторов (сочетанное влияние ги-

пербарической среды и измененного газового состава) оказывает мощное активизирующее воздействие на условно-патогенную микрофлору и ингибирующее – на протективную микрофлору. Как следствие, проявления синдрома нарушения колонизационной резистентности развиваются линейно, в зависимости от длительности срока изопрессии и величины давления, и на фоне интенсивной колонизации среды обитания инфекционными агентами сапронозного типа, главным образом синегнойной палочкой. Барьерные функции покровных тканей также нарушены из-за микробаротравм, мацерации эпителия, пониженной активности церуминальных желез в наружных слуховых проходах, которые становятся *locus minoris resistentiae* для инфекций. Весьма часто инфекции в условиях длительных погружений манифестируют в виде наружных отитов, что приводит к преждевременной декомпрессии заболевших по медицинским показаниям (табл. 1) [7].

**МЕТОДЫ ПРОФИЛАКТИКИ СИНДРОМА НАРУШЕНИЯ КОЛОНИЗАЦИОННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ**

С целью предотвращения развития и лечения дисбактериозов различной этиологии широко используют различные коммерческие пробиотические препараты, основанные на коллекционных штаммах микроорганизмов. Тем не менее известно, что внедряемые в организм пробиотики способны вызывать

**Таблица 1.** Развитие синдрома нарушения колонизационной резистентности в сатурационном длительном погружении, проявляющееся изменениями процентного соотношения протективной и условно-патогенной микрофлоры покровных тканей и кишечника

Этап	Сутки исследований	Группа микроорганизмов, %		
		протективные грамположительные	условно-патогенные грамотрицательные	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Фон	0	90.3	4.8	0
Изопрессия	1–3	67.3	11.5	9.6
	5–8	62.5	32.8	25.0
	11–13	39.6	31.0	20.6
Декомпрессия	18–22	25.0	31.0	25.8
	24–28	38.7	40.3	29.0
Выход	30–34	68.5	28.5	22.8

дисбаланс в аутофлоре хозяина вследствие антагонизма индигенных и промышленных штаммов [14]. Некоторые исследования показывают, что пробиотики, основанные на промышленных штаммах, отторгаются вследствие биологической несовместимости [15]. Возрастает количество сообщений о негативных эффектах терапии пробиотическими препаратами, содержащими промышленные штаммы. Большая часть публикаций содержит информацию об инфекционных осложнениях, связанных с употреблением коммерческих пробиотиков. Как правило, подобные негативные эффекты развиваются у ослабленных, возрастных, иммунокомпрометированных пациентов. Данный факт следует всегда учитывать при использовании средств пробиотической коррекции.

Развернутая информация об осложнениях пробиотикотерапии как бактериальной, так и грибковой этиологии, представлена в обзоре [16] и частично отражена в табл. 2.

Помимо соответствия стандартам генетической безопасности и устойчивости к антибактериальным агентам, эффективность пробиотика определяется и его адгезивной активностью, отсутствием конкурентных отношений с индигенной микрофлорой, а также антагонистическими свойствами в отношении условно-патогенных микроорганизмов, что может быть в определенной степени обеспечено путем индивидуального подбора пробиотического препарата [26]. Очевидно, что наиболее высокая степень индивидуализации биопрепарата достигается при использовании аутоштаммов микроорганизмов, выделенных из микробиоценозов конкретного человека.

Б.А. Шендеров утверждает, что еще в период внутриутробного развития в организме ребенка формируется иммунологическая толерантность к нормальной микрофлоре матери [27]. Известно, что различие

в адгезивной способности промышленных и аутологичных штаммов к клеткам эпителия зависит от соответствия рецепторов данного конкретного штамма рецепторам клеток [28–30]. Например, установлено, что вагинальные лактобациллы лучше прикрепляются к клеткам вагинального эпителия по сравнению со штаммами, выделенными из других источников [28, 29].

Изучением защитной роли аутобактерий при стрессовых состояниях занимался Б.А. Бердичевский [8]. Экспериментально показана активация аутомикрофлоры при хирургическом стрессе, которая проявляется в транслокации аутобактерий в экстраинтестинальные биотопы с последующей элиминацией через мочевыводящие пути.

Ряд авторов предлагает использовать в качестве препаратов полноценные микробиоценозы человека [31–33]. Для бесконечно долгой сохранности микрофлоры рекомендуется хранение биоматериала в криобанках с последующим использованием для конструирования аутопробиотиков и продуктов функционального питания [31, 32]. В патенте «Способ получения банка аутохтонных штаммов микроорганизмов для восстановления кишечного микробиоценоза человека» описывается методика создания препарата аутологичных кишечных микроорганизмов [33]. Способ включает отбор проб фекалий одного и того же организма в период его клинически здорового состояния начиная с 7–15 дня после рождения и в течение всей жизни периодически не чаще 1 раза в год. Из проб выделяют и идентифицируют аутоштаммы нормальной кишечной микрофлоры. Биомассу каждого вида бактерий отдельно нарабатывают на селективных питательных средах до титра не менее  $10^3$ – $10^9$  кл/мл. Полученные биомассы объединяют и добавляют стабилизирующий



Таблица 2. Случаи бактериального и грибкового сепсиса, хронологически связанные с применением пробиотиков\*

Форма сепсиса	Возраст больного, лет	Факторы риска	Пробиотик	Метод идентификации	Ссылка
Абсцесс печени	74	Сахарный диабет	LGG**	API 50 CH***, PFGE	[17]
Эндокардит	67	Митральная недостаточность, экстракция зубов	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , 3 × 10 <sup>9</sup> КОЕ в день	API 50 CH, масс-спектрометрия	[18]
Бактериемия	11 мес.	Недоношенность, гастростомия, синдром короткого кишечника, ЦВЦ, парентеральное питание, ротавирусная диарея	LGG, 1/4 капсулы в день	Секвенирование рРНК	[19]
Эндокардит	4 мес.	Операция на сердце, антибиотик-ассоциированная диарея	LGG, 10 <sup>10</sup> КОЕ в день	ДНК-дактилоскопия	[20]
Бактериемия	47	Не указано	<i>Bacillus subtilis</i> , 8 × 10 <sup>9</sup> спор в день	Чувствительность к антибиотикам	[21]
Бактериемия	73	Хронический лимфолейкоз	<i>B. subtilis</i> , 8 × 10 <sup>9</sup> спор в день	Секвенирование 16S рРНК	[22]
Фунгемия	3 мес.	ЦВЦ, диарея, парентеральное питание	<i>Saccharomyces boulardii</i> , 100 мг в день****	PFGE митохондриальной ДНК	[23]
Фунгемия	51	Хронический лимфолейкоз	<i>S. boulardii</i> , 1 г в день	PFGE	[24]
Фунгемия	42	Трансплантация почки и поджелудочной железы, иммуносупрессия, диарея, ассоциированная с <i>Clostridium difficile</i>	<i>S. boulardii</i> , 1 г в день	PFGE	[25]

Примечание. ЦВЦ – центральный венозный катетер, рРНК – рибосомная РНК, PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) – гель-электрофорез в пульсирующем поле, LGG – *Lactobacillus rhamnosus* GG, КОЕ – колониобразующая единица.

\*Цитируется по [16].

\*\*Если доза препарата не указана, то в оригинальной публикации точная дозировка препарата отсутствует.

\*\*\*Набор для идентификации *Lactobacillus* spp., BioMerieux.

\*\*\*\*250 мг *S. boulardii* = 5.425 × 10<sup>13</sup> живых клеток.

состав. Смесь разделяют на образцы. Каждый образец консервируют и хранят в течение жизни человека с периодическим контролем биотитра. В возрасте до 1 года в качестве нормальной кишечной микрофлоры выделяют преимущественно бифидобактерии *Bifidobacterium bifidum*, *B. brevis*, *B. infantis* и лактобактерии *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermenti*. В возрасте старше 1 года в качестве нормальной кишечной микрофлоры выделяют преимущественно бифидобактерии вида *B. longum*, *B. adolescentis*, лактобактерии *L. acidophilus*, *L. fermenti*, *L. plantarum*, штаммы *Escherichia coli* и молочнокислые стрептококки преимущественно *Streptococcus faecium*, *Str. faecalis*, *Str. avium*, *Str. salivarius* и *Str. bovis*. В процессе хранения после контроля биотитра дополнительно объединяют в равных соотношениях часть образцов аутоштаммов бактерий, выделенных из нормальной кишечной микрофлоры человека в разные периоды его жизни. Введение в кишечник человека образцов банка аутоштаммов микроорганизмов позволяет одновременно воздействовать на различные звенья нарушенного

бактериоценоза кишечника за счет использования более полного спектра нормальной микрофлоры кишечника [33].

Методика получения аутопробиотической закваски на основе энтерококков описана в патенте «Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина» [34]. Новизна предлагаемого способа приготовления молочнокислой закваски заключается в том, что продукт получают из собственного (аутопробиотического) штамма *E. faecium* – обитателя желудочно-кишечного тракта данного пациента. Способ отличается тем, что после отбора характерных по морфологии колоний и непосредственно перед получением продукта проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с определением вида энтерококка и генетических детерминант патогенности, что предлагается впервые. Данный способ обеспечивает абсолютную безопасность готового продукта для человека. Способ отличается высокой скоростью получения готовой закваски (4–6 сут с момента взя-

тия материала). Для выделения индигенных энтерококков из фекалий для создания аутопробиотических молочнокислых заквасок необходимо осуществить следующий алгоритм действий: высеять бактерии из фекалий пациента на селективные среды, идентифицировать родовую принадлежность штамма, провести ПЦР для определения вида энтерококка и возможного содержания факторов патогенности, отобрать клоны, удовлетворяющие требованиям генетической безопасности и физиологической функциональности, депонировать индивидуальные штаммы энтерококков в криохранилище, получить молочнокислую закваску [34].

В 2006 году Ван Ликуй детально рассмотрел метод лечения бактериальных вагинозов с использованием аутохтонных микроорганизмов [35]. Применение коммерческого препарата лактобактерин в виде вагинальных суппозиториях вызывало улучшение в составе вагинальной микрофлоры, но не приводило к полному восстановлению молочнокислой флоры, вследствие низкой приживляемости лактобактерий кишечного происхождения во влагалище. Было предложено корректировать нарушения микробиоценоза с помощью аутоштаммов лактобактерий, выделенных из влагалища пациенток. Местный препарат аутоштаммов лактобактерий в виде суппозиториях применяли после проведения курса антибактериальной терапии, что обеспечивало успешную приживляемость пробиотика и существенно снижало риск рецидива бактериального вагиноза. Аналогичный метод успешно использовали для восстановления нарушенного микробиоценоза влагалища беременных женщин после антибиотикотерапии пиелонефрита [36].

Показано [37], что коммерческий бактериальный препарат «Ацилакт» быстро элиминируется из влагалищной среды. Проведено рандомизированное двойное слепое исследование применения коммерческих и аутологичных лактобацилл, которое продолжалось в течение 12 мес. Для исследования были выбраны 165 женщин с бактериальным вагинозом. Контрольные осмотры проходили 132 пациентки: 70 из группы применявших собственные лактобациллы (группа I) и 62 – из группы применявших пробиотик «Ацилакт» (группа II). Терапевтическую эффективность оцени-

вали с применением критериев клинического улучшения, восстановления микробиоценоза влагалища и исчезновения объективных симптомов, сопровождающих эту инфекцию. Профилактическую эффективность определяли по числу повторных инфекций в течение всего периода наблюдения. Динамика восстановления биоценоза влагалища до нормоценоза различалась статистически значимо в зависимости от способа восстановления. При использовании культуры собственных лактобактерий уже через 3 мес. у большинства женщин (82,2%) формировался нормоценоз, максимальные значения (88,7%) наблюдались к 6 мес. после лечения, к концу исследования прирост составил всего 1,5%. При использовании препарата «Ацилакт» нормоценоз восстанавливался к 3 мес. у 61,7% пациенток, к 6 мес. – у 71,4% и к 12 мес. – у 78%. Темп и объем восстановления в группе II статистически значимо отличался от значений в I группе ( $p \leq 0,05$ ). Результаты проведенных исследований показали, что лактобациллы обладают генетической гетерогенностью, обуславливающей определенную специфичность по отношению к хозяину [37].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение индигенных штаммов микроорганизмов защитных групп с целью коррекции дисбиозов изучено рядом авторов [31–43]. Крайне актуальным представляется использование аутоштаммов для профилактики и лечения дисбактериозов у лиц экстремальных профессий – космонавтов, летчиков, водолазов, спортсменов, спасателей. Отсутствие проблем развития инфекционных осложнений, биологической несовместимости и приживляемости позволяет предположить возможность применения аутопробиотиков в лечении новорожденных, пожилых людей и пациентов с иммуносупрессией. В настоящее время концепция создания криобанков микробиоценозов человека и аутопробиотиков может рассматриваться как отдельная часть персонализированной медицины. Применение индивидуализированного подхода к выбору препаратов позволит повысить эффективность профилактики и лечения, а также понизить риск неблагоприятных эффектов у каждого отдельного человека. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьев А.И., Газенко О.Г. // Вестн. РАН. 1980. № 2. С. 71–75.
2. van der Waaij D. // *Nahrung*. 1987. V. 31. № 5–6. P. 507–517.
3. Бондаренко В.М., Жалко-Титаренко В.П. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1991. № 8. С. 23–27.
4. Noble W.C. // *Curr. Probl. Dermatol*. 1989. V. 18. P. 37–41.
5. Berg R.D. // *Jikken Dobutsu*. 1985. V. 34. № 1. P. 1–16.

6. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. М.: МИА, 2002. 736 с.
7. Ильин В.К., Воложин А.И., Виха Г.В. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания. М.: Наука, 2005. 280 с.
8. Бердичевский Б.А. Аутобактерии, стресс и человек (антология одного наблюдения). М.: Мед. книга, 2001. 207 с.
9. Григорьев А.И., Тоневский А.Г. // Молекуляр. медицина. 2008. № 3. С. 29–40.

10. Лизько Н.Н. // Тез. докл. 6 Всерос. съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. Нижний Новгород. М., 1991. Т. 2. С. 107.
11. Григорьев А.И. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2007. Т. 93. № 5. С. 473–484.
12. Лизько Н.Н. // Вестн. РАМН. 1996. № 8. С. 31–34.
13. Лизько Н.Н. // Антибиотики и мед. биотехнология. 1987. Т. 32. № 3. С. 184–186.
14. Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2005. № 2. С. 56–61.
15. Boirivant M., Strober W. // Curr. Opin. Gastroenterol. 2007. V. 23. № 6. P. 679–692.
16. Boyle R.J., Robins-Browne R.M., Tang M.L.K. // Am. J. Clin. Nutr. 2006. V. 83. № 6. P. 1256–1264.
17. Rautio M., Jousimies-Somer H., Kauma H., Pietarinen I., Saxelin M., Tynkkynen S., Koskela M. // Clin. Infect. Dis. 1999. V. 28. № 5. P. 1159–1160.
18. Mackay A.D., Taylor M.B., Kibbler C.C., Hamilton-Miller J.M. // Clin. Microbiol. Infect. 1999. V. 5. № 5. P. 290–292.
19. DeGroot M.A., Frank D.N., Dowell E., Glode M.P., Pace N.R. // Pediatr. Infect. Dis. J. 2005. V. 24. № 3. P. 278–280.
20. Land M.H., Rouster-Stevens K., Woods C.R., Cannon M.L., Cnota J., Shetty A.K. // Pediatrics. 2005. V. 115. № 1. P. 178–181.
21. Richard V., van der Auwera P., Snoeck R., Daneau D., Meunier F. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1988. V. 7. № 6. P. 783–785.
22. Oggioni M.R., Pozzi G., Valensin P.E., Galieni P., Bigazzi C. // J. Clin. Microbiol. 1998. V. 36. № 1. P. 325–326.
23. Perapoch J., Planes A.M., Querol A., Lopez V., Martínez-Bendayan I., Tormo R., Fernandez F., Peguero G., Salcedo S. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2000. V. 19. № 6. P. 468–470.
24. Bassetti S., Frei R., Zimmerli W. // Am. J. Med. 1998. V. 105. № 1. P. 71–72.
25. Riquelme A.J., Calvo M.A., Guzman A.M., Depix M.S., Garcia P., Perez C., Arrese M., Labarca J.A. // J. Clin. Gastroenterol. 2003. V. 36. № 1. P. 41–43.
26. Оришак Е.А., Бойцов А.Г., Нилова Л.Ю. // Патент № 2428468 РФ. С12N1/20, А61К35/74. 2010.
27. Шендеров Б.А. // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1998. Т. 8. № 1. С. 61–65.
28. Kirjavainen P.V., Ouwehand A.C., Isolauri E., Salminen S.J. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 167. № 2. P. 185–189.
29. Boris S., Suraz J.E., Vazquez F., Barbes C. // Infect. Immun. 1998. V. 66. № 5. P. 1985–1989.
30. Бойцов А.Г., Рищук С.В., Ильясов Ю.Ю., Гречанинова Т.А. // Вестн. Санкт-Петербургской мед. акад. им. И.И. Мечникова. 2004. Т. 4. № 5. С. 191–193.
31. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. // Патент № 2139070 РФ. А61К35/00. 1999.
32. Шендеров Б.А. // Вестн. восстановительной медицины. 2003. № 1. С. 29–31.
33. Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г. // Патент № 2126043 РФ. С12N1/00. 1999.
34. Суворов А.Н., Симаненков В.И., Сундукова З.Р., Ермоленко Е.И., Цапиева А.Н., Донец В.Н., Соловьёва В.И. // Патент № 2460778 РФ. С12N1/20. 2012.
35. Ван Ликуй. Использование пробиотиков и аутоштаммов лактобактерий в комплексном лечении бактериального вагиноза. М.: ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, 2006.
36. Высоцких Т.С., Беккиева М.Х., Тикина А.П. // Мат. IX Всерос. научного форума «Мать и дитя». М., 2007. С. 43.
37. Мельников В.А., Стулова С.В., Тюмина О.В., Денисова Н.Г., Шукин В.Ю. // Фундаментальные исследования. 2012. № 1. С. 64–67.
38. Коршунов В.М., Смеянов В.В., Ефимов Б.А. // Вестн. РАМН. 1996. № 2. С. 60–65.
39. Симаненков В.И., Суворов А.Н., Донец В.Н., Ермоленко Е.И., Сундукова З.Р. // Мат. Всерос. конф. гастроэнтерологов Юго-Западного региона. Ростов-на-Дону, 2009. С. 83–87.
40. Сундукова З.Р., Донец В.И. // Актуальные вопр. клинической и эксп. медицины: Сб. тез. к научно-практической конференции молодых ученых. СПб., 2009. С. 62.
41. Ильин В.К., Суворов А.Н., Кирюхина Н.В., Усанова Н.А., Старкова Л.В., Бояринцев В.В., Карасева А.Б. // Вестн. РАМН. 2013. № 2. С. 56–62.
42. Кирюхина Н.В. Применение пробиотиков в целях коррекции микрофлоры верхних дыхательных путей. М.: ГБУЗ МНПЦО ДЗМ, 2009.
43. Pyin V.K., Kirjukhina N.V., Usanova N.A., Tiurina D.A. // Proc. 3rd Int. probiotic conf. Košice (Slovakia), 2008. P. 17.



УДК 581.1

# Биотехнологические подходы в создании растений, толерантных к гипоксии и аноксии

Б. Б. Вартапетян<sup>1</sup>, Ю. И. Долгих<sup>1</sup>, Л. И. Полякова<sup>1</sup>, Н. В. Чичкова<sup>2</sup>, А. Б. Вартапетян<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

E-mail: borisvartapet@ipppras.ru

Поступила в редакцию 06.08.2013

После доработки 19.03.2014

**РЕФЕРАТ** Представлены результаты ряда работ, направленных на создание клеточных линий, а также целых растений, устойчивых к анаэробному стрессу. В основу разработанных биотехнологических подходов легли более ранние фундаментальные исследования анаэробного стресса растений, поэтому во «Введении» кратко отмечена актуальность самой проблемы, подчеркнута значимость работ, в которых рассмотрены две главные стратегии адаптации растений к анаэробному стрессу – адаптации на молекулярном уровне, в которой ключевую роль играет анаэробный энергетический метаболизм (истинная толерантность), и адаптации на уровне целого организма растений путем формирования аэренхимы и облегченного транспорта кислорода (кажущаяся толерантность). Так, путем ступенчатой клеточной селекции *in vitro*, проведенной в условиях аноксии в отсутствие экзогенных углеводов, были выделены толерантные к анаэробному стрессу клетки сахарного тростника и пшеницы. Из толерантных клеток пшеницы были регенерированы целые растения, более устойчивые к корневому анаэробно-биозу. Показано, что в толерантности клеток к аноксии существенную роль играет способность более активно утилизировать экзогенный нитрат. Толерантность клеток закреплялась на генном уровне и передавалась в ряду поколений. Рассмотрены также другие успешные попытки повысить толерантность растений к анаэробному стрессу путем сверхэкспрессии генов, ответственных за синтез цитокинина и за программированную клеточную смерть, а также благодаря стимуляции гликолиза. Представленные данные подтвердили концепцию о двух главных стратегиях адаптации растений к анаэробному стрессу, выдвинутую ранее на основе фундаментальных исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** анаэробный стресс, индекс роста, клеточная селекция *in vitro*, программированная клеточная смерть, трансгенные растения, ультраструктура митохондрий.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ПДК – пируватдекарбоксилаза; АДГ – алкогольдегидрогеназа.

## ВВЕДЕНИЕ

Растения – облигатные аэробы, поэтому дефицит кислорода в среде (гипоксия), а особенно его полное отсутствие (аноксия), вызывают экстремальный экологический стресс. Между тем, в естественных условиях, а также в результате деятельности человека растения нередко подвергаются резкому дефициту молекулярного кислорода. Чаще всего кислородную недостаточность растения испытывают на переувлажненных и затопленных почвах, ввиду малой растворимости и низкой скорости диффузии кислорода в воде [1, 2]. В настоящее время переувлажненные земли занимают обширные территории во многих странах [3–5]. Предполагается, что таяние в зоне вечной мерзлоты,

а также полярных льдов и, как следствие этого, подъем уровня Мирового океана могут привести к затоплению обширных регионов нашей планеты. Дефицит кислорода наблюдается также на плотных почвах [6]. Наиболее уязвимы в этом отношении корни и семена растений. В северных странах и в странах с умеренным климатом из-за образования газонепроницаемой ледяной корки на поверхности почвы или растений в осенний и зимний периоды страдают озимые злаки и многолетние растения [7]. Анаэробный стресс приводит к повреждению и даже к массовой гибели сельскохозяйственных культур и дикорастущих растений, нанося тем самым существенный экологический и экономический ущерб.

Проблема гипоксии и аноксии актуальна и в связи с необходимостью длительного хранения сельскохозяйственных продуктов: плодов, зерна, овощей [8].

В последние десятилетия интерес к изучению анаэробного стресса растений резко повысился не только у физиологов и биохимиков, но и у молекулярных биологов и генетиков. Постоянно увеличивается количество публикаций, а также проводимых под эгидой Международного общества по анаэробному стрессу растений (ISPA) конференций, посвященных изучению гипоксии и аноксии растений. Проблема анаэробного стресса обсуждается в многочисленных специальных выпусках международных журналов (см. *Annals of Botany* (special section). 1994. V. 74. № 3. Ed. Jackson M.B.; *Annals of Botany* (special Issue). 1997. V. 79. Ed. Jackson M.B.; *Annals of Botany* (special section). 2002. V. 90. № 4. Ed. Smirnov N.; *Annals of Botany* (special Issue). 2003. V. 91. Eds Visser E., Voeselek L.A.C.J., Jackson M.B.; Физиология растений (специальный выпуск). 2003. Т. 50. № 6. Ред. Вартапетян Б.Б.; *Annals of Botany* (special Issue). 2005. V. 96. Ed. Jackson M.B.; *Annals of Botany* (special Issue). 2009. Eds Jackson M.B., Ishizawa K., Ito O.; *New Phytologist* (special Issue). 2011. V. 190. № 2. Eds Perata P., Armstrong W., Voeselek L.A.C.J.), а также в ряде монографий [9–14], подготовленных членами ISPA, которые сыграли важнейшую роль в дальнейшем развитии этого направления науки.

Активно разрабатывается общепризнанная в настоящее время концепция о двух главных стратегиях адаптации растений к анаэробному стрессу: адаптации на молекулярном уровне, которая реализуется в отсутствие или при дефиците кислорода благодаря капитальной перестройке клеточного метаболизма, и адаптации на уровне целого растения благодаря транспорту кислорода из аэрируемых частей растения в органы (корни, корневище), которые находятся в бескислородной среде, т.е. стратегии избегания, обхода анаэробного стресса. Становится все более очевидной ключевая роль энергетики клетки как в метаболической адаптации, так и в повреждении растений в условиях анаэробного стресса.

Высокая чувствительность растений к дефициту кислорода, особенно к полному его отсутствию, объясняется тем, что высшие растения, будучи облигатно аэробными, для нормальной жизнедеятельности нуждаются в постоянном присутствии доступного молекулярного кислорода в окружающей их внешней среде.

Тем не менее многие виды растений, преимущественно дикорастущие, в процессе эволюции приобрели способность к временному или постоянному обитанию на переувлажненных и даже затопленных анаэробных почвах [15, 16]. Среди культурных

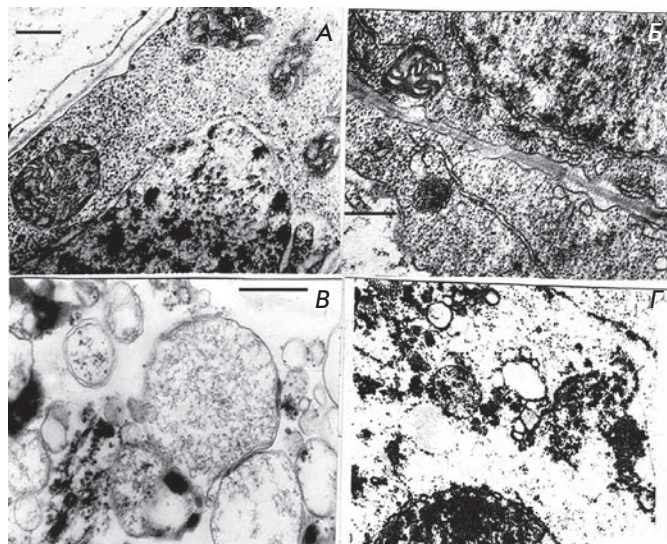
растений исключением является рис *Oryza sativa* L., который, как известно, выращивается преимущественно на затопленных почвах [17–19]. Однако даже растения риса нередко сильно страдают от анаэробного стресса, когда проростки оказываются полностью затопленными, как это бывает в муссонный период в Восточной и Юго-Восточной Азии [20].

Выработанная в процессе эволюции или искусственной селекции способность многих растений временно или постоянно обитать на затопленных анаэробных почвах свидетельствует об актуальности и целесообразности как фундаментальных исследований в этой области, направленных на выяснение молекулярных механизмов адаптации растений, так и прикладных подходов, в частности биотехнологических методов (генная и клеточная инженерия) создания толерантных к анаэробному стрессу растений. Исследования в этой области были, однако, в основном фундаментальными, они подготовили серьезную базу для того, чтобы перейти к более активному изучению прикладных проблем анаэробного стресса, в частности к разработке биотехнологических методов и подходов к созданию растений, толерантных к гипоксии и аноксии, в чем и состояла цель рассмотренных в нашем обзоре работ.

В настоящем обзоре обсуждаются биотехнологические подходы, разработанные на основе более ранних фундаментальных исследований в этой области, в частности на концепции о двух главных стратегиях адаптации растений к анаэробному стрессу [15–17, 21, 22]. В основу одного из таких подходов легли результаты исследований, показавшие ключевую роль анаэробного энергетического метаболизма (гликолиз и брожение), а также метаболизма углеводов в адаптации растений к анаэробному стрессу [21–24]. Исходя из этих представлений путем селекции *in vitro* в отсутствие экзогенных углеводов получены клеточные линии сахарного тростника *Saccharum officinarum* L. [22, 25] и пшеницы *Triticum aestivum* L. [26, 27], заметно более толерантные к аноксии, чем исходные каллусные клетки. Из более толерантных клеток *T. aestivum* L. были затем регенерированы целые растения, которые, как показало выращивание на затопленной почве, оказались устойчивыми и к почвенному анаэробному стрессу.

Рассмотрены также результаты опытов по селекции клеток растений *in vitro*, в которых выявлена защитная роль экзогенного нитрата как возможного альтернативного акцептора электронов в экстремальных условиях аноксии [28].

С учетом представлений о ключевой роли энергетического метаболизма в адаптации растений к анаэробному стрессу изучена возможность повышения

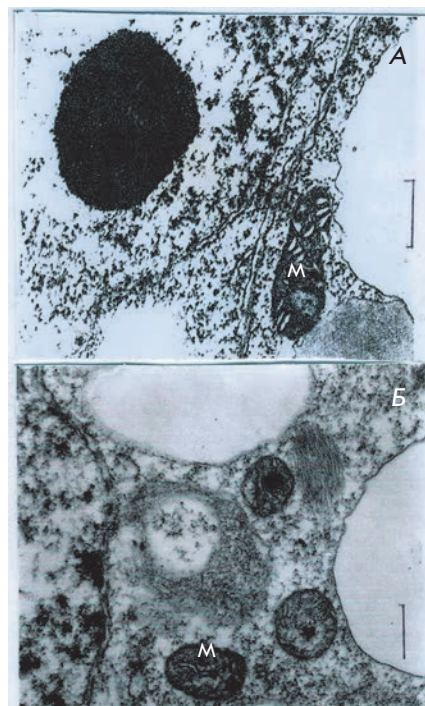


**Рис. 1.** Ультраструктура клеток каллуса чувствительной линии *S. officinarum* в условиях аноксии в отсутствие экзогенной глюкозы. А – контроль; Б – 24 ч анаэробной инкубации; В – 48 ч; Г – 72 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкМ

толерантности растений путем сверхэкспрессии в них генов пируватдекарбоксилазы (ПДК) и алкогольдегидрогеназы (АДГ) [29–32].

Другой биотехнологический подход, также успешно использованный для получения растений, более толерантных к почвенному затоплению [33], принципиально отличался от приведенных выше подходов. В этом случае за основу взяли другой широко известный факт, а именно реакцию большинства чувствительных к гипоксии и аноксии растений к анаэробному стрессу: затопление почвы на ранних этапах приводит к увяданию и старению надземных органов растений, а затем уже к их гибели. С другой стороны, хорошо известно, что старение растений в определенной степени регулируется гормонально: цитокинины существенно способствуют омоложению стареющих надземных органов [34, 35]. Учитывая эти обстоятельства, была сделана попытка усилить потенциальную способность растений к синтезу цитокинина и тем самым повысить их устойчивость к анаэробному стрессу путем переноса в растение бактериального гена *ipt*, ответственного за синтез этого гормона [26, 33].

Возможность повышения толерантности растений к анаэробному стрессу изучали также на трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum* Samsun NN с повышенной активностью недавно открытого фермента фитаспазы [36–38], который участвует в осу-



**Рис. 2.** Ультраструктура клеток каллуса чувствительной линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в присутствии 3% глюкозы. А – контроль; Б – 96 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкМ

ществлении запрограммированной клеточной смерти растений. Интерес к трансгенным растениям табака возник в связи с более ранними исследованиями [15, 17, 22], в которых была продемонстрирована не метаболическая адаптация на молекулярном уровне, а принципиально иная стратегия адаптации растений к анаэробной среде – формирование аэренхимы и избегание анаэробноза благодаря дальнему транспорту кислорода, т.е. адаптация на уровне целого организма.

#### **СЕЛЕКЦИЯ *in vitro* КЛЕТОК САХАРНОГО ТРОСТНИКА *Saccharum officinarum*, ТОЛЕРАНТНЫХ К АНАЭРОБНОМУ СТРЕССУ**

Как было отмечено, основой этого биотехнологического подхода стали результаты исследований, в которых установлена ключевая роль анаэробного энергетического и углеводного метаболизма в толерантности различных органов растений к гипоксии и аноксии [15–17, 21–24]. Ключевую роль анаэробного энергетического и углеводного метаболизма в толерантности к аноксии подтверждают также представленные здесь электронно-микроскопические исследования ультраструктуры митохондрий клеток каллусов сахарного тростника, которые переносили из аэробной среды в анаэробную в отсутствие и в присутствии экзогенной глюкозы в среде (рис. 1 и 2). Степень толерантности клеток к анаэробному стрессу определяли



**Таблица 1.** Индексы роста каллуса сахарного тростника, прошедшего анаэробную инкубацию разной продолжительности на среде без глюкозы, после культивирования в условиях нормальной аэрации в течение 1 месяца

Анаэробная инкубация, ч	Индекс роста	% от контроля
0	4.63 ± 0.50	100
6	2.35 ± 0.25	50.7 ± 5.4
24	1.47 ± 0.15	31.7 ± 3.2
48	0.60 ± 0.09	13.0 ± 2.0
72	0.55 ± 0.10	11.8 ± 2.2
96	0.16 ± 0.01	3.5 ± 0.32

путем электронно-микроскопического изучения ультраструктуры митохондрий, весьма чувствительных к отсутствию кислорода. В условиях дефицита кислорода возникают довольно характерные изменения ультраструктуры мембран митохондрий.

В отсутствие экзогенных углеводов в среде клетки, выдержанные в течение 24 ч в условиях аноксии (рис. 1Б), не имели существенных отличий в ультраструктуре митохондрий и других органелл от контрольных (рис. 1А) клеток в аэробных условиях. При более длительном анаэробии (48 ч) деструктивные явления в митохондриях и других органеллах становились явными (рис. 1В). Аноксия в течение 72 ч приводила к полной деградациии как митохондрий, так и других клеточных органелл (рис. 1Г).

Напротив, в присутствии 3% глюкозы в среде деструктивные изменения в ультраструктуре митохондрий и других клеточных органелл отсутствовали даже при анаэробии в течение 96 ч (рис. 2Б).

Наряду с электронно-микроскопическими наблюдениями мы оценивали также способность клеток каллусов восстанавливать рост в постанаэробный период в условиях нормальной аэрации, т.е. определяли индекс роста каллусов (разница между конечной массой и начальной, деленной на начальную) после 1 месяца культивирования в нормальных условиях.

Результаты этих опытов показали, что в отсутствие экзогенных углеводов по мере продления анаэробии у клеток существенно снижается индекс постанаэробного роста, приближаясь к нулю при анаэробии в течение 96 ч (табл. 1).

Толерантность клеток к аноксии существенно повышалась, когда клетки подкармливали экзогенной глюкозой (табл. 2).

**Таблица 2.** Индексы роста каллуса сахарного тростника, прошедшего анаэробную инкубацию разной продолжительности на среде с 3% глюкозой, после культивирования в течение 1 месяца в условиях нормальной аэрации

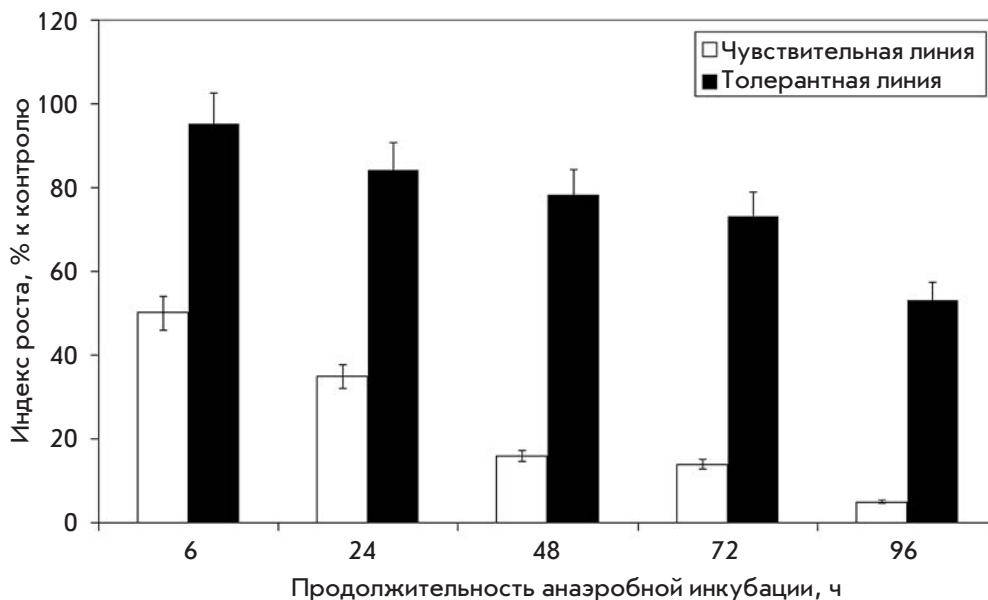
Анаэробная инкубация, сут	Индекс роста	% от контроля
0	5.7 ± 0.51	100
3	3.0 ± 0.29	52.0 ± 5.0
5	2.9 ± 0.31	50.8 ± 5.4
7	2.5 ± 0.27	43.8 ± 4.7
9	1.5 ± 0.14	26.3 ± 2.4
14	0.2 ± 0.06	3.3 ± 1.1

В опытах на клетках каллусов сахарного тростника также была показана ключевая роль энергетического и углеводного метаболизма в формировании толерантности клеток к аноксии, поэтому дальнейшую селекцию толерантных клеток каллуса [25–28] и анаэробное экспонирование клеток проводили в отсутствие экзогенных углеводов (глюкозы) в среде. Лишь в таких условиях, когда устойчивость клеток к аноксии определялась особенностями анаэробного метаболизма эндогенных резервов углеводов, можно было надеяться получить путем селекции истинно толерантные к аноксии клетки.

Исходя из результатов предварительных опытов была разработана последовательная ступенчатая селекция толерантных к аноксии клеток в среде без углеводов *in vitro*. После анаэробной инкубации в течение 48 ч 13% клеток сохраняли способность к последующему росту в аэробных условиях. Каллусы, инкубированные без кислорода в течение 48 ч, затем переводили в условия нормальной аэрации. Аэробно сформировавшиеся клоны после анаэробной инкубации (48 ч) повторно инкубировали в условиях аноксии, увеличив экспозицию до 72 ч. Выжившие после второго этапа селекции клетки подвергали действию анаэробии (96 ч) и отбирали аэробно растущие клоны. После трех этапов селекции была выделена клеточная линия сахарного тростника, которая росла в постанаэробный период в условиях нормальной аэрации намного активнее, чем исходный каллус. Даже после аноксии в течение 96 ч половина таких клеток сохраняла способность к делению, тогда как у исходного каллуса подобная выживаемость наблюдалась только после 6-часового анаэробии (рис. 3).



**Рис. 3.** Индекс роста клеток чувствительной и устойчивой каллусной линии *S. officinarum*, прошедших инкубацию в анаэробных условиях, после месяца культивирования в условиях нормальной аэрации. Белые столбцы – исходный каллус до селекции; черные столбцы – клеточная линия после селекции клеток *in vitro*



**СЕЛЕКЦИЯ *in vitro* ТОЛЕРАНТНЫХ К АНОКСИИ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ, А ТАКЖЕ РЕГЕНЕРАЦИЯ ИЗ НИХ ЦЕЛЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К КОРНЕВОМУ ЗАТОПЛЕНИЮ**

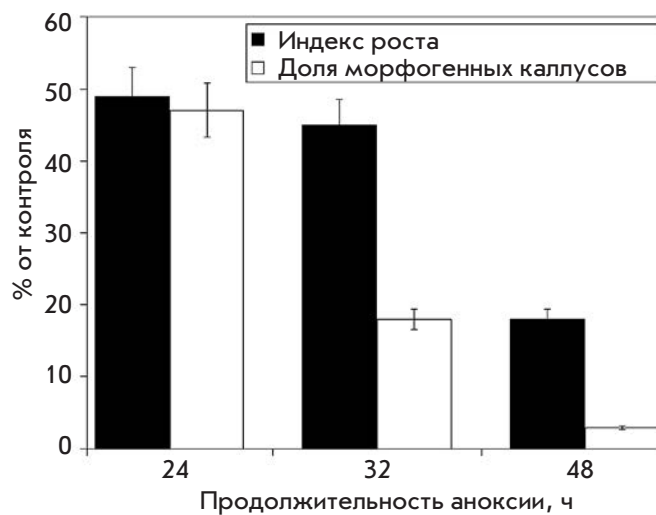
Аналогичные опыты по селекции толерантных клеток в отсутствие экзогенных углеводов проведены также с каллусными клетками пшеницы *T. aestivum* L. с целью последующей регенерации из отобранных более толерантных клеток целых растений, устойчивых к корневому затоплению [27]. В процессе селекции в условиях аноксии клетки постепенно теряли способность и к последующему аэробному росту, и к регенерации целых растений из устойчивых к аноксии клеток, поэтому мы проводили селекцию клеток в условиях 32 ч анаэробноз. При этом индекс роста клеток составлял 45%, а способность к регенерации целых растений из толерантных клеток – 18% (рис. 4).

Растения, регенерированные из толерантных клеток после селекции в условиях аноксии, а также контрольные растения испытывали в условиях корневого затопления в течение 16 дней при температуре 26°C. Из контрольных растений выжило лишь около 30%, тогда как из растений-регенерантов – 73%.

Чтобы выяснить генетическую природу толерантности к почвенному анаэробнозу, семена, полученные от толерантных растений-регенерантов первого поколения, высевали, а затем определяли толерантность выросших растений к корневому анаэробнозу. Растения R<sub>1</sub> от самоопыления растений-регенерантов были проверены в условиях корневого затопления в почвенном опыте при средних значениях температуры 32 и 22°C (табл. 3). При всех использованных температурах выживаемость по-

**Таблица 3.** Выживаемость растений R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> пшеницы в условиях корневого анаэробноза при разных температурных режимах

Условия опыта	Растения	Всего растений	Выжившие растения	
			число	доля, %
Затопление, 8 дней, 32°C	Контроль	20	0	0
	R <sub>1</sub>	22	7	32
Затопление, 10 дней, 22°C	Контроль	32	18	56
	R <sub>1</sub>	36	36	100
Затопление, 8 дней, 32°C	Контроль	24	11	46
	R <sub>2</sub>	32	32	100



**Рис. 4.** Индекс роста и доля морфогенных каллусов пшеницы (% от контроля) после анаэробной инкубации в среде без углеводов. Контроль – аэробные условия



Рис. 5. Растения пшеницы после 8-дневного корневого затопления; контрольное (А) и толерантное (Б)

томков растений-регенерантов была выше, чем у контрольных растений.

Тестирование растений R<sub>2</sub> в почвенном опыте показало сохранение ими устойчивости к корневому затоплению (табл. 3, рис. 5). Таким образом, получены доказательства наследования растениями-регенерантами повышенной толерантности к почвенному затоплению.

#### **ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ НИТРАТА В ТОЛЕРАНТНОСТИ К АНОКСИИ КЛЕТОК *S. officinarum*, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ *in vitro***

В дальнейшем в опытах на толерантных к аноксии клетках *S. officinarum*, выделенных путем клеточной селекции, а также на клетках исходных каллусов (контроль) была сделана попытка выяснить возможную роль экзогенного нитрата (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) как защитного

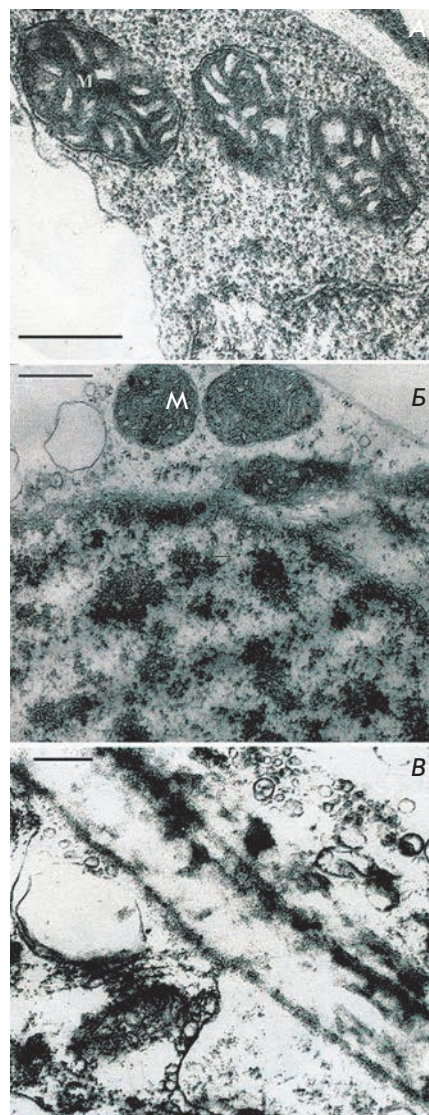


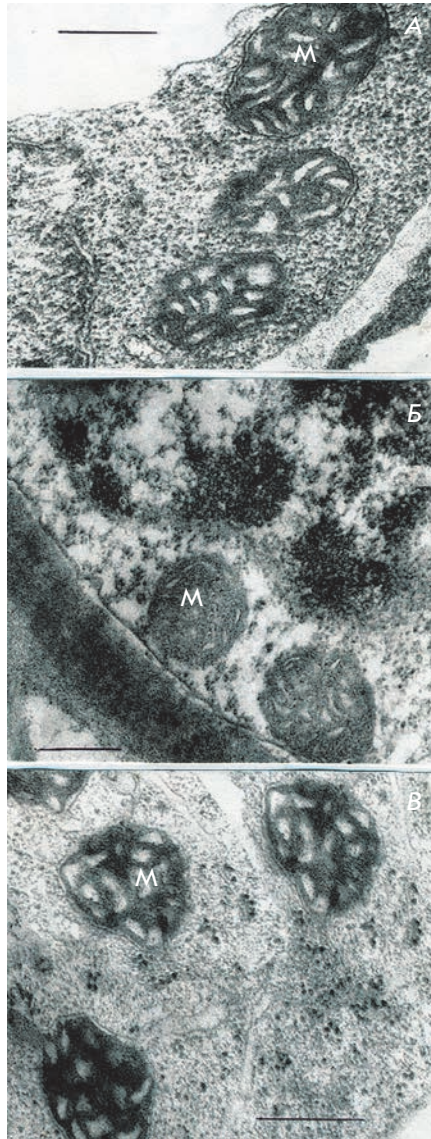
Рис. 6. Ультраструктура клеток каллуса чувствительной линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в отсутствие экзогенного нитрата. А – контроль; Б – 6 ч анаэробной инкубации; В – 24 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкм

фактора в условиях анаэробной инкубации клеток [28]. В более ранних работах, выполненных как на целых растениях, так и на отделенных органах, было показано, что мобилизация и утилизация экзогенного нитрата играют заметную роль в толерантности растений в отсутствие молекулярного кислорода [39–44].

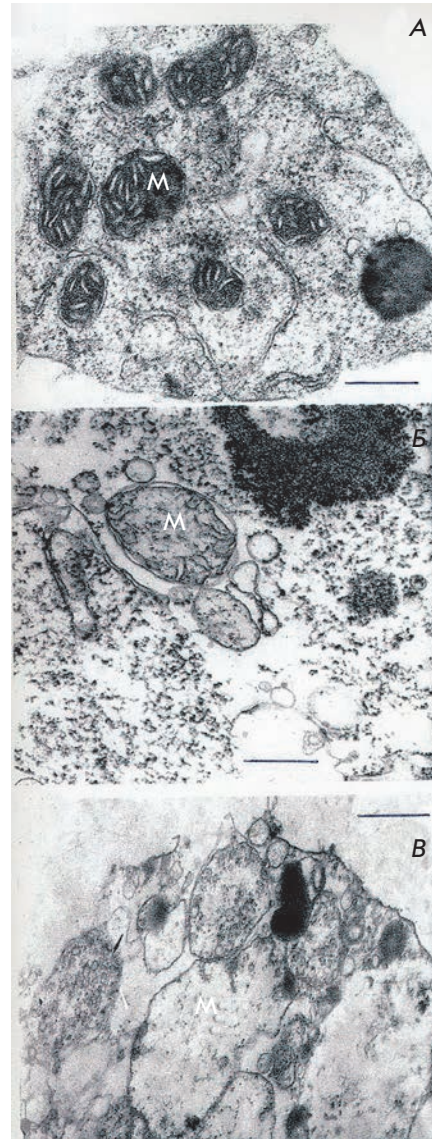
Электронно-микроскопическое изучение клеток исходных каллусов (контроль) сахарного тростника показало их высокую чувствительность к аноксии в отсутствие нитрата в среде (рис. 6). Шестичасовая анаэробная инкубация таких клеток не приводила к заметной деструкции мембран митохондрий, однако после 24-часового анаэробноза наблюдалась не только деструкция, но и полная деградация мембран как митохондрий, так и других клеточных структур (рис. 6В).



**Рис. 7.** Ультраструктура клеток каллуса чувствительной линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в присутствии экзогенного нитрата. А – контроль; Б – 6 ч анаэробной инкубации; В – 24 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкм



**Рис. 8.** Ультраструктура клеток каллуса устойчивой линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в отсутствие экзогенного нитрата. А – контроль; Б – 24 ч анаэробной инкубации; В – 48 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкм



В присутствии экзогенного нитрата каллусные клетки контрольной неустойчивой линии проявили повышенную толерантность к аноксии. Даже при анаэробнозе в течение 24 ч отсутствовали заметные признаки деструкции или деградации мембран митохондрий и других органелл (рис. 7В). Выраженные признаки деструкции мембран митохондрий, переходящей в деградацию, обнаруживались при более длительном анаэробнозе (48 ч).

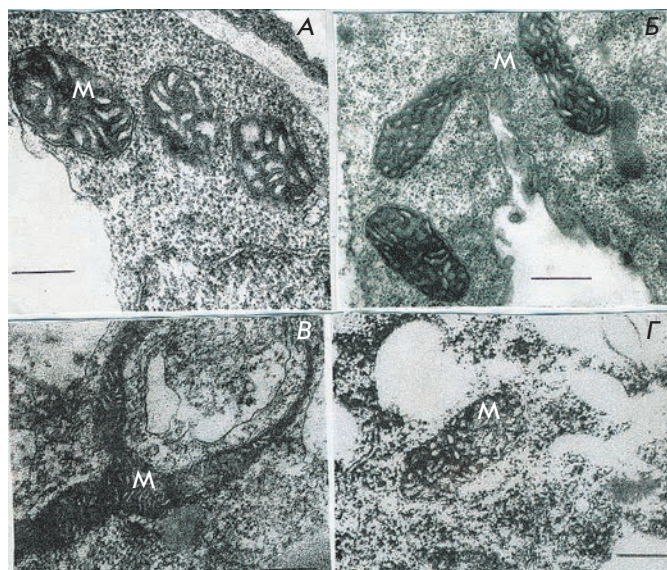
Клетки устойчивой линии, полученные после селекции *in vitro*, даже в отсутствие нитрата в питательной среде были заметно более толерантными к аноксии, чем исходные клетки (рис. 8). Анаэробная обработка клеток в течение 24 ч не вызывала деструкции мембран (рис. 8Б). Лишь после 48 ч анаэробноза наметились явные признаки деструкции

митохондрий (рис. 8В), а через 72 ч произошла полная деградация ультраструктуры клеток.

Наиболее существенные различия между каллусными линиями были выявлены при анаэробной обработке в присутствии нитратов в питательной среде толерантных клеток, выделенных в процессе селекции *in vitro*. Даже после 48–72 ч анаэробноза ультраструктура митохондрий в таких клетках оставалась неповрежденной (рис. 9Б,В,Г), наблюдались лишь некоторые непатологические морфологические изменения. Однако эти ультраструктурные и морфологические модификации не носили деструктивного характера даже после экспозиции в течение 72 ч (рис. 9Г).

Наряду с изучением состояния ультраструктуры клеток в условиях анаэробноза в присутствии и в от-





**Рис. 9.** Ультраструктура клеток каллуса устойчивой линии *S. officinarum* в условиях аноксии и в присутствии экзогенного нитрата. А – 24 ч анаэробной инкубации; Б, В – 48 ч анаэробной инкубации; Г – 72 ч анаэробной инкубации. М – митохондрия, масштабная линейка 0.5 мкм

сутствие нитрата мы наблюдали также за ростом клеток чувствительной и устойчивой линий каллусов в постанаэробный период. Постанаэробный рост клеток чувствительной линии на среде без нитрата был заметно подавлен. В присутствии нитрата каллус чувствительной линии рос не намного лучше, например, после 48-часовой аноксии прирост составлял только 10% от контрольного уровня на среде без нитратов и 16% на полной среде. Присутствие нитрата в питательной среде заметно сильнее благоприятствовало росту клеток толерантной линии: после 48 ч анаэробноза увеличение массы каллуса на среде с нитратом было на 18% больше, чем на безнитратной среде (рис. 10). В присутствии нитратов клетки толерантной линии сохраняли способность к росту даже после 72 ч аноксии, в то время как на среде без нитратов рост практически отсутствовал.

Что же касается каллусов чувствительной линии, то инкубация в условиях аноксии вызывала существенное снижение индекса роста, и, в отличие от устойчивой линии, защитное действие нитрата проявлялось заметно слабее.

Таким образом, полученные результаты вполне определенно показали, что в условиях аноксии экзогенный нитрат действует как защитный фактор и в контрольных клетках, и в клетках, полученных путем селекции *in vitro* в отсутствие молекулярного кислорода. Однако в клетках, выделенных путем

селекции *in vitro*, защитная функция экзогенного нитрата была выражена значительно сильнее, чем в исходных (контрольных) клетках.

Недавние публикации, подтверждающие положительное действие нитрата в условиях гипоксии и аноксии растений, показали сходные результаты и в отсутствие нитрата, но в присутствии микроколичеств нитрита в среде [45–47]. Эти результаты позволили сделать вывод о том, что защитное действие нитрата в отсутствие  $O_2$  следует объяснять электронно-акцепторной ролью не самого нитрата, а, скорее всего, нитрита, либо сигнальной функцией  $NO_2^-$ , который в условиях анаэробноза образуется при восстановлении нитрата. С другой стороны, в лаборатории Hill [47] было показано, что в условиях гипоксии в результате восстановления  $NO_2^-$  в митохондриях происходит синтез АТФ, возможно, одного из важных факторов защитного действия как нитрита, так и нитрата, который служит источником нитрита в условиях гипоксии и аноксии.

Следует обратить особое внимание на такую особенность толерантных клеток, полученных путем ступенчатой селекции *in vitro* в условиях аноксии, как более существенное повышение в присутствии нитрата толерантности к аноксии [28], чем у исходных клеток, использованных для селекции. Эти наблюдения дают нам определенное основание для утверждения, что толерантность к аноксии в процессе селекции клеток *S. officinarum* значительно повысилась благодаря стимуляции не только гликолитических реакций, но и процессов утилизации нитрата и, возможно, нитрита в этих экстремальных условиях.

Дальнейшие усилия целесообразно направить на выяснение физиологической роли нитрита, образующегося в процессе восстановления нитрата, как возможного альтернативного акцептора электронов либо сигнального фактора в ходе анаэробной инкубации клеток каллусов.

#### **ПОПЫТКИ ПОВЫСИТЬ ТОЛЕРАНТНОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ К АНАЭРОБНОМУ СТРЕССУ ПУТЕМ СТИМУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ (ПДК И АДГ)**

Исходя из представлений о ключевой роли анаэробного энергетического метаболизма в метаболической адаптации растений к анаэробному стрессу [15, 21, 22, 48–53] был сделан ряд попыток повысить толерантность растений к гипоксии и аноксии, воздействуя на скорость этанольного брожения, путем сверхэкспрессии генов гликолитических ферментов в трансгенных растениях [29–32]. Результаты первых исследований [29–31] были несколько противоречивыми. Значительный интерес представляют манипуляции с уровнем активности ферментов эта-



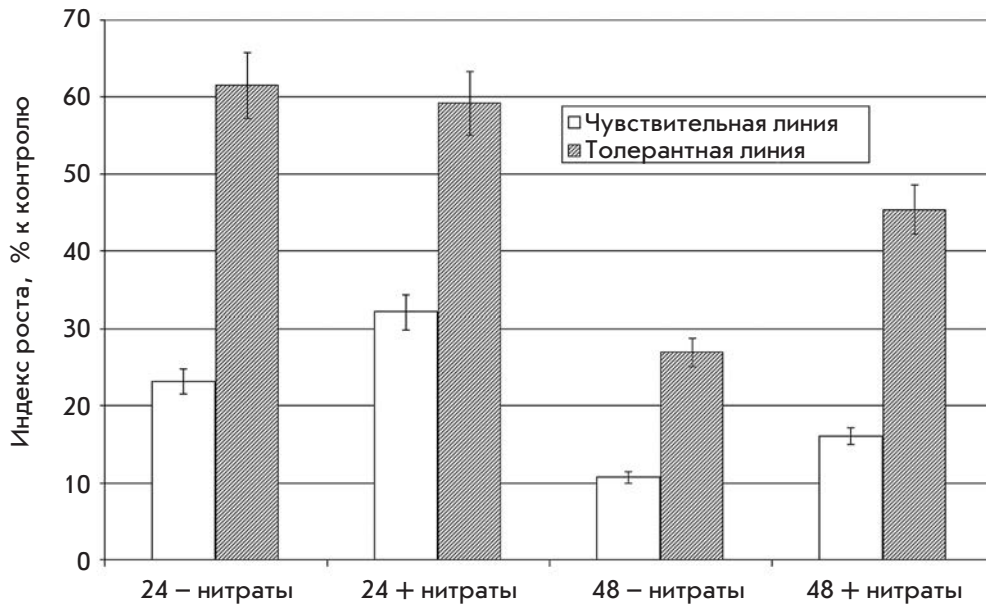


Рис. 10. Индекс роста каллуса устойчивой и чувствительной линий сахарного тростника после анаэробной инкубации. Цифры указывают на длительность (ч) анаэробной экспозиции клеток каллусов в присутствии и в отсутствие нитрата. Контроль – аэробные условия

нольного брожения (ПДК и АДГ) у трансгенных растений *Arabidopsis* [32]. В отличие от корней табака [30], растения *Arabidopsis*, трансгенные по ПДК, обладали не только повышенной скоростью этанольного брожения, но и большей устойчивостью к гипоксии, чем контрольные растения [32]. В отличие от растений *Arabidopsis*, трансгенных по ПДК, повышение активности АДГ в растениях с трансгеном АДГ не приводило к повышению толерантности, хотя мутация в гене *adh1* значительно усиливала накопление ацетальдегида и резко снижала устойчивость к низкокислородному стрессу. Высокая чувствительность и ранимость в условиях гипоксии мутантов АДГ *Arabidopsis* могла быть вызвана накоплением ацетальдегида, содержание которого резко возрастало в клетках, лишенных АДГ, и соответственно возможностью восстановления ацетальдегида и защиты клеток от его токсического действия. Наряду с этим нельзя полностью исключить накопления в этих условиях пировиноградной кислоты, что может в какой-то мере при участии ЛДГ привести к накоплению лактата в токсических количествах. Подкармливая растения сахарозой (3%), авторы показали, что для повышения толерантности необходима обеспеченность растений субстратом. Этот вывод хорошо согласуется с результатами наших более ранних опытов [21] и работ других авторов [48–57]. На основании собственных исследований в работе [32] сделан вывод, что активность ПДК тесно связана с интенсивностью потока углерода по пути этанольного брожения и определяет толерантность к низкокислородному стрессу, т.е. ПДК непосредственно контролирует этанольное

брожение. Таким образом, результаты проведенных на *Arabidopsis* опытов [32] также существенно поддерживают идею о ключевой роли энергетического метаболизма в истинной устойчивости растительных клеток к анаэробному стрессу.

#### УСТОЙЧИВОСТЬ К КОРНЕВОМУ ЗАТОПЛЕНИЮ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *ipt* АГРОБАКТЕРИЙ

Наряду с изучением возможности повышения толерантности пшеницы к анаэробному стрессу путем клеточной селекции *in vitro* в отсутствие экзогенных сахаров и кислорода была сделана попытка получить более толерантные к корневому затоплению растения пшеницы путем введения гена изопентилтрансферазы (*ipt*), кодирующего ключевой фермент в цепи биосинтеза цитокининов [26]. Интерес к стимуляции синтеза цитокинина в условиях анаэробного стресса возник в связи с тем, что цитокинин оказывает существенное влияние на старение растений, заметно задерживая этот процесс [34, 35]. Для надземных органов растений, испытывающих дефицит кислорода на затопленных почвах, как известно, характерны явные признаки преждевременного старения: хлороз листьев, их опадение и повреждение [58, 59]. Поэтому делались попытки задержать старение трансгенных растений арабидопсиса и пшеницы путем стимуляции синтеза цитокинина и тем самым повысить толерантность к анаэробному стрессу [26, 33, 60]. У полученных в наших опытах трансгенных растений пшеницы в условиях корневого затопления уровень изопен-

**Таблица 4.** Изменение линейных размеров и урожайности трансгенных по гену *ipt* и контрольных растений пшеницы, подвергнутых 14-дневному корневому затоплению (по отношению к растениям, не испытывавшим затопления, %)

Показатель, % к контролю	Контрольные растения	Трансгенные растения
Среднее увеличение высоты растения за 14 дней корневого затопления	37	51
Доля колосьев, давших семена	33	89
Средний вес семени	26	46
Урожайность	2	36

тениладенина был в 30 раз выше, чем у нетрансформированных растений. Роль изменения гормонального баланса в условиях анаэробного стресса была прослежена у трансгенных и контрольных растений на всем протяжении онтогенеза [26, 33].

В качестве критерия толерантности в опытах с пшеницей использовали такие показатели, как рост надземной массы трансгенных и контрольных растений, а также конечный урожай зерна в условиях, когда прикорневая зона растений была затоплена в течение 14 дней (табл. 4). Как видно из приведенных данных, рост надземных органов у контрольных растений заметно отстает от роста трансгенных по гену *ipt* растений. Еще более существенными были различия в урожайности опытных и контрольных растений. Урожайность определяли как массу зерна (в г), собранного с 1 м<sup>2</sup> почвы (гм<sup>2</sup>).

Наряду с этим, в процессе анаэробного воздействия определяли также динамику активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы) и накопления малонового диальдегида у контрольных растений и у растений, в геном которых был введен агробактериальный ген *ipt*. К концу периода корневого затопления уровень малонового диальдегида у трансгенных растений был на 32% ниже, чем у контрольных. Активность супероксиддисмутазы и каталазы, напротив, у трансгенной пшеницы оставалась высокой в течение всего периода гипоксии, в то время как у контрольных растений она существенно снижалась начиная с шестого дня корневого затопления. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях недостатка кислорода трансгенные растения испытывали меньший стресс, чем контрольные.

Приведенные данные, как и в опытах с арабидопсисом [60], свидетельствуют о положительном действии стимуляции синтеза цитокинина в условиях анаэробного стресса.

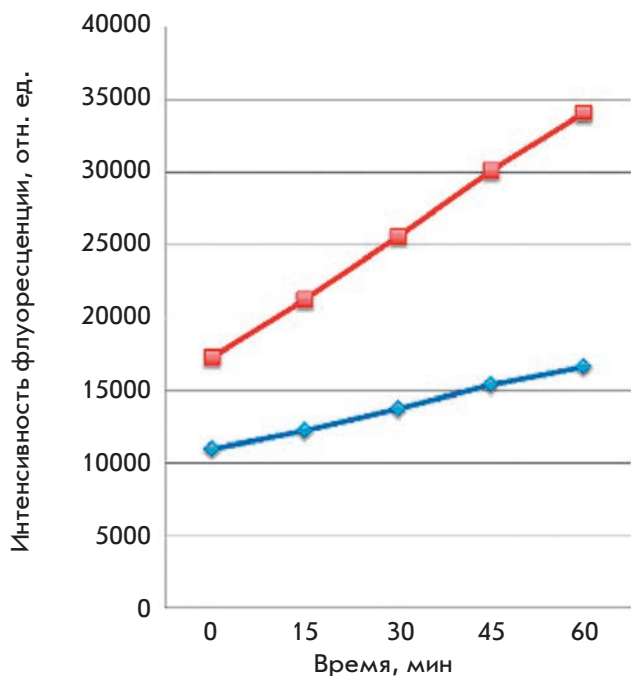
#### **О ВОЗМОЖНОЙ РОЛИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ – ФИТАСПАЗЫ, В ПОВЫШЕНИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К АНАЭРОБНОМУ СТРЕССУ**

Программированная клеточная смерть играет ключевую роль как в процессе развития, так и в ответе растений на стресс, включая защиту от патогенов [61–67]. Как уже было отмечено, одна из главных стратегий адаптации растений к гипоксии и аноксии – это избегание анаэробноза благодаря формированию в корнях межклеточных пространств (аэренхима) в результате программированной гибели (апоптоза) определенной части клеток. Аэренхима существенно облегчает дальний транспорт кислорода из аэрируемых надземных органов растений в корни и корневище, которые находятся в анаэробной среде, обеспечивая тем самым способность этих растений выживать даже на затопленных почвах.

Однако аэренхима формируется преимущественно у дикорастущих растений, обитающих на переувлажненных анаэробных почвах. Способность сельскохозяйственных растений в этом отношении сильно ограничена, поэтому анаэробноз у них часто приводит к повреждению и гибели растений. В связи с этим представляет интерес недавно открытая апоптотическая протеаза – фитаспаза [36, 68–70], вовлеченная в программированную смерть клеток растений, т.е. в тот самый процесс, благодаря которому образуется аэренхима. Поэтому в настоящей работе была сделана попытка с помощью трансгенных по фитаспазе растений выяснить, можно ли использовать это свойство фермента для формирования аэренхимы и повышения толерантности к гипоксии и аноксии у тех сельскохозяйственных растений, которые этой способностью не обладают или обладают в слабой степени.

С этой целью использовали растения табака *N. tabacum*: трансгенные, экспрессирующие дополнительно введенный ген фитаспазы, и дикого типа в качестве контроля для сравнительных фенотипических и анатомических исследований. Активность фитаспазы у трансгенных растений в 3 раза превышала активность этого фермента у растений дикого типа (рис. 11).

Результаты предварительных опытов (Милыева Э.Л., Полякова Л.И., Вартапетян Б.Б., неопубликованные данные), проведенных в процессе онтогенеза трансгенных и контрольных растений, выявили заметные отличия этих растений даже в условиях



**Рис. 11.** Скорость гидролиза флуорогенного пептидного субстрата фитаспазы Ac-VEID-AFG в экстрактах листьев табака, синяя кривая – дикий тип, красная – трансгенный сверхпродуцент фитаспазы

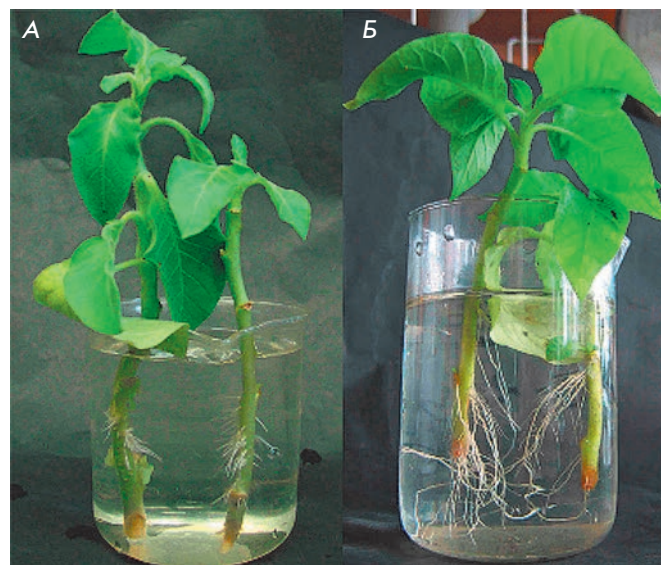
**Таблица 5.** Площадь межклеточных пространств в корнях трансгенных и контрольных растений при нормальной аэрации и корневом анаэробии

Условия опыта	Площадь межклеточных пространств / общая площадь коревой паренхимы корня	
	контроль (дикий тип)	трансгенные растения
Нормальная аэрация	3.53 ± 0.28	2.92 ± 0.68
Корневой анаэробиз, 48 ч*	4.07 ± 1.1	11.45 ± 2.35

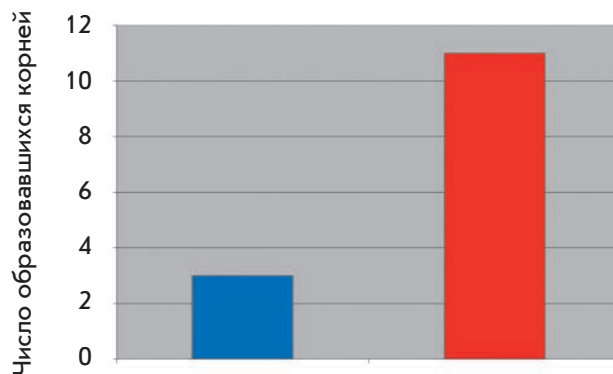
\*Корни затапливали водой на 5 см выше поверхности почвы.

нормальной аэрации прикорневой зоны, в частности, в отношении ризогенеза, когда их черенки погружали на 17 дней в воду (рис. 12, 13). У трансгенных растений этот процесс происходил более активно. То же самое наблюдалось и в прорастании семян, а также в росте листьев и стеблей у молодых растений табака. В обоих случаях у трансгенных растений эти процессы протекали в 2 раза более активно.

Особый интерес представляло сравнительное изучение анатомического строения корней трансгенных



**Рис. 12.** Ризогенез черенков растений табака дикого типа (А) и трансгенных по гену фитаспазы (Б) через 17 дней после начала опыта



**Рис. 13.** Ризогенез черенков растений табака дикого типа (синий столбик) и черенков трансгенных по гену фитаспазы (красный столбик) через 17 дней после начала опыта

и контрольных растений, поскольку повышенная активность фермента, ответственного за запрограммированную клеточную смерть (фитаспаза), должна была благоприятствовать формированию межклеточных пространств (аэренхима) в корнях трансгенных растений и способности к большей толерантности в условиях корневого анаэробиза.

Однако количественное определение площади межклеточных пространств, проведенное на поперечных срезах корней как контрольных, так и транс-

генных растений, в условиях нормальной аэрации, не выявило существенных различий.

В условиях же затопления почвы, когда корни испытывают анаэробный стресс, размеры межклеточных пространств у трансгенных растений, как показали результаты предварительных опытов, были заметно большими, чем в контроле (табл. 5).

Следовательно, результаты предварительных наблюдений, которые нуждаются в более детальном исследовании и подтверждении, указывают на то, что повышенная активность фермента фитаспазы, ответственного за программированную клеточную смерть, способствует формированию межклеточных пространств (аэренхимы) в корнях трансгенных растений в условиях гипоксии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре рассмотрены результаты ряда экспериментальных работ, в которых разработаны биотехнологические подходы, включающие генно-инженерные манипуляции и методы клеточной селекции, к созданию растений, толерантных к анаэробному стрессу. В основу этих подходов легли более ранние фундаментальные исследования, в частности, концепция о двух главных стратегиях адаптации

растений к гипоксии и аноксии: адаптации на молекулярном уровне, в которой ключевую роль играет анаэробный энергетический метаболизм клеток (истинная толерантность), и адаптации на уровне целого организма растений путем формирования аэренхимы и облегченного дальнего транспорта кислорода (кажущаяся толерантность).

Заметный вклад, сделанный в рассмотренных исследованиях в создание толерантных к анаэробному стрессу клеток и растений, дает определенное основание надеяться, что итоги этих исследований послужат основой нового направления в биотехнологии и будут способствовать, наряду с классическими методами селекции и гибридизации, дальнейшему развитию прикладных исследований.

Следует также отметить, что результаты рассмотренных исследований позволили подтвердить концепцию о главных стратегиях адаптации растений к гипоксии и аноксии, и о ключевой роли анаэробного энергетического метаболизма в метаболической адаптации растений к анаэробному стрессу, которые были выдвинуты нами ранее на основании фундаментального изучения жизни растений в условиях анаэробноза. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jackson M.B., Ishizawa K., Ito O. // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 137–142.
- Visser E.J.W., Voese nec L.A.C.J., Vartapetian B.B., Jackson M.B. // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 107–109.
- Maltby E. // *Plant life under oxygen deprivation ecology, physiology and biochemistry* / Eds Jackson M.B., Davies D.D., Lambers H. The Hague: SPB Academic, 1991. P. 3–21.
- Setter T.L., Waters I., Sharma S.K., Sing K.N., Kulshreshtha N., Yaduvanshi N.P.S., Ram P.C., Singh B.N., Rane J., McDonald G., et al. // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 221–235.
- Perata P., Armstrong W., Voese nec L.A.C.J. // *New Phytol.* 2011. V. 190. № 2. P. 269–273.
- Smucker A.L.M., Allmaras R.R. // *Internat. Crop Sci. I.* / Eds Buxton D.R., Shibles R., Forsberg R.A., Blad B.L., Asay K.H., Paulsen G.M., Wilson R.F. Madison, Wisconsin: Crop Sci. Soc. America, 1993. P. 727–731.
- Andrews C.J.A. // *Ann. Bot.* 1997. V. 79. Suppl. A. P. 87–92.
- Knee M. // *Plant life under oxygen deprivation ecology, physiology and biochemistry* / Eds Jackson M.B., Davies D.D., Lambers H. The Hague: SPB Academic, 1991. P. 229–243.
- Plant life in anaerobic environments* / Eds Hook D.D., Crawford R.M.M. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science, 1st and 2nd eds 1978, 1980.
- Plant life in aquatic and amphibious habitats* / Ed. Crawford R.M.M. Oxford: Blackwell, 1987.
- The ecology and management of wetlands* / Eds Hook D.D., McKee W.H., Smith Jr. H.K., Gregory J., Burrell V.G., DeVoe Ir. M.R., Solka R.E., Gilbert S., Banks R., Stolzy L.H., Brooks C., Matthews T.D., Shear T.H. London: Croom Helm, 1988.
- Plant life under oxygen deprivation* / Eds Jackson M.B., Davies D.D., Lambers H. The Hague: SPB Academic, 1991.
- Interacting stresses on plants in a changing climate.* NATO ASI Ser. / Eds Jackson M.B., Black C.R. Berlin: Springer-Verlag, 1993.
- Oxygen and environmental stress in plants* / Eds Crawford R.M.M., Hendry G.A.F., Goodman B.A. Edinburgh: Proc. Royal Soc. Edinburgh Ser. B. 1994. V. 102.
- Vartapetian B.B. // *Plant life in anaerobic environments* / Eds Hook D.D., Crawford R.M.M. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science, 1980. P. 1–12.
- Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Kursanov A.L. // *Nature (London).* 1974. V. 248. № 445. P. 258–259. (See also Erratum V. 250. № 461. P. 84).
- Vartapetian B.B., Sachs M.M., Fagerstedt K. // *Plant Stress.* 2008. V. 2. № 1. P. 1–19.
- Magneschi L., Perata P. // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 181–196.
- Steffens B., Gesrt T., Sauter M. // *New Phyt.* 2011. V. 190. № 2. P. 369–378.
- Jackson M.B., Ram P.C. // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. Spec. Issue. P. 227–241.
- Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Kozlova G.I., Agapova L.P. // *Protoplasma.* 1977. V. 93. P. 243–256.
- Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Generozova I.P., Polyakova L.I., Maslova I.P., Dolgikh Y.I., Stepanova A.Y. // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 155–172.
- Zhang Q., Greenway H. // *J. Exp. Bot.* 1994. V. 45. P. 567–575.
- Perata P., Guglielminetti L., Alpi A. // *Ann. Bot.* 1997. V. 79. P. 49–56.
- Степанова А.Ю., Полякова Л.И., Долгих Ю.И., Вартапетян Б.Б. // *Физиология растений.* 2002. Т. 49. С. 451–458.
- Tereshonok D., Stepanova A., Dolgikh Yu.I., Osipova E., Belyaev D., Vartapetian B.B. // *Plant Stress.* 2010. V. 4. № 1. P. 79–82.



27. Степанова А.Ю., Долгих Ю.И., Вартапетян Б.Б. // Биотехнология. 2010. № 3. С. 1–6.
28. Вартапетян Б.Б., Полякова Л.И., Степанова А.Ю., Долгих Ю.И. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 6. С. 739–745.
29. Bucher M., Brändle R., Kuhlemeier C. // EMBO J. 1994. V. 13. P. 2755–2763.
30. Tadege M., Brändle R., Kuhlemeier C. // Plant J. 1998. V. 14. P. 327–335.
31. Quimio C.A., Torrizo L.B., Setter T.L., Ellis M., Grover A., Abrigo E.M., Oliva N.P., Ella E.S., Carpena A.L., Ito O., et al. // Plant Phys. 2000. V. 156. P. 516–521.
32. Ismond K.P., Dolferus R., Pauw M.D., Dennis E.S., Good A.G. // J. Plant Phys. 2003. V. 132. P. 1292–1302.
33. Терешонок Д.В., Степанова А.Ю., Долгих Ю.И., Осипова Е.С., Беляев Д.В., Кудоярова Г.Р., Высоцкая Л.Б., Вартапетян Б.Б. // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 5. С. 681–690.
34. Романов Г.А. // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 295–319.
35. Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Yu., Osolodkin D.I., Romanov G.A. // Acta Naturae. 2012. V. 4. № 3(14). P. 31–45.
36. Chichkova N.V., Kim S.H., Titova E.S., Kalkum M., Morozov V.S., Rubtsov Y.P., Kalinina N.O., Taliansky M.E., Vartapetian A.B. // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 157–171.
37. Chichkova N.V., Shaw J., Galiullina R.A., Drury G.E., Tuzhikov A.I., Kim S.H., Kalkum M., Hong T.B., Gorshkova E.N., Torrance L., Vartapetian A.B., Taliansky M. // EMBO J. 2010. V. 29. № 6. P. 1149–1161.
38. Vartapetian A.B., Tuzhikov A.I., Chichkova N.V., Taliansky M., Wolpert T.J. // Cell Death Differ. 2011. V. 18. P. 1289–1297.
39. Reggiani R., Brambilla I., Bertani A. // J. Exp. Bot. 1985. V. 36. P. 1193–1199.
40. Botrel A., Magne C., Kaiser W. // Plant Phys. Biochem. 1996. V. 34. P. 645–652.
41. Fan T.W.M., Higashi R.M., Frenkiel T., Lane A.N. // J. Exp. Bot. 1997. V. 48. P. 1655–1666.
42. Botrel A., Kaiser W. // Planta. 1997. V. 201. P. 496–501.
43. Oberson I., Pavelic D., Braendle R., Rawlyer A. // Plant Phys. 1999. V. 155. P. 792–794.
44. Vartapetian B.B., Polyakova L.I. // Mitochondria: Structure, Functions and Dysfunctions / Ed. Svensson O.L. USA: Nova Publ., 2010. P. 955–966.
45. Igamberdiev A.U., Hill R.D. // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 2473–2482.
46. Igamberdiev A.U., Hill R.D. // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 259–268.
47. Stoimenova M., Igamberdiev A.I., Gupta K.J., Hill R.D. // Planta. 2007. V. 226. P. 465–474.
48. Xia J.-H., Saglio P. // Plant Phys. 1990. V. 93. P. 453–459.
49. Waters I., Kuiper P.J.C., Watkin E., Greenway H. // J. Exp. Bot. 1991a. V. 42. P. 1427–1435.
50. Waters I., Morell S., Greenway H., Colmer T.D. // J. Exp. Bot. 1991b. V. 42. P. 1437–1447.
51. Hole D.J., Cobb B.G., Hole P., Drew M.C. // J. Plant Phys. 1992. V. 99. P. 213–218.
52. Xia J.-H., Saglio P.H., Roberts J.K.M. // J. Plant Phys. 1995. V. 108. P. 589–595.
53. Ricard B., van Toai T., Chourey P., Saglio P.H. // J. Plant Phys. 1998. V. 116. P. 1323–1331.
54. Sato T., Harada T., Ischizawa K. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 1847–1856.
55. Loreti E., Alpi A., Perata P. // Plant Phys. 2003. V. 50. P. 737–742.
56. Voeselek L.A.C.J., Benschop J.J., Bou J., Cox M.C.H., Groeneveld H.W., Millenaar F.F., Vreburg R.A.M., Peeters A.J.M. // Ann. Bot. 2003. V. 91. P. 205–211.
57. Magneschi L., Perata P. // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 181–196.
58. Trought M.C.T., Drew M.C. // Plant Soil. 1980. V. 54. P. 77–94.
59. Singh S., Letham D.S., Palni L.M.S. // Phys. Plant. 1992. V. 86. P. 388–397.
60. Zhang J., van Toai T., Huynh L., Preiszner J. // Mol. Breed. 2000. V. 6. P. 135–144.
61. Hoeberichts F.A., Woltering E.J. // BioEssays. 2003. V. 25. № 1. P. 47–57.
62. Williams B., Dickman M. // Mol. Plant Pathol. 2008. V. 9. № 4. P. 531–544.
63. Reape T.J., McCabe P.F. // New Phytol. 2008. V. 180. № 1. P. 13–26.
64. Reape T.J., McCabe P.F. // Apoptosis. 2010. V. 15. № 3. P. 249–256.
65. Zhang J., Teng C., Liang Y. // Protein Cell. 2011. V. 2. № 10. P. 837–844.
66. van Doorn W.G., Beers E.P., Daugl J.L., Franklin-Tong V.E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A.M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., et al. // Cell Death Differ. 2011. V. 18. № 8. P. 1241–1246.
67. Fomicheva A.S., Tuzhikov A.I., Beloshistov R.E., Trusova S.V., Galiullina R.A., Mochalova L.V., Chichkova N.V., Vartapetian A.B. // Biochemistry (Moscow). 2012. V. 77. № 13. P. 1452–1464.
68. Chichkova N.V., Galiullina R.A., Taliansky M.E., Vartapetian A.B. // Plant Stress. 2008. V. 2. P. 89–95.
69. Tuzhikov A.I., Vartapetian B.B., Vartapetian A.B., Chichkova N.V. // Abiotic stress response in plants physiological, biochemical and genetic perspectives / Eds Venkateswarla B., Shanker A. Rijeka: Intech-Open Access Publ., 2011. P. 183–195.
70. Chichkova N.V., Tuzhikov A.I., Taliansky M., Vartapetian A.B. // Phys. Plant. 2012. V. 145. P. 77–84.

УДК 575.22

## Секвенирование полного митохондриального генома древнего человека, представителя новосвободненской культуры, указывает на ее возможную связь с культурой воронковидных кубков

А. В. Недолужко<sup>1\*</sup>, Е. С. Булыгина<sup>1</sup>, А. С. Соколов<sup>1</sup>, С. В. Цыганкова<sup>1</sup>, Н. М. Груздева<sup>1</sup>,  
А. Д. Резепкин<sup>3</sup>, Е. Б. Прохорчук<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Акад. Курчатова, 1

<sup>2</sup>Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

<sup>3</sup>Институт истории материальной культуры РАН, 191186, С.-Петербург, Дворцовая наб., 18

\*E-mail: nedoluzhko@gmail.com, prokhortchouk@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 25.12.2013

После доработки 20.03.2014

**РЕФЕРАТ** Методом широкомасштабного секвенирования впервые в России проанализирована полная последовательность митохондриального генома древнего человека – представителя новосвободненской археологической культуры. История изучения памятников эпохи ранней бронзы на Северном Кавказе насчитывает более 110 лет. Большинство археологов выделяют здесь единственную майкопскую культуру с двумя этапами развития, сформированную выходцами из Передней Азии в 3700–3600 годах до н. э. Однако характер ряда археологических находок, сделанных в 1979–1991 годах в станице Новосвободная (Республика Адыгея), и их сходство с артефактами культуры воронковидных кубков позволили предположить происхождение, отличное от майкопской культуры. В представленной работе с помощью методов геномного анализа изучены костные останки человека, найденные в районе станицы Новосвободной, возраст которых превышает 5500 лет. Однонуклеотидные полиморфизмы, обнаруженные в митохондриальном геноме этого человека, позволили отнести исследуемый образец к митохондриальной гаплогруппе V7. Таким образом, анализ полной нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК из костных останков, публикуемый в данной работе, в сочетании с результатами изучения археологических артефактов позволяет рассматривать найденные в станице Новосвободная артефакты как самостоятельное явление (археологическую культуру), тесно связанное с культурой воронковидных кубков.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** новосвободненская культура, майкопская культура, гаплогруппа, митохондриальная ДНК, секвенирование.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** мтДНК – митохондриальная ДНК; ОП – однонуклеотидный полиморфизм.

### ВВЕДЕНИЕ

С конца 1970-х годов по мере накопления археологического материала в научной среде определились две точки зрения на генезис памятников эпохи ранней бронзы на Северном Кавказе. Первая из них предполагает существование единой майкопской культуры с двумя этапами развития [1–3], включая находки, сделанные в станице Новосвободная (бывшая Цар-

ская). Вторая гипотеза рассматривает археологические артефакты, найденные в окрестностях станицы Новосвободная, как самостоятельное явление (культуру). В ходе археологических исследований подкурганного могильника «Клады» вблизи станицы Новосвободная, проведенных в 1979–1991 годах под руководством А.Д. Резепкина, были раскопаны 22 кургана, в которых нашли 93 хорошо стратифи-

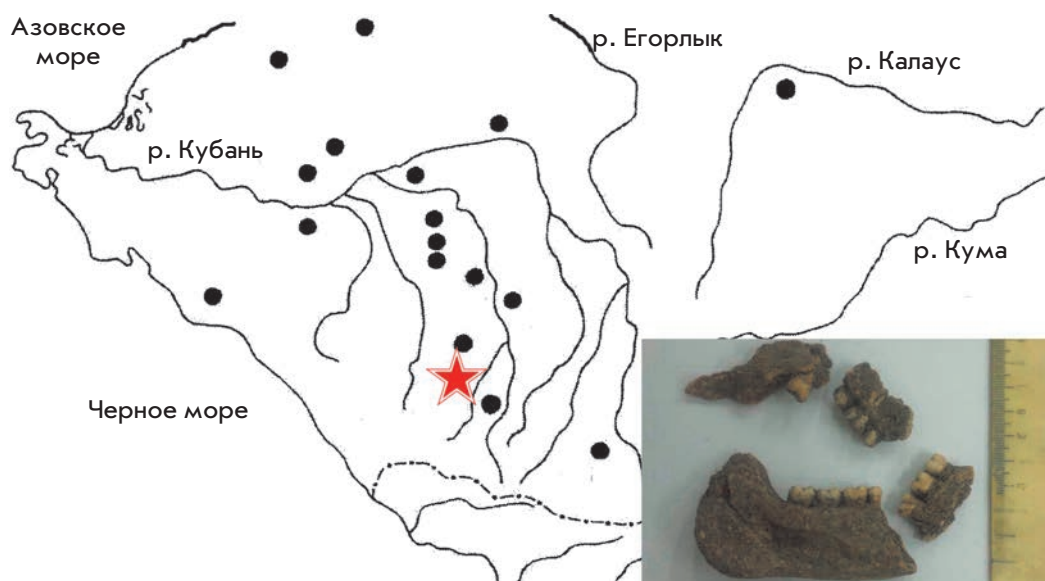


Рис. 1. Ареал новосвободненских памятников на Северном Кавказе (отмечен черными точками). Район раскопок подкурганного могильника «Клады» вблизи станции Новосвободная в Республике Адыгея (отмечен звездочкой) и костный материал, использованный для выделения ДНК

цированных погребения. Этот материал позволяет не только построить относительную и абсолютную хронологию артефактов Новосвободной, но и вплотную приблизиться к решению проблемы происхождения новосвободненской культуры [4, 5].

В последние годы методы современной геномики широко используются для решения ряда археологических [6–10] и палеонтологических загадок [11–15]. Зачастую в подобных работах анализируют митохондриальную ДНК (мтДНК), особенности которой делают ее незаменимым инструментом изучения эволюции человека: наследование по материнской линии; относительно высокая копияность; быстрое по сравнению с ядерным геномом накопление мутаций; отсутствие рекомбинации; относительно хорошая сохранность этой молекулы в костных останках древних людей, поскольку ядерная ДНК деградирует как минимум в 2 раза быстрее митохондриальной [16, 17].

В данной работе мы представляем полную нуклеотидную последовательность митохондриального генома представителя новосвободненской культуры. Результаты анализа позволяют предположить общность этой культуры с культурой воронковидных кубков. Нами установлено, что представитель новосвободненской археологической культуры принадлежит к митохондриальной гаплогруппе V7.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК была выделена из зубов человека, обнаруженных во время археологических раскопок подкурганного могильника «Клады» вблизи станции Новосвободная (Республика Адыгея) экспедицией Института истории материальной культуры РАН

(Санкт-Петербург). Возраст останков датируется второй третью – концом 4 тысячелетия до н. э. (рис. 1).

### Выделение ДНК, приготовление и секвенирование ДНК-библиотек

Древнюю ДНК выделяли из растертой в порошок костной ткани человека в специальных условиях, исключающих контаминацию современной ДНК. Использовали протеиназу К (New England Biolabs, США) и кремниевые шарики (Sigma-Aldrich, США) согласно протоколу, описанному Л. Орландо с соавт. [18]. ДНК-библиотеки готовили с использованием набора NEBNext Quick DNA Library Prep Master Mix set for 454 (New England Biolabs), используя адаптерные последовательности для секвенирования на приборах Illumina, согласно стандартному протоколу, предложенному производителем. Качество и концентрацию библиотек определяли с помощью 2100 Bioanalyser (Agilent, США) и HS Qubit (Invitrogen, США). Для обогащения фракции мтДНК использовали набор FleXelect Mitochondrial DNA enrichment kit (Flexgen, Нидерланды) с перекрытием олигонуклеотидных зондов от 10 до 40% (подробный список олигонуклеотидных зондов для обогащения мтДНК доступен по запросу). ДНК-библиотеки секвенировали на геномном анализаторе Illumina GAIIx с использованием парных чтений (paired-end sequencing), с длиной чтений 50 нуклеотидов.

### Биоинформатический анализ

Полученные чтения картировали на митохондриальном геноме (NC\_012920.1) с помощью программы Bowtie 2 версии 2.1.0 с параметром very-sensitive [19].

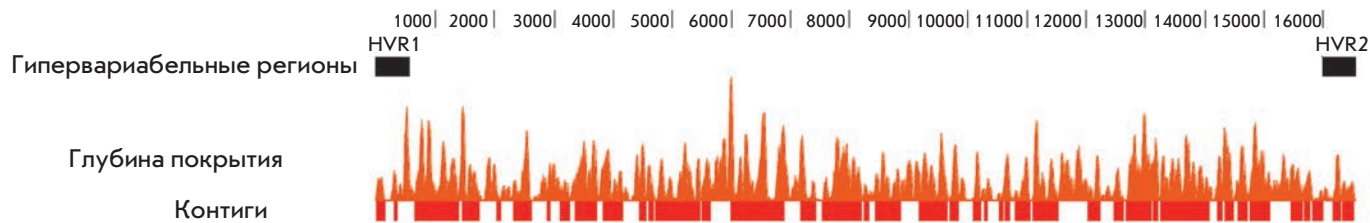


Рис. 2. Результаты секвенирования и сборки митохондриального генома

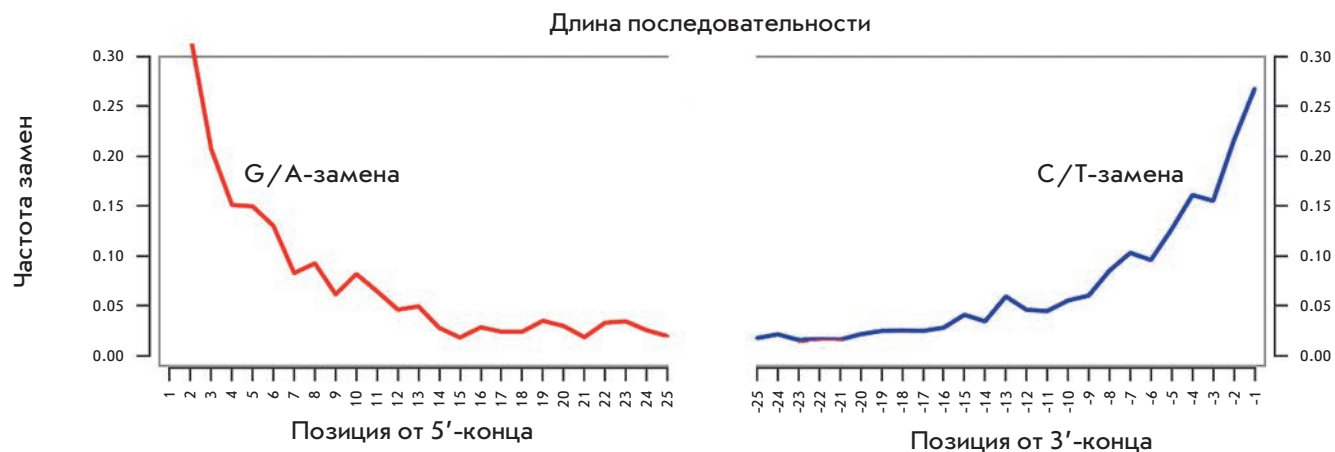


Рис. 3. Частота замен в ДНК-библиотеке. Тест на контаминацию современным генетическим материалом

Тест на древность ДНК проводили с использованием программы mapDamage 2.0 [20]. Согласно модели постмортальных изменений, построенной с помощью данной программы, скорректировано качество тех позиций в чтениях, которые могут содержать модификации. Другими словами, нуклеотидам, которые могут быть результатом замены  $C \rightarrow T$  или  $G \rightarrow A$ , присваивалось худшее значение качества, чем в оригинальном чтении, и они не принимались во внимание при анализе однонуклеотидных полиморфизмов (ОП), характерных для исследуемого образца. Для поиска ОП применяли программное обеспечение VarScan версии 2.2.3, с помощью которого отбирали ОП с  $p < 0.01$  [21]. Митохондриальную гаплогруппу определяли по отобранным ОП, используя сервис HaploGrep [22]. *De novo*-сборку митохондриального генома представителя новосвободненской культуры проводили с помощью программы AbySS версии 1.3.6 с длиной K-мера, равной 22 нуклеотидам [23].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из геномных библиотек древнего человека были отобраны последовательности мтДНК. В результате

секвенирования обогащенных библиотек получено 58771105 чтений, большая часть которых (99.994%) имела экзогенное (бактериальное) происхождение, что нормально для подобных исследований [24], а также может объясняться сходством геномов бактерий и митохондрий. Картирование чтений на референсный митохондриальный геном (hg19) позволило покрыть его в среднем в 13.4X – всего картировалось 3422 чтения (0.006%) (рис. 2).

Известно, что древняя ДНК со временем деградирует до небольших фрагментов, а остатки цитозина (C), расположенные на концах этих фрагментов, дезаминируются до урацила (U) и в ходе подготовки пробы (ПЦР) превращаются в тимин (T) [25]. Частота концевых замен  $C \rightarrow T$  в образцах, чей возраст превышает 300 тысяч лет, может достигать 60% и выше [15, 26]. В то же время при секвенировании современной ДНК уровень концевых замен не превышает 0.5% (данные не приведены). Частоту концевых замен оценивали с использованием программы mapDamage 2.0. В образце из станции Новосвободная частота концевых замен  $C \rightarrow T$  в 3'- и 5'-концах ДНК-библиотеки превышала 30% (рис. 3). Этот результат позволя-



Однонуклеотидные полиморфизмы (ОП ( $p < 0.01$ )), обнаруженные в митохондриальном геноме представителя новосвободненской культуры

Позиция ОП на мтДНК	Референсная последовательность мтДНК, hg19	Замена	Ген
72*	T	C	-
93*	A	G	-
2515	C	T	TVAS5
9378	G	A	JA760602; JA760600
9541	C	T	JA760602; JA760600
11018	C	T	JA760602; JA760600; STRF6; JA760615
11720	A	G	JA760602; JA760600; STRF6; JA760615
11723	C	T	JA760602; JA760600; STRF6; JA760615
12851	G	A	JA760602; JA760600; JA760615
14906	A	G	JA760602; цитохром b
15302	A	G	JA760602; цитохром b
15477	C	T	JA760602; цитохром b

\* ОП, определяющие гаплогруппу V7.

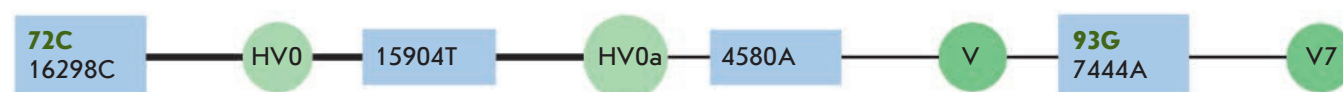


Рис. 4. Результаты определения митохондриальной гаплогруппы, показанные в виде ветви дерева гаплогрупп мтДНК человека (сервис Harplogrep). Зеленым цветом в голубых прямоугольниках указаны ОП (72С и 93G), использованные при определении гаплогруппы

ет утверждать, что в секвенированном образце вся мтДНК принадлежит древнему человеку.

Сравнение нуклеотидных последовательностей индивидуальных чтений с консенсусной последовательностью митохондриального генома (с учетом понижения качества концевых замен, см. «Экспериментальную часть») позволило идентифицировать в мтДНК представителя исследуемой археологической культуры однонуклеотидные полиморфизмы, используя которые мы отнесли образец к митохондриальной гаплогруппе V7 (рис. 4, таблица).

При сборке митохондриального генома представителя новосвободненской культуры с минимальной длиной контига, равной 100 нуклеотидам, удалось собрать контиги с N50, равным 203 нуклеотидам (N50 – наибольшая длина контига при *de novo*-сборке такая, что в контигах не меньшей длины содержится 50% суммарной длины контигов).

Общий размер *de novo*-собранных фрагментов мтДНК составил 11063 нуклеотида (рис. 2). В связи с деградацией исходного материала, неравномерностью ПЦР и обогащения мтДНК (набор FleXelect Mitochondrial DNA enrichment kit) большинство

полученных контигов имели малую длину и не перекрывались, что не позволило обеспечить сборку полной последовательности мтДНК, несмотря на покрытие 13.4%.

Ранее, основываясь на археологических находках, сомнению подвергли точку зрения о связи новосвободненской культуры с переднеазиатской майкопской археологической культурой. Более того, найденные артефакты позволили предложить гипотезу о решающем вкладе в формирование новосвободненской археологической культуры баальбергского варианта ранних этапов предположительно индоевропейской культуры воронковидных кубков, а не переднеазиатской майкопской археологической культуры [5]. Окончательный вердикт в подобных исследованиях позволяет вынести анализ ДНК, который считается одним из решающих доказательств.

Генетические исследования, посвященные миграции древнего человека по территории Европы, активно ведутся в последние десятилетия. Б. Сайкс [27], например, предполагает, что основными митохондриальными гаплогруппами на территории Европы были U, H, V, I, W, T, K, которые появились и распростра-

нились по территории Европы во время таяния ледника 11–14 тысяч лет назад. При этом не исключена миграция с территории Ближнего Востока населения с гаплогруппой J мтДНК, принесшего в регион культуру земледелия [27]. Анализ митохондриальной ДНК представителей культуры линейно-ленточной керамики (предшественника культуры воронковидных кубков) позволил установить доминирование гаплогрупп H, V и T [28]. Кроме того, в ряде работ показано, что в Европе времен археологической культуры линейно-ленточной керамики и родственных ей культур представлены в первую очередь гаплогруппы U, H и V [29–32]. Результаты нашей работы, полученные с использованием современных методов геномного анализа, согласуются с гипотезой о происхождении нововободненской культуры, предложенной А.Д. Резепкиным [5].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами представлены результаты секвенирования нуклеотидной последовательности мтДНК представителя нововободненской археологической культуры, жившего более 5 тысяч лет назад. Обнаруженные однонуклеотидные полиморфизмы позволяют отнести изученный образец к митохондриальной гаплогруппе V7, широко распространенной у совре-

менных жителей Европы, а также встречавшейся в ряде культур, населявших Центральную Европу. Результаты работы не противоречат гипотезе о происхождении нововободненской культуры от ранних европейских культур Северной и Центральной Европы и выделении ее в качестве самостоятельной археологической культуры, однако требуют более детального геномного анализа как нововободненской, так и майкопской археологических культур. В настоящее время достоверные данные о митохондриальных гаплогруппах майкопской и, предположительно, предковой для нее культуры позднего восточноанатолийского халколита этапов III–IV (Амук F) отсутствуют. ●

*Авторы выражают благодарность М.В. Ковальчуку (Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт») за пристальное внимание к работе и К.Г. Скрябину (Центр «Биоинженерия» РАН) за ценные замечания, сделанные в процессе подготовки статьи к публикации.*

*Работа поддержана РФФИ (грант № 13-06-12025 офм) и стипендией Президента Российской Федерации (СП-2056.2012.5).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иессен А.А. К хронологии «больших кубанских курганов». М.: Советская археология, 1950. Т. 12.
2. Мунчаев Р.М. Кавказ на заре бронзового века. М.: Наука, 1975. 416 с.
3. Мунчаев Р.М. Майкопская культура. Археология: Эпоха бронзы Кавказа и Средней Азии. Ранняя и средняя бронза Кавказа. М.: Наука, 1994. С. 158–225.
4. Rezekin A.D. Das frühbronzezeitliche Gräberfeld von Klady und die Majkop-Kultur in Nordwestkaukasien. Archäologie in Eurasien. М.: Leidorf, 2000. V. 10. 74 S.
5. Резепкин А.Д. Нововободненская культура (на основе материалов могильника «Клады»). Санкт-Петербург: Нестор история, 2012. 343 с.
6. Paabo S. // Nature. 1985. V. 314. № 6012. P. 644–645.
7. Haak W., Balanovsky O., Sanchez J., Koshel S., Zaporozhchenko V., Adler C., der Sarkissian C., Brandt G., Schwarz C., Nicklisch N., et al. // PLoS Biol. 2010. V. 8. № 11. e1000536.
8. Green R.E., Krause J., Briggs A.W., Maricic T., Stenzel U., Kircher M., Patterson N., Li H., Zhai W., Fritz M.H., et al. // Science. 2010. V. 328. № 5979. P. 710–722.
9. Lorenzen E.D., Noguez-Bravo D., Orlando L., Weinstock J., Binladen J., Marske K.A., Ugan A., Borregaard M.K., Gilbert M.T., Nielsen R., et al. // Nature. 2011. V. 479. № 7373. P. 359–364.
10. Rasmussen M., Guo X., Wang Y., Lohmueller K.E., Rasmussen S., Albrechtsen A., Skotte L., Lindgreen S., Metspalu M., Jombart T., et al. // Science. 2011. V. 334. № 6052. P. 94–98.
11. Ozawa T., Hayashi S., Mikhelson V.M. // J. Mol. Evol. 1997. V. 44. № 4. P. 406–413.
12. Poinar H., Kuch M., McDonald G., Martin P., Paabo S. // Curr. Biol. 2003. V. 13. № 13. P. 1150–1152.
13. Barnes I., Shapiro B., Lister A., Kuznetsova T., Sher A., Guthrie D., Thomas M.G. // Curr. Biol. 2007. V. 17. № 12. P. 1072–1075.
14. Vilstrup J.T., Seguin-Orlando A., Stiller M., Ginolhac A., Raghavan M., Nielsen S.C., Weinstock J., Froese D., Vasiliev S.K., Ovodov N.D., et al. // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. e55950.
15. Orlando L., Ginolhac A., Zhang G., Froese D., Albrechtsen A., Stiller M., Schubert M., Cappellini E., Petersen B., Moltke I., et al. // Nature. 2013. V. 499. № 7456. P. 74–78.
16. Pakendorf B., Stoneking M. // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2005. V. 6. P. 165–183.
17. Allentoft M.E., Collins M., Harker D., Haile J., Oskam C.L., Hale M.L., Campos P.F., Samaniego J.A., Gilbert M.T., Willerslev E., et al. // Proc. Biol. Sci. 2012. V. 279. № 1748. P. 4724–4733.
18. Orlando L., Metcalf J.L., Alberdi M.T., Telles-Antunes M., Bonjean D., Otte M., Martin F., Eisenmann V., Mashkour M., Morello F., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 51. P. 21754–21759.
19. Langmead B., Salzberg S.L. // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 4. P. 357–359.
20. Jonsson H., Ginolhac A., Schubert M., Johnson P.L., Orlando L. // Bioinformatics. 2013. V. 29. № 13. P. 1682–1684.
21. Koboldt D.C., Larson D.E., Chen K., Ding L., Wilson R.K. // Genome Res. 2012. V. 22. № 3. P. 568–576.
22. Kloss-Brandstatter A., Pacher D., Schonherr S., Weissensteiner H., Binna R., Specht G., Kronenberg F., et al. // Hum. Mutat. 2011. V. 32. № 1. P. 25–32.
23. Simpson J.T., Wong K., Jackman S.D., Schein J.E., Jones S.J., Birol I. // Genome Res. 2009. V. 19. № 6. P. 1117–1123.

24. Garcia-Garcera M., Gigli E., Sanchez-Quinto F., Ramirez O., Calafell F., Civit S., Lalueza-Fox C. // PLoS One. 2011. V. 6. № 8. e24161.
25. Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., Haeseler A., Paabo S. // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. № 23. P. 4793–4799.
26. Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M.T., Weihmann A., Nickel B., Valdiosera C., Garcia N., Paabo S., Arsuaga J.L., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 39. P. 15758–15763.
27. Sykes B. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 1999. V. 354. № 1379. P. 131–139.
28. Haak W., Forster P., Bramanti B., Matsumura S., Brandt G., Tanzer M., Villems R., Renfrew C., Gronenborn D., Alt K.W., et al. // Science. 2005. V. 310. № 5750. P. 1016–1018.
29. Kittles R. A., Bergen A.W., Urbanek M., Virkkunen M., Linnola M., Goldman D., Long J.C. // Am. J. Phys. Anthropol. 1999. V. 108. № 4. P. 381–399.
30. Achilli A., Rengo C., Magri C., Battaglia V., Olivieri A., Scozzari R., Cruciani F., Zeviani M., Briem E., Carelli V., et al. // Am. J. Hum. Genet. 2004. V. 75. № 5. P. 910–918.
31. Malmstrom H., Gilbert M.T., Thomas M.G., Brandstrom M., Stora J., Molnar P., Andersen P.K., Bendixen C., Holmlund G., Gotherstrom A., et al. // Curr. Biol. 2009. V. 19. № 20. P. 1758–1762.
32. Skoglund P., Malmstrom H., Raghavan M., Stora J., Hall P., Willerslev E., Gilbert M.T., Gotherstrom A., Jakobsson M. // Science. 2012. V. 336. № 6080. P. 466–469.

УДК 57.03

# Взаимодействие ТВР с ТАТА-боксом промотора гена триозофосфатизомеразы человека в норме и при патологии, определенное в режиме реального времени

О. В. Аркова<sup>1</sup>, Н. А. Кузнецов<sup>2,3</sup>, О. С. Федорова<sup>2,3</sup>, Н. А. Колчанов<sup>1,3</sup>, Л. К. Савинкова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

<sup>3</sup>Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*E-mail: savinkl@mail.ru

Поступила в редакцию 27.11.2013

После доработки 21.02.2014

**РЕФЕРАТ** ТАТА-связывающий белок (ТАТА-Binding Protein, ТВР) – ключевой компонент транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II. Самостоятельно или в составе базального фактора транскрипции TFIID ТВР связывает ТАТА-боксы, расположенный в коровой области ТАТА-содержащих промоторов генов II-го класса. Ранее методом «задержки ДНК в геле» мы изучали влияние однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) на взаимодействие ТВР с ТАТА-боксом. Показано, что большинство SNPs в ТАТА-боксах ряда промоторов генов человека вызывают снижение в 2–4 раза сродства ТВР/ТАТА, ассоциированное с повышенным риском возникновения таких наследственных заболеваний, как β-талассемии различной тяжести, гемофилия В Лейдена, инфаркт миокарда, рак легкого и др. В представленной работе, используя рекомбинантный ТВР человека и флуоресцентно меченные FRET-парой флуорофоров Су3- и Су5-дуплексы, идентичные ТАТА-боксы промотора нормального гена триозофосфатизомеразы (TPI) человека и ТАТА-боксы, содержащему SNP -24T > G, методом «остановленной струи» в режиме реального времени исследован процесс образования комплекса ТВР/ТАТА. Впервые показано, что связывание ТВР с ТАТА-боксом промотора гена TPI происходит в течение 10 с и описывается одностадийной кинетической моделью. Образование комплексов ТВР с нормальным ТАТА-боксом происходит в 5.5 раза быстрее, а диссоциация – в 31 раз медленнее, чем в случае ТАТА-боксы, содержащего SNP. В первые секунды взаимодействия ТВР связывает и одновременно изгибает ТАТА-боксы, причем для промотора гена TPI дикого типа требуются меньшие концентрации ТВР, чем для SNP-содержащего ТАТА-боксы, ассоциированного с неврологическими и мышечными нарушениями, кардиомиопатией и другими заболеваниями.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ТАТА-боксы, ТВР, полиморфизм, метод остановленной струи.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ТВР (ТАТА-Binding Protein) – ТАТА-связывающий белок; ТВР/ТАТА – комплекс ТВР с олигонуклеотидом, идентичным ТАТА-боксы с фланкирующими нуклеотидами.

## ВВЕДЕНИЕ

Специфические нуклеотидные последовательности промотора и вокруг него служат кодом, который определяет когда, где и с какой эффективностью будут транскрибироваться отдельные гены. Этот код состоит из последовательностей трех типов: кор-промотора, проксимальной области промотора и более удаленных от промотора дистальных последовательностей. Кор-промотор – это область, рас-

положенная на расстоянии ~ 100 нуклеотидов слева (в 5'-области) и справа (в 3'-области) от старта транскрипции, на которой сконцентрированы такие регуляторные элементы, как ТАТА-боксы, BRE (TFIIB-recognition element), Inr (Initiator), MTE (Motif Ten Element), DPE (Downstream Promoter Element), DCE (Downstream Core Element) и XCPE1 (X Core Promoter Element 1) и др., количество которых может варьировать [1].



ТАТА-бокс, расположенный на расстоянии ~ 30 п.н. от старта транскрипции, наиболее изученный кор-промоторный элемент. Взаимодействие ТВР (ТВР – ТАТА-Binding Protein) с ТАТА-боксом запускает сборку базального комплекса транскрипции РНК-полимеразы II и определяет точность расположения транскрипционной машины относительно стартового нуклеотида [1, 2]. От нуклеотидной последовательности ТАТА-бокса и контекста, в котором он находится, зависит сродство к нему ТВР, субъединицы базального фактора транскрипции TFIID, влияющее на активность промотора [3, 4].

Сравнение аминокислотных последовательностей ТВР человека, мыши, плодовой мушки, дрожжей и других организмов показало, что ТВР состоит из высококонсервативного С-концевого домена из 180 аминокислотных остатков и вариабельного N-концевого домена [5]. У ТВР разных видов С-концевой домен идентичен более чем на 80% [5]. Рентгеноструктурный анализ, футпринтинг и анализ расположения триптических пептидов С-концевого домена [6] показали, что ТВР состоит из двух суб-доменов, H2 и H2', которые образуют непрерывный, слегка изогнутый антипараллельный β-лист, формирующий вогнутое ДНК-связывающее седло, и четырех α-спиралей, лежащих на верхней стороне молекулы. С-Концевой домен ТАТА-связывающего белка контактирует с двухцепочечной ДНК вдоль малой бороздки в основном посредством неполярных и гидрофобных взаимодействий и вызывает ее локальное расплетание и изгиб спирали. Это создает уникальную конформацию, строго необходимую для сборки преинициаторного комплекса и эффективной транскрипции *in vitro* и *in vivo* [7]. С верхней, выпуклой, стороной ТВР взаимодействуют различные регуляторные белки [8].

Однонуклеотидные полиморфизмы, или SNPs, в ТАТА-боксах и окружающих нуклеотидах, влияющие на сродство к ним ТВР, могут вносить вклад в различные комплексные заболевания человека – гипертонию, артрит, онкологические, сердечно-сосудистые и иммунные заболевания, а также быть причиной таких моногенных заболеваний, как β-талассемии различной тяжести, Коппкоподобная катаракта и др. [9].

Ген триозофосфатизомеразы (TPI) экспрессируется во всех типах клеток, он относится к генам «домашнего хозяйства» [10]. В тканях человека обнаружены множественные формы TPI, которые кодируются одним геном и образуются в результате посттрансляционных модификаций [10]. TPI катализирует превращение дигидроацетонфосфата в D-глицеральдегид-3-фосфат, завершая тем самым первую стадию гликолиза. Недостаток фермента

приводит к накоплению в клетке дигидроацетонфосфата и фруктозоdifосфата.

SNP -24T > G в ТАТА-боксе промотора гена TPI, обнаруженный в работе [11], приводит к синтезу недостаточного количества мРНК (далее под SNP понимаем аллель G ТАТА-бокса). Активность фермента в эритроцитах носителей этого аллеля снижается и составляет 3–10% от активности в клетках здоровых доноров [8, 11, 12]. У них развиваются нейродегенеративные расстройства, кардиомиопатия, мышечные нарушения и, реже, гемолитическая анемия [11]. Кроме того, триозофосфатизомераза способна превращать лекарственно устойчивые клетки рака желудка в чувствительные [13], что повышает эффективность химиотерапии и делает фермент потенциальной мишенью для новых противоопухолевых препаратов.

Экспериментальное и компьютерное изучение влияния SNPs в составе ТАТА-боксов, находящихся в контексте ДНК промоторов генов человека [14, 15], на взаимодействие с ТВР позволило нам определить термодинамические ( $K_D$ ) и кинетические ( $k_{on}$  и  $k_{off}$ ) параметры образования комплексов ТВР с «нормальным» и SNP-содержащим ТАТА-боксом промотора гена TPI.

Так, показано [14], что SNP -24T > G в ТАТА-боксе этого гена очень сильно снижает сродство ТВР/ТАТА – равновесная константа диссоциации комплексов,  $K_D$ , возрастает в 25 раз, что коррелирует с низкой экспрессией гена [11]. В присутствии SNP константа скорости образования комплексов ( $k_{on}$ ) ТВР/ТАТА снижается в 35 раз, а константа скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) уменьшается на 30%.

Цель представленной работы заключалась в измерении и анализе кинетических параметров взаимодействия ТВР/ТАТА в режиме реального времени. Используемый нами при изучении термодинамических и кинетических параметров комплексов ТВР/ТАТА классический метод EMSA не позволяет изучать динамику взаимодействия молекул ТВР и ТАТА-бокса промотора гена TPI в миллисекундном и секундном диапазонах времени. Поэтому процесс связывания ТВР и ТАТА-бокса промотора гена TPI мы изучали методом «остановленной струи». В основе метода лежит быстрое, в течение ~1 мс, смешивание взаимодействующих веществ и регистрация сигнала FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Мы использовали рекомбинантный полноразмерный ТВР человека и 15-звенные флуоресцентно меченные красителями Су3 и Су5 олигонуклеотиды, идентичные ТАТА-боксу с фланкирующими нуклеотидами нормального промотора TPI и промотора, содержащего SNP в ТАТА-боксе. Этот метод позволяет определить константы скорости узнавания ТАТА-связывающим

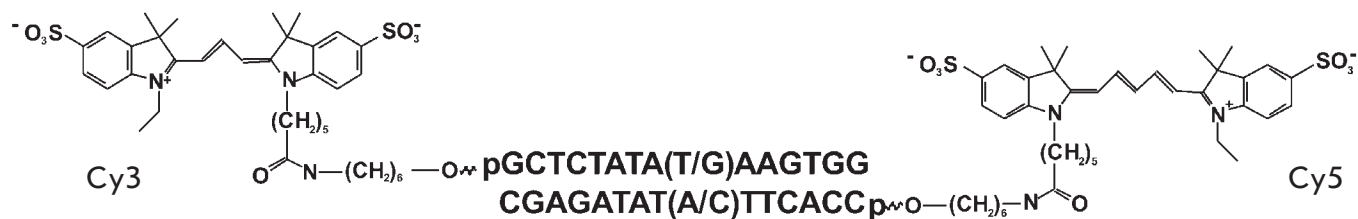


Рис. 1. Используемые в работе ДНК-дуплексы, идентичные последовательности ТАТА-бокса промотора гена *TPI* дикого типа и содержащего SNP -24T > G, меченные FRET-парой флуорофоров Cy3/Cy5

белком ТАТА-бокса дикого типа и выявить особенности структуры комплекса ТВР/ТАТА в режиме реального времени в норме и при патологии.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали полноразмерный рекомбинантный ТВР человека, содержащий только природные аминокислотные последовательности. ТВР экспрессировали в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pAR3038-hTBP (любезно предоставлена проф. В. Puhg, Center for Gene Regulation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA). Трансформацию *E. coli* BL21(DE3) проводили согласно работе [16]. Экспрессию и очистку ТВР выполнили по методике, описанной в [17], при использовании ИПТГ в концентрации 0.1 мМ. Время индукции – 3 ч. Концентрацию ТВР в препарате белка определяли по методу Брэдфорд [18].

Олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН) длиной 15 п.н., меченные по 5'-концам цепей цианиновыми флуорофорами Cy3 и Cy5, были синтезированы и очищены в ООО «НаноТех-С», Новосибирск.

Связывание ТВР с ДНК-дуплексом, соответствующим нормальному ТАТА-боксу промотора гена *TPI* (gctcTATATAAgtgg, аллель Т и gctcTATAGAAgtgg, аллель G), анализировали методом «остановленной струи» на спектрометре SX20 (Applied Photophysics, Великобритания). Длина волны возбуждения флуоресценции красителя Cy3 равна 550 нм, напряжение на детекторе – 575 В. Флуоресценцию красителя Cy5 регистрировали на длинах волн более 645 нм при использовании светофильтра RG-645 (Scott, Германия). Процесс связывания с ДНК-дуплексами изучали с использованием ТВР в следующих концентрациях: аллель Т –  $1 \times 10^{-7}$ ,  $2 \times 10^{-7}$ ,  $4 \times 10^{-7}$ ,  $6 \times 10^{-7}$ ,  $8 \times 10^{-7}$ ,  $10 \times 10^{-7}$ ,  $20 \times 10^{-7}$  М; аллель G –  $4 \times 10^{-7}$ ,  $6 \times 10^{-7}$ ,  $8 \times 10^{-7}$ ,  $10 \times 10^{-7}$ ,  $20 \times 10^{-7}$ ,  $30 \times 10^{-7}$ ,  $40 \times 10^{-7}$  М. Концентрация ДНК-дуплексов во всех случаях была равна  $1 \times 10^{-7}$  М, время измерения – 50 с, общее количество точек на одну кривую – 6000. Опыты проводили при температуре 25°C.

Для определения кинетической модели взаимодействия ТВР с ДНК-дуплексами и расчета констант скорости всех элементарных стадий реакции использовали программу Dynafit (Biokin, США) [19].

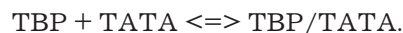
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование предстационарной кинетики позволяет детально проанализировать механизм реакции. Преимуществом метода «остановленной струи» является возможность наблюдать быстро протекающие реакции и регистрировать конформационные переходы белка и ДНК в процессе взаимодействия в режиме реального времени. Хотя этот подход более сложен технически, а его использование требует более трудоемкого математического анализа, изучение процесса связывания ТАТА-боксов ТАТА-связывающим белком в предстационарных условиях позволяет в значительной степени углубить знания о механизме их взаимодействия.

В работе использовали FRET-субстраты (рис. 1), содержащие на концах дуплекса пару донор (Cy3)–акцептор (Cy5), при этом центральная часть дуплекса представляла собой ТАТА-боксы нормального промотора гена *TPI* и при наличии SNP.

Кинетика связывания ДНК-дуплексов с ТВР, представленная на рис. 2 и 3, свидетельствует о том, что образование комплекса ТВР/ТАТА приводит к росту интенсивности флуоресценции Cy5. Рост интенсивности FRET-сигнала обусловлен изгибанием ДНК-дуплекса в комплексе с ТВР, за счет чего происходит сближение остатков флуорофоров Cy3 и Cy5. Анализ кинетических кривых ДНК-дуплексов показал, что изгибание дуплекса, содержащего ТАТА-боксы дикого типа, происходит при меньших концентрациях ТВР, чем в случае аллеля G ТАТА-боксов (рис. 2 и 3).

На основании полученных данных нами предложен кинетический механизм связывания ТВР с нормальным ТАТА-боксом гена *TPI* и с ТАТА-боксом, содержащим SNP, описываемый одностадийной схемой:



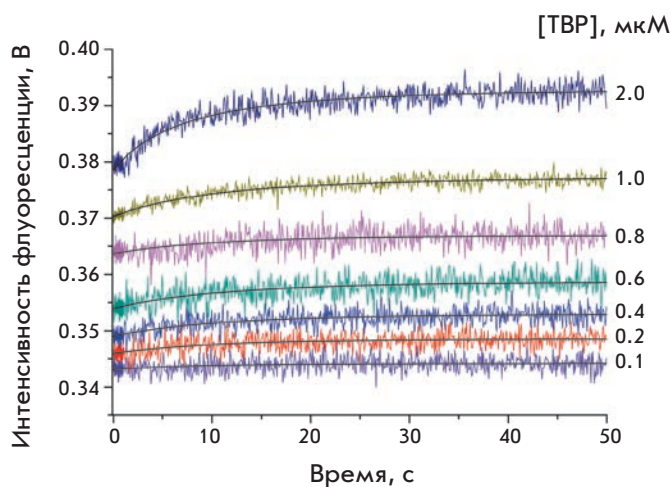


Рис. 2. Кинетика связывания и изгибания ДНК-дуплекса, идентичного последовательности ТАТА-бокса гена *TPI* дикого типа

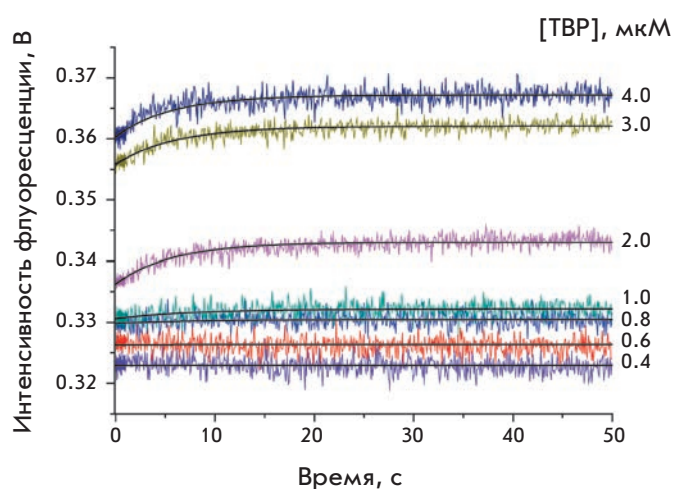


Рис. 3. Кинетика связывания и изгибания ДНК-дуплекса, идентичного последовательности содержащего SNP ТАТА-бокса промотора гена *TPI*

Константы скоростей прямой и обратной реакции представлены в *таблице*. Видно, что образование комплексов ТВР с ТАТА-боксом дикого типа происходит в 5.5 раза быстрее ( $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), чем с аллелем G ( $0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), а диссоциация комплексов ТВР/ТАТА – в 31 раз медленнее ( $2.8 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  у дикого типа и  $8.9 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$  в случае аллеля G). Необходимо отметить, что подобное различие в константах скорости образования и распада комплекса ТВР/ТАТА приводит к отличию значений равновесных констант диссоциации в 150 раз ( $2.7 \times 10^{-9} \text{ M}$  в норме и  $0.4 \times 10^{-6} \text{ M}$  при наличии мутации). Различие в значениях констант диссоциации ( $K_D$ ) между нормальным и SNP-содержащим ТАТА-боксом говорит о резком снижении аффинности ТВР к олигонуклеотидам с измененным ТАТА-боксом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что возникшая в ТАТА-боксе G/C-пара делает структуру ДНК более жесткой, что затрудняет связывание ТАТА-бокса с ТВР и образование функционального комплекса, имеющего оптимальную конформацию. Из этого следует, что *in vivo* ген триозофосфатизомеразы, содержащий SNP -24T > G в ТАТА-боксе, транскрибируется и экспрессируется менее эффективно. Эти результаты подтверждены клинически [11].

Сравнение полученных нами и опубликованных данных [11, 20] показывает, что уменьшение в 150 раз сродства ТВР к SNP-содержащему ТАТА-боксу промотора *TPI* приводит к повышению риска развития ряда заболеваний, связанных с недостатком триозофосфатизомеразы. Вероятно, недостаток ТРІ может компенсироваться другими путями (на-

пример, в пентозофосфатном цикле), что следует из различий в реакции больных на недостаток ТРІ в организме [11, 21]. Несмотря на то что сродство ТВР к SNP-содержащему ТАТА-боксу промотора гена *TPI* снижено в 150 раз, активность ТРІ в эритроцитах одних пациентов падает до 3–10% от нормы [21], а у некоторых гетерозиготных носителей этого полиморфного аллеля наблюдается умеренное (26–50% от нормы) снижение активности ТРІ [11].

Следует отметить, что впервые путем регистрации в режиме реального времени взаимодействия ТВР человека с флуоресцентно меченными Су3 и Су5 ТАТА-содержащими дуплексами показано,

#### Кинетика взаимодействия ТВР с ТАТА-боксом ТРІ

Константа	ТАТА-бокс, аллель T SNP -24T > G	ТАТА-бокс, аллель G SNP -24T > G
$k_{on}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^6$	$(0.2 \pm 0.1) \times 10^6$
$k_{off}, \text{c}^{-1}$	$(2.8 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	$(8.9 \pm 1.2) \times 10^{-2}$
$K_{ass}, \text{M}^{-1}$	$3.7 \times 10^8$	$2.3 \times 10^6$
$K_D, \text{M}$	$2.7 \times 10^{-9} = 2.7 \text{ нМ}$	$0.4 \times 10^{-6} = 400 \text{ нМ}$

*Примечание.*  $k_{on}$  – константа скорости прямой реакции ТВР/ТАТА;  $k_{off}$  – константа скорости обратной реакции ТВР/ТАТА;  $K_{ass}$  – равновесная константа ассоциации, полученная из кинетических значений ( $k_{on} / k_{off}$ );  $K_D$  – равновесная константа диссоциации, полученная из кинетических значений ( $k_{off} / k_{on}$ ).

что ТВР быстро связывает и одновременно изгибает ДНК ТАТА-бокса гена *TPI*. Этот результат согласуется с данными, полученными ранее с использованием полноразмерного ТВР человека и ТАТА-бокса AdMLP с консенсусной последовательностью 5'-CGСТАТААААGGGC-3', к 5'-концу которой присоединен флуорофор TAMRA, а к 3'-концу – флуоресцеин [22], которые свидетельствуют об одностадийном механизме процесса связывания и одновременного изгибания ТАТА-бокса белком ТВР.

Следует отметить, что в мире подобные исследования проводились с использованием ТВР разного вида – полной и укороченной форм (С-концевого домена) – и, в основном, только модельного промотора AdML (реже E4) с консенсусной последовательно-

стью ТАТА-бокса. Полученные результаты улучшили представление о взаимодействии ТВР/ТАТА, ключевом в инициации и регуляции транскрипции и синтеза белков в клетках эукариот. ●

*Авторы выражают благодарность И.А. Драчковой, Т.В. Аршиновой и А.А. Кузнецовой за помощь в выделении рекомбинантного ТВР и проведении экспериментов.*

*Работа частично поддержана программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 6.11), РФФИ (грант № 14-04-00485) и интеграционными проектами 6.8 и 30.29 Президиума РАН.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. // *Dev. Biol.* 2010. V. 339. № 2. P. 225–229.
- Aso T., Conaway J.W., Conaway R.C. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 42. P. 26575–26583.
- Caron C., Rousset R., Beraud C., Moncollin V., Egly J.M., Jalinot P. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 11. P. 4269–4278.
- Faiger H., Ivanchenko M., Cohen I., Haran T.E. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 1. P. 104–119.
- Hoffman A., Sinn E., Yamamoto T., Wang J., Roy A., Horikoshi M., Roeder R.G. // *Nature.* 1990. V. 346. № 6282. P. 387–390.
- Hernandez N. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. № 7. P. 1291–1308.
- Wu J., Parkhurst K.M., Powell R.M., Brenowitz M., Parkhurst L.J. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 18. P. 14614–14622.
- Cang Y., Auble D.T., Prelich G. // *EMBO J.* 1999. V. 18. № 23. P. 6662–6671.
- Савинкова Л.К., Пономаренко М.П., Пономаренко П.М., Драчкова И.А., Лысова М.В., Аршинова Т.В., Колчанов Н.А. // *Биохимия.* 2009. Т. 74. № 2. С. 117–129.
- Brown J.R., Daar I.O., Krug J.R., Maquat L.E. // *Mol. Cell Biol.* 1985. V. 5. № 7. P. 1694–1706.
- Watanabe M., Zingg B.C., Mohrenweiser H.W. // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 58. № 2. P. 308–316.
- Rosa R., Prehu M.O., Calvin M.C., Badoual J., Alix D., Girod R. // *Hum. Genet.* 1985. V. 71. № 3. P. 235–240.
- Wang X., Lu Y., Yang J., Shi Y., Lan M., Liu Z., Zhai H., Fan D. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008. V. 134. № 9. P. 995–1003.
- Savinkova L., Drachkova I., Arshinova T., Ponomarenko P., Ponomarenko M., Kolchanov N. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. e54626.
- Drachkova I.A., Savinkova L.K., Arshinova T.V., Ponomarenko M.P., Peltek S.E., Kolchanov N.A. // *Hum. Mut.* 2014. V. 35. № 5. P. 601–608.
- Peterson M.G., Tanese N., Pugh B.F., Tjian R. // *Science.* 1990. V. 248. № 4963. P. 1625–1630.
- Pugh B.F. // *Methods in molecular biology: in vitro transcription and translation protocols* / Ed. Tymms M.J. Totowa: Humana Press Inc., 1995. V. 37. P. 359–367.
- Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
- Kuzmic P. // *Anal. Biochem.* 1996. V. 237. № 2. P. 260–273.
- Humphries A., Ationu A., Lalloz M.R., Layton D.M. // *Hum. Genet.* 1999. V. 104. № 6. P. 486–491.
- Chang M.L., Artymiuk P.J., Wu X., Hollan S., Lammi A., Maquat L.E. // *Am. J. Hum. Genet.* 1993. V. 52. № 6. P. 1260–1269.
- Masters K.M., Parkhurst K.M., Daugherty M.A., Parkhurst L.J., Lawrence J. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 34. P. 31685–31690.



УДК 500-599.57.088

# Структурные особенности гена теломеразной РНК *Heterocephalus glaber*

С. А. Евфратов<sup>1</sup>, Е. М. Смекалова<sup>1</sup>, А. В. Головин<sup>2,3</sup>, Н. А. Логвина<sup>1</sup>, М. Э. Зверева<sup>1,3</sup>,  
О. А. Донцова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

\*E-mail: evfratov@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2013

После доработки 14.03.2014

**РЕФЕРАТ** Система поддержания длины теломер играет важную роль в старении организма. Сердцем этой системы является теломеразный комплекс, в который входят фермент обратная транскриптаза и теломеразная РНК, служащая матрицей для синтеза теломерных повторов на концах хромосом. В результате биоинформатического сравнения структуры гена теломеразной РНК (TER) и его промоторного участка долгоживущего голого землекопа *Heterocephalus glaber* и TER других видов найдены два основных отличия теломеразной РНК *H. glaber* (hgTER). Это замена А → G в первой петле псевдоузла P2b-p3, что соответствует нуклеотиду 111 в теломеразной РНК человека (hTR), и замена G → A в домене CR7-p8b (соответствует нуклеотиду 421 hTR). Анализ промоторных участков гена TER позволил идентифицировать два новых сайта связывания факторов транскрипции: сайт взаимодействия с белками семейства ETS, найденный в промоторных участках генов всех проанализированных TER, и сайт связывания фактора SOX17, уникальный для TER голого землекопа. Еще одной отличительной чертой гена hgTER оказалось отсутствие одного из Sp1-сайтов. Особенности hgTER и регуляции ее транскрипции могут рассматриваться как один из важных факторов, обеспечивающих повышенную теломеразную активность в стволовых клетках *H. glaber* и увеличение продолжительности его жизни.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** биоинформатика, *Heterocephalus glaber*, промотор, сравнительная геномика, теломеразная РНК.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** TER – теломеразная РНК; hTR – теломеразная РНК человека; TERT – каталитическая субъединица теломеразы; hTERT – каталитическая субъединица теломеразы человека; hgTER – теломеразная РНК *Heterocephalus glaber*.

## ВВЕДЕНИЕ

В процессе старения происходит снижение функциональной активности стволовых клеток [1–3], что, предположительно, нарушает восстановление различных тканей и органов и их функционирование. Важную роль в накоплении повреждений ДНК при репликативном старении стволовых клеток играет укорочение теломер [4]. Эксперименты на мышах с нокаутом матричной РНК TERT показали, что укорочение теломер отрицательно влияет на функции соматических и зародышевых стволовых клеток [5]. Ключевым компонентом системы поддержания длины теломер яв-

ляется теломераза [6, 7]. Временная активация TERT в мышах с нарушением экспрессии теломеразной обратной транскриптазы привела к увеличению длины теломер, снижению ответа на повреждение ДНК, исчезновению возрастных изменений в различных органах, включая семенники, селезенку, кишечник, и даже к восстановлению нейрогенеза [7]. Более того, экспрессия теломеразы в здоровых стареющих мышах приводила к значительному увеличению продолжительности их жизни [8].

Добавляя G-богатые повторы на 3'-конец ДНК, теломераза решает проблему недорепликации

концов хромосом и их защиты от деградации [9]. Для проявления теломеразной активности *in vitro* необходимы TERT и теломеразная РНК, которая служит матрицей для синтеза теломерных повторов [10]. Кроме того, TERT участвует в различных клеточных процессах, таких, как деление клетки, окислительный стресс, работа митохондрий и т.д. [11], не связанных непосредственно с удлинением теломер. В большинстве тканей человека hTERT или отсутствует, или обнаруживается в очень небольших количествах [12]. Теломеразная РНК человека, напротив, экспрессируется в тканях различных органов, включая половые органы, головной мозг, печень, тонкий кишечник, тимус и почки. Это позволяет предположить, что hTR выполняет и альтернативные функции [13]. В некоторых линиях раковых клеток степень удлинения теломер определяется уровнем экспрессии TERT, однако в живых организмах более важным оказывается количество TER в стволовых клетках. Так, анализ скрещиваний мышей, дефектных по генам *TER* и *TERT*, показал, что увеличение числа молекул TER, но не TERT, критично для элонгации теломер [14]. Эктопическая экспрессия TER человека (hTR) в бластоцистах крупного рогатого скота вызывает увеличение длины теломер. В то же время коэкспрессия hTERT вместе с hTR не приводила к еще большему удлинению теломер [15], что также подтверждает критичность количества теломеразной РНК для активности теломеразы.

Недавно были секвенированы геном и транскриптом голого землекопа *Heterocephalus glaber* [16, 17]. Гольный землекоп имеет необычно большую для грызунов продолжительность жизни (более 28 вместо 1.5–7 лет у других грызунов), повышенную устойчивость к канцерогенезу и замедленное старение [18].

Сравнительное изучение генома *H. glaber* может способствовать выявлению причин удивительно долгой жизни этого животного. Уже найдены несколько генетических отличий, способных объяснить повышенный уровень репарации ДНК, более низкий уровень повреждений при окислительном стрессе и др. [5, 19]. Еще одной причиной большой продолжительности жизни голых землекопов может быть повышенная теломеразная активность в стволовых клетках или реактивация теломеразы под воздействием определенных импульсов. Мы сравнили структуру гена теломеразной РНК голого землекопа и его промоторного участка со структурами генов и промоторных участков теломеразных РНК других организмов в попытке найти характерные отличия, которые могут быть причиной увеличения экспрессии hgTER (*H. glaber* TER) и теломеразной активности в стволовых клетках.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Сравнение нуклеотидных последовательностей теломеразных РНК

Поиск гена *hgTER* был проведен по всему геному *H. glaber*, полученному в ходе «шотган»-эксперимента и доступному в базе данных GenBank по ID: AFSB (GenBank: ANKG00000000.1) и ANKG (GenBank: AFSB00000000.1). Для построения выравнивания уже известных и хорошо изученных генов теломеразных РНК мы использовали алгоритм ClustalW. В выравнивание были включены следующие нуклеотидные последовательности: TER морской свинки *Cavia porcellus* (GenBank: AF221929.1), WGS-сборка генома *C. porcellus* (GenBank: AAKN00000000.2), *Chinchilla chinchilla* TER (GenBank: AF221937.1), WGS (GenBank: AGCD00000000.1), *Mus musculus* TER (GenBank: NR\_001579.1), хромосома 3 (GenBank: NC\_000069.6), *Rattus norvegicus* TER (GenBank: NR\_001567.1), хромосома 2 (GenBank: NC\_005101.3), TER человека (GenBank: NR\_001566.1), хромосома 3 человека (GenBank: NC\_000003.11), *Danio rerio* TER (GenBank: EF569636.1) и хромосома 25 (GenBank: CU651628.3).

Анализ выравнивания нуклеотидных последовательностей и влияния замен консервативных нуклеотидов был сделан вручную. Для анализа вторичной структуры использовали РНК *Suncus murinus* (GenBank: AF221921), *Geomys breviceps* (GenBank: AF221930), *Microtus ochrogaster* (GenBank: AF221909), *Mus spretus* (GenBank: AY058901), *Mus musculus* (GenBank: AY058900), *Dasyurus hallucatus* (GenBank: AF221919), *Bufo japonicus* (GenBank: AF221913) и *Typhlonectes natans* (GenBank: AF221910).

### Сравнение промоторных областей генов теломеразных РНК

Поиск промоторных участков проведен с помощью базы данных JASPAR [20] с ограничением поиска по JASPAR CORE Vertebrate с порогом 99–100%. В дальнейшем анализе мы использовали ConSite с порогом 85–95% [21]. Относительные значения использовали в качестве нормализованных для численной оценки значимости совпадений [22]. Точечные исправления вносили при необходимости вручную. Визуализация множественного выравнивания также была исправлена вручную.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Полный ген *hgTER* был найден на основе поиска локальных выравниваний BLAST в сборке *H. glaber* (запись WGS ANKG) и сравнения с множественным выравниванием теломеразных РНК млекопитаю-

щих [23]. Конечное выравнивание доступно по адресу 93.180.62.254/hgTERC/ESM\_1.pdf.

Если исходить из филогенетических данных, то ближайшими родственниками *H. glaber* являются капибара, морская свинка, шиншилла и нутрия [18]. Последовательности TER определены только у шиншиллы (GenBank: AF221937.1) и морской свинки (GenBank: AF221929.1); именно эти последовательности и использовали в дальнейшем сравнении. Кроме того, использованы данные о вторичной структуре теломеразной РНК человека и промоторной области ее гена как наиболее изученной на данный момент.

Для анализа промоторного участка был выбран фрагмент из 500 нуклеотидов, расположенный перед предполагаемым стартом транскрипции. Выбор длины промоторного участка был обусловлен тем, что именно в этой области расположены основные регуляторные элементы hTR [24]. Поиск сайтов связывания факторов транскрипции в промоторной области гена *TER H. glaber* проводили с помощью веб-сервисов JASPAR [20] и ConSite [21]. Эти инструменты позволяют анализировать любые данные секвенирования, работать с большими позиционными весовыми матрицами и получать оптимальные результаты благодаря эффективной системе фильтрации.

Такой подход позволяет уменьшить число предсказываемых сайтов связывания факторов транскрипции в промоторной области *hTER* по сравнению с ранее заявленным [24]. В промоторных областях генов теломеразных РНК, выделенных из четырех разных видов, нами найдены регуляторные элементы (93.180.62.254/hgTERC/ESM\_2.pdf). Полная карта промоторных участков доступна по адресу 93.180.62.254/hgTERC/ESM\_3\_old.pdf. В промоторном участке *hgTER* обнаружены ТАТА-блок вблизи старта транскрипции, сайт NF- $\Upsilon$  с консервативным участком ССААТ, три сайта SP1, сайты ELK4 и SOX17.

Сайт связывания фактора транскрипции ELK4 ранее не был найден ни в одной из известных теломеразных РНК. Он расположен приблизительно за 170 нуклеотидов до точки начала транскрипции TER. Этот сайт найден нами в промоторных участках всех проанализированных последовательностей; значение вероятностей ( $p$ ) вычислено с помощью MAST. У голого землекопа абсолютное значение составило 14.059 (относительное значение 0.9999,  $p = 3.3 \times 10^{-6}$ ), у морской свинки – 11.056 (0.9034,  $4.1 \times 10^{-5}$ ), шиншиллы – 12.053 (0.9311,  $2.2 \times 10^{-5}$ ), человека – 10.398 (0.9396,  $5.5 \times 10^{-5}$ ), что означает очень высокую вероятность (> 90%) связывания TER фактора ELK4 с промоторным участком, по крайней мере, согласно данным биоинформатики.

В процессе поиска мы обнаружили, что матрица сайта связывания ELK4 [25], представленная в базе JASPAR, устарела [25–27] и приводит к ложноположительным результатам при анализе большинства белков ETS, за исключением семейств I и II [28]. Поскольку мы работаем с очень небольшой выборкой последовательностей, а разница между новой и старой матрицей в этом случае нивелируется, мы использовали старую матрицу PWM.

Множественное выравнивание показало, что теломеразная РНК всех четырех видов – человека, морской свинки, голого землекопа и шиншиллы, содержит участок связывания ETS. В этих сайтах обнаружены переменные нуклеотиды в положениях 1, 8 и 9 PWM, что соответствует уже известным вариантам сайтов ETS [26, 27, 29]. Таким образом, мы полагаем, что найденный сайт является регуляторным элементом, расположенным в промоторной области *hgTER*.

Участок взаимодействия с SOX17 обнаружен только в промоторной области *hgTER*, приблизительно за 430 нуклеотидов до сайта старта транскрипции. Присутствие этого сайта только в промоторе *hgTER*, но не других эволюционно близких организмов, может быть принципиальным отличием между этими видами. Белок SOX17 содержит HMG-бокс (Pfam-домен High Mobility Group box), ответственный за взаимодействие со структурами ДНК, не относящимися к В-типу, в том числе с изогнутой или расплетенной ДНК [30]. Этот домен взаимодействует с характерным мотивом ДНК, практически идентичным для всех белков семейства HMG-бокс [31, 32], однако SOX17 [33, 34] является исключением из этого правила. SOX17 содержит домен Sox\_C\_TAD (Pfam: PF12067), и его сайт связывания сильно отличается от канонического – ААСААТ [32, 35].

Основываясь на сходстве архитектуры большинства теломеразных РНК, мы предположили, что и в *hgTER* есть известные элементы структуры [23]. При дальнейшем анализе *hgTER* мы обращали внимание, в первую очередь, на отличия в функционально важных элементах вторичной структуры теломеразной РНК.

Сравнение *hgTER* с теломеразными РНК ближайших «родственников» голого землекопа (морская свинка и шиншилла) и РНК модельных организмов (крыса, мышь, человек) выявило несколько отличий, большинство из которых не были уникальными для TER *H. glaber* и не затрагивали функциональные элементы. Однако две нуклеотидные замены находились в функционально важном участке *hgTER* (рис. 1А, Б).

Первая замена А → G обнаружена в первой петле псевдоузла CR2-p3 в положении, соответствующем 111 нуклеотиду в *hTER*, она приводит к образованию

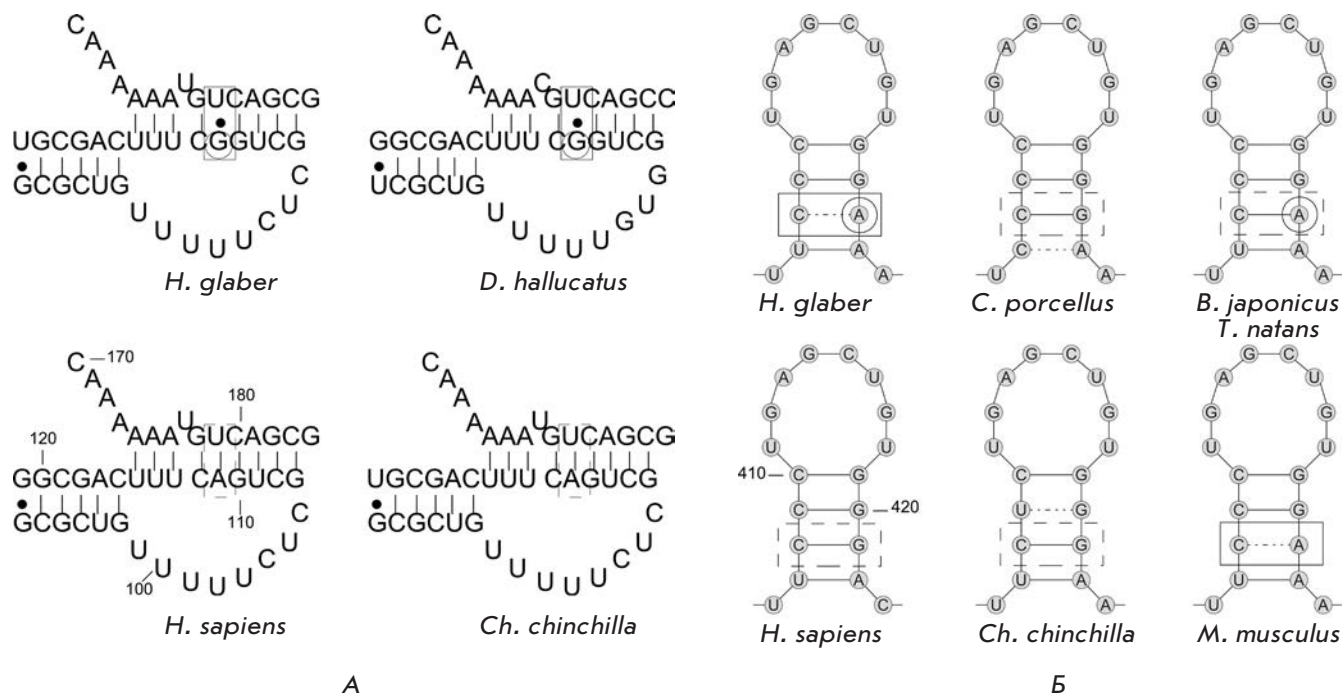


Рис. 1. Участки CR2-p3 и CR7-p8b теломеразной РНК различных видов. Отмечены нуклеотидные замены. Неканоническое спаривание оснований показано пунктирной линией, замены – кружком; Уотсон-Криковские пары – сплошной линией. А – участок CR2-p3 TER голого землекопа, северной сумчатой куницы, человека, шиншиллы. Б – участок CR7-p8b TER голого землекопа, морской свинки, японской жабы, широкоголовой червяги, человека, шиншиллы и мыши

неканонической пары G–U в псевдоузле. В большинстве теломеразных РНК в этом месте образуется каноническая пара. Более того, в теломеразных РНК других организмов, также содержащих замену A → G в соответствующем положении, обнаружена комплементарная замена U → C (положение 179 по hTER), восстанавливающая каноническую пару оснований в этом месте (например, TER *G. breviceps* и *M. ochrogaster*) [23]. Пара G–U найдена в TER только голого землекопа, северной сумчатой куницы и бурой землеройки [23].

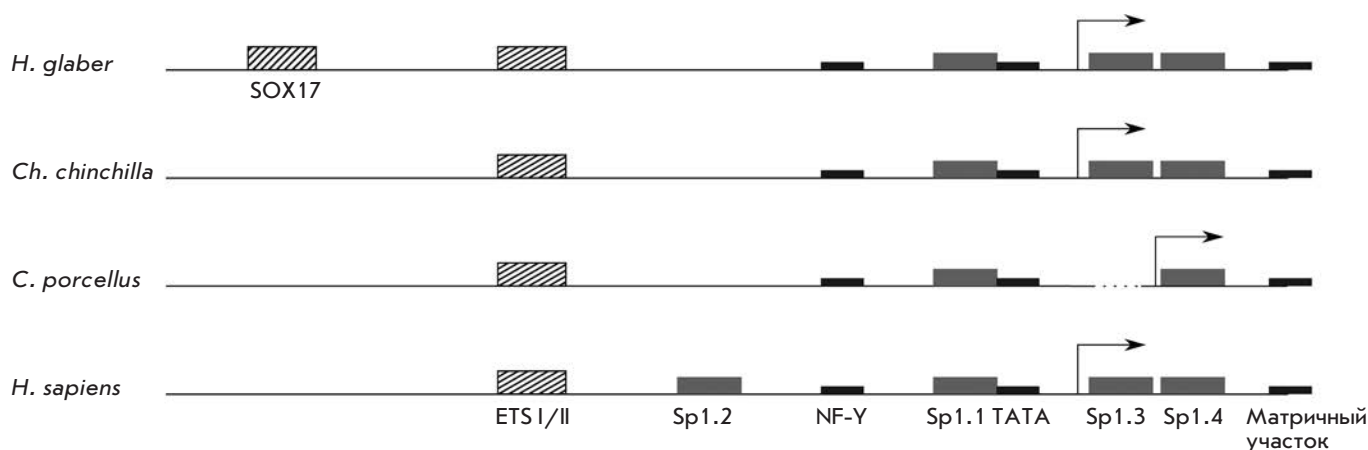
Вторая интересная замена, найденная нами, это G → A в стебле шпильки CR7-p8b, соответствующая позиции 421 в теломеразной РНК человека. Замена G на A приводит к образованию неканонической пары C–A на конце стебля p8b, в то время как у большинства теломеразных РНК в этом положении находится каноническая пара. У амфибий (жаба и червяга) замена G421 → A сопровождается восстановлением Уотсон-Криковской пары за счет замены C → U в положении 408 [23]. У близких родственников голого землекопа, таких, как шиншилла, морская свинка, мышь, найдены другие нарушения двойной спирали в p8b [23], однако замена в положении 421 теломеразной РНК уникальна для *H. glaber*.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Теломеразная РНК – ключевой компонент системы поддержания длины теломер. Повышение экспрессии теломеразной РНК, а следовательно, теломеразной активности в стволовых клетках и различных тканях на разных стадиях развития организма определяет повышение пролиферативного потенциала этих клеток за счет удлинения теломер. Сравнение нуклеотидной последовательности гена теломеразной РНК *H. glaber* и его промоторной области и генов других видов выявило вариации как в промоторном участке, так и в структуре теломеразной РНК.

При анализе 500 нуклеотидов, предшествующих началу транскрипции *hgTER*, обнаружены как уже известные регуляторные элементы, так и несколько новых: сайт ETS, представленный в *TER* четырех рассмотренных модельных организмов, и сайт SOX17, найденный только у *H. glaber* (рис. 2). Все общие элементы находятся в участке размером ~270 нуклеотидов, что согласуется с результатами анализа и защиты регуляторного участка *TER* человека от разрезания ДНКазой I [36]. Эта область содержит ТАТА-блок вблизи старта транскрипции, сайт NF-Υ с консервативным участком ССААТ, сайты SP1 и впервые обнаруженный сайт ETS. В hTER че-





**Рис. 2.** Схема аннотации промоторной области гена теломеразной РНК человека, морской свинки, голого землекопа и шиншиллы. Известные элементы промотора показаны серыми прямоугольниками, предполагаемые элементы, предсказанные в данном исследовании, – заштрихованными прямоугольниками

ловека в этой области ранее были выявлены четыре Sp1-сайта (Sp1.1, Sp1.2, Sp1.3 и Sp1.4). Сравнение TER *H. glaber* и близкородственных видов говорит о том, что у отдельных видов могут отсутствовать один или несколько таких сайтов. Например, Sp1.2-сайта нет в TER всех грызунов, у морской свинки отсутствует и Sp1.3-сайт. С промоторным участком в гене *hTER* могут связываться два фактора транскрипции – Sp1 и Sp3 – Sp1 стимулирует экспрессию, а Sp3 вызывает ее дозозависимую репрессию [36]. Предполагается, что в гене *TER* человека сайты, расположенные вблизи участка ССААТ, связываются с фактором NF-Y независимо от того, с какой стороны они находятся, и участвуют в передаче как положительных, так и отрицательных регуляторных сигналов [37]. У *H. glaber* эту роль может выполнять сайт Sp1.1. В зависимости от того, с какими белками взаимодействуют факторы транскрипции Sp1.3 и Sp1.4, их сайты связывания, расположенные вблизи старта транскрипции, также могут действовать как положительные или отрицательные регуляторы транскрипции [38]. Предполагается, что важную роль в выборе фактора, с которым свяжется конкретный сайт – Sp1 или Sp3, которые по-разному влияют на уровень транскрипции *TER*, играет окружение этого сайта. Так, отсутствие сайта Sp1.2 у грызунов может приводить к отличиям в тонкой регуляции транскрипции *TER* белками Sp и делать эту регуляцию более чувствительной к окружению оставшихся Sp-сайтов. У *H. glaber* это может положительно влиять на эффективность транскрипции.

Новый обнаруженный нами участок связывания ELK4 расположен в области, еще на 272 нуклеотида отстоящей от начала транскрипции. ELK4 при-

надлежит к семейству ETS-факторов транскрипции [29]. Хотя выявленный нами участок ДНК *H. glaber* полностью соответствует сайту связывания ELK4, другие члены семейства ETS также могут с ним взаимодействовать [28]. Кроме того, фактор ELK4 служит мишенью каскада, активируемого рецептором андрогенов (androgen receptor activating cascade). Блокада сигнального пути андрогенов, наблюдаемая при раке предстательной железы, приводит к снижению теломеразной активности, что косвенно подтверждает участие ELK4 в регуляции транскрипции *TER* [25].

Участок связывания SOX17 найден только в гене *TER H. glaber*. Он расположен примерно в 430 нуклеотидах до старта транскрипции, т.е. вне области длиной 272 нуклеотида, важной для транскрипции *hTER*. SOX17 входит в семейство SOX HMG-подобных белков. Последовательность ААСААТ, с которой связывается SOX17, идентична участку связывания других членов семейства SOX, и взаимодействие конкретного белка определяется контекстом около стандартного сайта. SOX17 (SRV-box 17) – это фактор транскрипции, вовлеченный в регуляцию нескольких процессов [39, 40], включая образование энтодермы, развитие сосудистой системы и поддержание кроветворных стволовых клеток зародыша.

Экспрессия *Sox17* в гемопоэзе ограничена зародышевыми гемопоэтическими стволовыми клетками (HSCs) [41] и влияет на способность взрослых клеток-предшественников к самообновлению [42]. Другие белки семейства SOX участвуют в регуляции различных клеточных процессов. Недостаток данных не позволяет высказать предположение о том, каким образом наличие сайта связывания SOX17 влияет на уровень теломеразной РНК, однако, по-видимому,

у *H. glaber* появляется дополнительная возможность увеличения теломеразной активности, особенно в зародышевых стволовых клетках. Это согласуется с полученными ранее результатами, показавшими, что у таких долгожителей, как голый землекоп и серая белка, теломеразная активность выше, чем у мышей [43].

Активность теломеразы зависит не только от уровня транскрипции компонентов теломеразного комплекса, но и от множества других процессов, таких, как созревание ТЕР, транспорт и сборка теломеразы, взаимодействие между ТЕР и ТЕРТ и т.д. Мутации в теломеразной РНК могут влиять на эти процессы.

Мы нашли две редких нуклеотидных замены в функционально важных участках ТЕР: A111 → G и G421 → A. Замена A111 → G расположена в псевдоузле P2b-p3. (рис. 1А), высококонсервативном элементе теломеразной РНК [23]. Эффект именно этой мутации на теломеразную активность не установлен, однако известные мутации, дестабилизирующие псевдоузел, сильно влияют на теломеразную активность и ассоциированы с такими заболеваниями, как апластическая анемия, миелодисплазия и лейкоз [44]. Более того, мутации в псевдоузле снижают теломеразную активность [45] и приводят к развитию врожденного дискератоза [46]. У других животных замена A111 → G сопряжена с компенсирующей заменой U179 → C, восстанавливающей каноническую пару нуклеотидов. Пара G-U, образующаяся при замене A → G в ТЕР *H. glaber*, вызывает очень незначительное нарушение спирали РНК, в отличие от остальных неканонических пар [47]. Такие же нуклеотиды в этом положении найдены только у северной сумчатой куницы и бурой землеройки. Продолжительность жизни у северной сумчатой куницы примерно 7 лет, а у землеройки – около 3 [48]. Таким образом, явной взаимосвязи между наличием этой пары в псевдоузле и продолжительностью жизни животного не наблюдается.

Замена G → A в положении 421 ТЕР приводит к образованию неканонической пары C-A в шпильке p8b. У большинства млекопитающих в этом положении ТЕР находятся канонические пары. Более того, замена C → G в паре C-G (положения 408–421) ТЕР человека приводит к врожденному дискератозу [46]. У других грызунов встречаются замены, нарушающие шпильку p8b. Замена G → A в hgTER относится к тому же классу, однако является уникальной для голого землекопа. p8b входит в состав домена CR7-p8b (H/ACA), необходимого для процессинга 3'-конца теломеразной РНК человека, ее локализации и стабильности [49]. CR7 содержит консервативный элемент, необходимый для локализации РНК в тельцах Кахала (CAB box) [50]. С этим участком связывается белок TCAB1 человека [51] и транспортирует РНК в тельца Кахала. Нокаун TCAB1 нарушает ассоциацию теломеразы с теломерами и приводит к их укорочению [52]. В случае hgTER неканоническая пара C-A в p8b может улучшать взаимодействие с TCAB1, облегчая транспорт теломеразы и способствуя эффективной элонгации теломер.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение hgTER и других теломеразных РНК предполагает, что обнаруженные особенности как структуры hgTER, так и промоторной области ее гена могут способствовать повышению уровня экспрессии теломеразной РНК в стволовых клетках и, как следствие, увеличению продолжительности жизни голого землекопа. Мы надеемся, что найденные нами особенности hgTER и промоторной области ее гена помогут изучению этих процессов *in vivo*. ●

*Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (грант № 8297), РФФИ (гранты № 11-04-01310-а и 14-04-01092-а), программой развития Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (ПНР 5.13).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rando T.A. // Nature. 2006. V. 441. P. 1080–1086. doi:10.1038/nature04958
2. van Zant G., Liang Y. // Exp. Hematol. 2003. V. 31. № 8. P. 659–672. doi: 10.1016/S0301-472X(03)00088-2
3. Rossi D.J., Bryder D., Weissman I.L. // Exp. Gerontol. 2007. V. 42. P. 385–390. doi: 10.1016/j.exger.2006.11.019
4. Tümpel S., Rudolph K.L. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2012. № 1266. P. 28–39. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06547.x
5. Blasco M.A. // Nat. Chem. Biol. 2007. № 3. P. 640–649. doi:10.1038/nchembio.2007.38
6. Nicholls C., Li H., Wang J.Q., Liu J.P. // Protein Cell. 2011. № 2. P. 726–738. doi: 10.1007/s13238-011-1093-3
7. Jaskelioff M., Muller F.L., Paik J.H., Thomas E., Jiang S., Adams A.C., Sahin E., Kost-Alimova M., Protopopov A., Cadiñanos J., et al. // Nature. 2011. № 469. P. 102–106. doi: 10.1038/nature09603
8. Bernardes de Jesus B., Vera E., Schneeberger K., Tejera A.M., Ayuso E., Bosch F., Blasco M.A. // EMBO Mol. Med. 2012. № 4. P. 691–704. doi: 10.1002/emmm.201200245
9. Collins K. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2011. № 15. P. 643–648. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.07.011
10. Kelleher C., Teixeira M.T., Forstemann K., Lingner J. // Trends Biochem. Sci. 2002. № 27. P. 572–579. doi: 10.1016/S0968-0004(02)02206-5
11. Chiodi I., Mondello C. // Front. Oncol. 2012. № 2. P. 133. doi: 10.3389/fonc.2012.00133
12. Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T., Shay W.J. // Neoplasia. 2001. № 3. P. 17–26.
13. Smekalova E.M., Shubernetskaya O.S., Zvereva

- M.I., Gromenko E.V., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. № 77. P. 1120–1128. doi: 10.1134/S0006297912100045
14. Chiang Y.J., Hemann M.T., Hathcock K.S., Tessarollo L., Feigenbaum L., Hahn W.C., Hodes R.J. // *Mol. Cell Biol.* 2004. № 24. P. 7024–7031. doi:10.1128/MCB.24.16.7024-7031.2004
15. Garrels W., Kues W.B., Herrmann D., Holler S., Baulain U., Niemann H. // *Biol. Reprod.* 2012. № 87. P. 95. doi: 10.1095/biolreprod.112.100198
16. Kim E.B., Fang X., Fushan A.A., Huang Z., Lobanov A.V., Han L., Marino S.M., Sun X., Turanov A.A., Yang P., et al. // *Nature*. 2011. № 479. P. 223–227. doi: 10.1038/nature10533
17. Yu C., Li Y., Holmes A., Szafranski K., Faulkes C.G., Coen C.W., Buffenstein R., Platzer M., de Magalhães J.P., Church G.M. // *PLoS One*. 2011. № 6. e26729. doi: 10.1371/journal.pone.0026729
18. Gorbunova V., Bozzella M.J., Seluanov A. // *Age (Dordr)*. 2008. № 30. P. 111–119. doi: 10.1007/s11357-008-9053-4
19. Liang S., Mele J., Wu Y., Buffenstein R. // *Aging Cell*. 2010. № 9. P. 626–635. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00588.x
20. Sandelin A., Alkema W., Engström P., Wasserman W.W., Lenhard B. // *Nucl. Acids Res.* 2004. № 32. D91–D94. doi: 10.1093/nar/gkh012
21. Sandelin A., Wasserman W.W., Lenhard B. // *Nucl. Acids Res.* 2004. № 32. P. 249–252. doi: 10.1093/nar/gkh372
22. Wasserman W.W., Sandelin A. // *Nat. Rev. Genet.* 2004. № 5. P. 276–287. doi:10.1038/nrg1315
23. Chen J.L., Blasco M.A., Greider C.W. // *Cell*. 2000. № 100. P. 503–514. dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80687-X
24. Zhao J.Q., Hoare S.F., McFarlane R., Muir S., Parkinson E.K., Black D.M., Keith W.N. // *Oncogene*. 1998. № 16. P. 1345–1350.
25. Makkonen H., Jääskeläinen T., Pitkänen-Arsiola T., Rytinki M., Waltering K.K., Mättö M., Visakorpi T., Palvimo J.J. // *Oncogene*. 2008. № 27. P. 4865–4876. doi: 10.1038/onc.2008.125
26. Shore P., Sharrocks A.D. // *Nucl. Acids Res.* 1995. № 23. P. 4698–4706. doi: 10.1093/nar/23.22.4698
27. Mo Y., Vaessen B., Johnston K., Marmorstein R. // *Mol. Cell*. 1998. № 2. P. 201–212. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80130-6
28. Wei G.H., Badis G., Berger M.F., Kivioja T., Palin K., Enge M., Bonke M., Jolma A., Varjosalo M., Gehrke A.R., et al. // *EMBO J*. 2010. № 29. P. 2147–2160. doi: 10.1038/emboj.2010.106
29. Sharrocks A.D., Brown A.L., Ling Y., Yates P.R. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998. № 29. P. 1371–1387. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00086-1
30. Stros M., Launholt D., Grasser K.D. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. № 64. P. 2590–2606. doi: 10.1007/s00018-007-7162-3
31. Denny P., Swift S., Connor F., Ashworth A. // *EMBO J*. 1992. № 11. P. 3705–3712.
32. Laudet V., Stehelin D., Clevers H. // *Nucl. Acids Res.* 1993. № 21. P. 2493–2501. doi: 10.1093/nar/21.10.2493
33. Dunn T.L., Mynett-Johnson L., Wright E.M., Hosking B.M. // *Gene*. 1995. № 161. P. 223–225. doi: 10.1016/0378-1119(95)00280-J
34. Kanai Y., Kanai-Azuma M., Noce T., Saido T.C. // *J. Cell Biol.* 1996. № 133. P. 667–681. doi: 10.1083/jcb.133.3.667
35. Mertin S., McDowall S.G., Harley V.R. // *Nucl. Acids Res.* 1999. № 27. P. 1359–1364.
36. Zhao J.Q., Glasspool R.M., Hoare S.F., Bilsland A., Szatmari I., Keith W.N. // *Neoplasia*. 2000. № 2. P. 531–539. doi: 10.1038/sj.neo.7900114
37. Zhao J., Bilsland A., Hoare S.F., Keith W.N. // *FEBS Lett.* 2003. № 536. P. 111–119. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00038-3
38. Li L., Davie J.R. // *Ann. Anat.* 2010. № 192. P. 275–283. doi: 10.1016/j.aanat.2010.07.010
39. Séguin C.A., Draper J.S., Nagy A., Rossant J. // *J. Cell. Stem Cell*. 2008. № 3. P. 182–195. doi: 10.1016/j.stem.2008.06.018
40. Patterson E.S., Addis R.C., Shablott M.J., Gearhart J.D. // *Physiol. Genomics*. 2008. № 34. P. 277–284. doi: 10.1152/physiolgenomics.90236.2008
41. Kim I., Saunders T.L., Morrison S.J. // *Cell*. 2007. № 130. P. 470–483. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.011
42. He S., Kim I., Lim M.S., Morrison S.J. // *Genes Dev.* 2011. № 25. P. 1613–1627. doi: 10.1101/gad.2052911
43. Seluanov A., Chen Z., Hine C., Sasahara T.H. // *Aging Cell*. 2007. № 6. P. 45–52. doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00262.x
44. Vulliamy T., Marrone A., Dokal I., Mason P.J. // *Lancet*. 2002. № 359. P. 2168–2170. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09087-6
45. Chen J.L., Greider C.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. № 102. P. 8080–8085. doi: 10.1073/pnas.0502259102
46. Vulliamy T., Marrone A., Goldman F., Dearlove A., Bessler M., Mason P.J., Dokal I. // *Nature*. 2001. № 413. P. 432–435. doi:10.1038/35096585
47. Leontis N.B., Westhof E. // *RNA*. 1998. № 4. P. 1134–1153. doi: 10.1017/S1355838298980566
48. de Magalhães J.P., Costa J. // *J. Evol. Biol.* 2009. № 22. P. 1770–1774. doi: 10.1111/j.1420-9101.2009.01783.x
49. Theimer C.A., Jády B.E., Chim N., Richard P., Breece K.E., Kiss T., Feigon J. // *J. Mol. Cell*. 2007. № 27. P. 869–881. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.017
50. Jády B.E., Bertrand E., Kiss T. // *J. Cell Biol.* 2004. № 164. P. 647–652. doi: 10.1083/jcb.200310138
51. Tycowski K.T., Shu M.D., Kukoyi A., Steitz J.A. // *Mol. Cell*. 2009. № 34. P. 47–57. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.020
52. Venteicher A.S., Abreu E.B., Meng Z., McCann K.E., Terns R.M., Veenstra T.D., Terns M.P. // *Artandi SE Sci.* 2009. № 323. P. 644–648. doi: 10.1126/science.1165357



УДК 543.054:544.169:547.413.5

# Высокоэффективный метод одностадийного выделения ДНК для ПЦР-диагностики *Mycobacterium tuberculosis*

Д. В. Капустин<sup>1\*</sup>, А. И. Простякова<sup>1</sup>, Я. И. Алексеев<sup>2,3</sup>, Д. А. Варламов<sup>2,3</sup>, В. П. Зубов<sup>1</sup>,  
С. К. Завриев<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ЗАО «Синтол», 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

<sup>3</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии  
РАСХ, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

\*E-mail: kapustin@ibch.ru

Поступила в редакцию 09.10.2013

После доработки 14.03.2014

**РЕФЕРАТ** Сравнили эффективность выделения ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* из лизированных образцов мокроты двумя способами с помощью спин-картриджей, содержащих сорбент на основе кремнезема, модифицированного фторопластом и полианилином, и с помощью автоматической системы выделения. Показано, что при одностадийном выделении с использованием сорбента существенно снижаются потери ДНК и обеспечивается большая чувствительность выявления ДНК *M. tuberculosis complex* по сравнению с системой, основанной на сорбции и десорбции нуклеиновых кислот в ходе выделения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** выделение ДНК, композиционные сорбенты, *Mycobacterium tuberculosis complex*, полианилин, ПЦР-диагностика, фторополимеры.

## ВВЕДЕНИЕ

Очищенные препараты нуклеиновых кислот, выделенные из различных биологических источников, все шире применяются в биомедицинских исследованиях (например, при секвенировании, в качестве иммуномодулирующих агентов или противоопухолевых препаратов, при конструировании средств доставки лекарств и т.д.), особенно в биоанализе и медицинской диагностике, во многом благодаря успешному развитию ПЦР-технологии. Эффективность методов подготовки пробы зависит от разработки быстрых и воспроизводимых способов выделения ДНК, непосредственно пригодной для ПЦР-диагностики. Описаны различные методы выделения нуклеиновых кислот, доступны коммерческие наборы, которые соответствуют задаче выделения и используются как при решении исследовательских задач, так и в клинической практике. Впервые применять частицы кремнезема для сорбции ДНК в присутствии хаотропной соли предложили еще в 1979 г. [1], в 1990 г. этот метод был усовершенствован [2], и его различные варианты используются по сей день. Ши-

рокое распространение получили методы выделения нуклеиновых кислот с использованием магнитных частиц на основе кремнезема [3], волокон, модифицированных кремнеземными частицами [4], аффинных кремнеземных частиц [5] и т.д.

Как правило, методы разделения и выделения биополимеров основаны на различиях в растворимости нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов. Сущность этих методов заключается в «улавливании» целевого биополимера сорбентом из смеси и его удерживании на первом этапе разделения, отмывке от примесей и элюции целевого компонента с поверхности сорбента на следующих этапах. Таким образом, процедуры выделения многостадийны, трудоемки, требуют значительных временных затрат, трудно автоматизируются и не всегда обеспечивают достаточную для проведения эффективного ПЦР-анализа степень чистоты выделяемой ДНК. Последнее, как правило, зависит от присутствия в образце ингибиторов ПЦР (например, гема в образцах крови, различных типов хлорофилла в лизатах растительной ткани, гуминовых кислот в образцах почвы и т.д.).

Очевидно, что более привлекательной и перспективной является одностадийная схема выделения. В этом случае выделяемый (и одновременно очищаемый) биополимер проходит через слой сорбента, не удерживаясь на его поверхности, в то время как мешающие ПЦР примеси эффективно удерживаются сорбентом. Несколько лет назад мы разработали одностадийную процедуру выделения ДНК, основанную на использовании уникальных сорбционных свойств некоторых полимеров, а именно фторполимеров (ФП) [6] и полианилина (ПАНИ) [7, 8]. Покрытия из таких полимеров, например, сформированные на поверхности пористого кремнезема, не удерживают ДНК, но адсорбируют белки и ингибирующие ПЦР компоненты, присутствующие в типичных биологических образцах (бактериальные или растительные лизаты, мазки, плазма, кровь и т.д.).

Нами разработан ряд методов синтеза фторполимер- и ПАНИ-содержащих композиционных сорбентов на основе различных физико-химических процессов [9, 10]. Как фторполимеры, так и ПАНИ, применяемые в качестве модификаторов поверхности сорбентов, обеспечивают одностадийное выделение нуклеиновых кислот из сложных биологических смесей, однако каждый из этих полимерных модификаторов приносит дополнительные существенные полезные свойства. Так, фторполимерсодержащие сорбенты отличаются исключительной химической стойкостью, низким уровнем неспецифической сорбции и, как правило, обеспечивают наиболее высокий выход ДНК. В свою очередь, ПАНИ-содержащие сорбенты, демонстрирующие превосходную смачиваемость и высокую поверхностную емкость, могут с успехом применяться для выделения ДНК из «сложных» биологических смесей (кровь, лизаты растительной ткани, экстракты почвы и т.д.), а также для разделения нуклеиновых кислот в зависимости от их вторичной структуры.

В этой связи особый интерес представляют материалы, модифицированные нанослоями фторполимера и ПАНИ одновременно. Ранее мы докладывали об успешном применении такого материала для одностадийного выделения преимущественно двухцепочечной ДНК вируса гепатита В человека и одноцепочечной ДНК вируса ТТВ (*Transfusion transmitted virus, Torque teno virus* – вирус, передающийся при переливании крови), пригодных для ПЦР-анализа, из образцов плазмы крови человека [11]. Однако до сих пор применимость таких сорбентов для экспресс-выделения ДНК патогенов человека не вирусной природы из клинических образцов изучена недостаточно. В настоящей статье рассмотрено применение кремнеземного сорбента, модифицированного комбинацией нанослоев фторопласта ФП и ПАНИ,

для одностадийного выделения ДНК из инактивированных клинических образцов мокроты, содержащих различное количество клеток возбудителей туберкулеза человека, объединенных под общим названием «микобактерии туберкулезного комплекса» (МТК – *M. tuberculosis complex*) и включающих такие виды микобактерий, как *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*.

Эффективность одностадийного выделения ДНК с помощью картриджей, содержащих ФП-ПАНИ-сорбент, сравнивали с автоматизированным многостадийным методом выделения ДНК МТК, разработанным ЗАО «Синтол» (Москва, Россия) на основе роботизированной станции Tecan Freedom EVO® PCR (Tecan Trading AG, Швейцария).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Анилин (марки «ос.ч.», Aldrich, Германия) перегоняли, отбирая фракции с  $n_d^{20}$  1.5863 в диапазоне температур 182–184°С. Персульфат аммония (Rotipuran®, Германия), соляная кислота, этанол – марки «х.ч.» (Aldrich, Германия); вода – стандарт Milli Q.

ДНК микобактерий туберкулеза из образцов мокроты выделяли с использованием пластиковых спин-картриджей, содержащих по 100 мг сорбента Si-500-ФП-ПАНИ, а также с помощью автоматической роботизированной станции Tecan Freedom EVO® PCR (Tecan Trading AG, Швейцария), адаптированной для набора «М-Сорб-Туб-Автомат» (ЗАО «Синтол», Россия), применяемого для автоматического выделения ДНК. Образцы мокроты лизировали, используя реагенты, входящие в состав набора «АмплиТуб-РВ» (ЗАО «Синтол», Россия), предназначенного для качественного и количественного определения микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени (лизирующий реагент В+, разбавитель, инактивирующий реагент А).

В работе использовали следующее дополнительное оборудование: центрифугу для микропробирок Циклотемп-903; термостат Циклотемп-303; микроцентрифугу-встряхиватель для микропробирок Циклотемп-901 (все оборудование производства ЗАО «Циклотемп», Россия); микропипетки переменного объема на 20, 200, 1000 мкл; штатив для пробирок объемом 1.5 мл; микропробирки объемом 1.5 мл; наконечники к микропипеткам.

### Получение ФП-ПАНИ-сорбента

Кремнезем Si-500 (100 г) вакуумировали в специальном реакторе в течение 30–40 мин, затем к носителю добавляли 500 мл 0.016% раствора ФП в ацетоне. Реактор, содержащий суспензию частиц кремнезема, инкубировали в ультразвуковой ванне при атмос-

ферном давлении в течение 15 мин. Затем растворитель удаляли на роторном испарителе при 40–45°C. В реактор вводили вторую порцию раствора полимера в ацетоне (500 мл) и повторяли манипуляции, следующие за введением первой порции раствора полимера. Полученный продукт сушили в вакууме до постоянного веса и использовали в качестве носителя при проведении окислительной полимеризации анилина как описано в [11].

### Протокол выделения микобактериальной ДНК с помощью картриджей, содержащих ФП-ПАНИ-сорбент

**Инактивация.** В экспериментах использовали модельные и клинические образцы мокроты. Для инактивации модельных образцов к 500 мкл мокроты, содержащей 600 КОЕ МТК/мл (в частности, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG и др.), добавляли 500 мкл инактивирующего реагента А. Все клинические образцы также предварительно инактивировали. Для этого к образцам мокроты, отобраным в 50-мл пробирки, добавляли инактивирующий реагент А до конечного объема 40 мл. Содержимое пробирки перемешивали, плавно переворачивая, до полной гомогенизации, а затем выдерживали в течение 30 мин. Пробирки центрифугировали (15 мин при 3500 об/мин). Супернатант сливали, осадок ресуспендировали и переносили в пробирки объемом 1.5 мл.

**Лизис.** Пробирки с исследуемым материалом центрифугировали (5 мин при 13000 об/мин), супернатант удаляли и добавляли 100 мкл лизирующего реагента В+. Содержимое пробирок тщательно перемешивали на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировали в течение 10 мин при 75°C. Пробирки центрифугировали на микроцентрифуге-встряхивателе 15 с. Полученную ДНК использовали в ПЦР, применяя наборы реагентов для обнаружения микобактерий туберкулезного комплекса «АмпЛиТуб-РВ» (для ручного выделения ДНК) и «М-Сорб-Туб-Автомат» (для автоматического выделения ДНК).

**Очистка ДНК.** В пробирки с образцами вносили по 400 мкл разбавителя, перемешивали, плавно пипетируя, содержимое наносили на картриджи с сорбентом, вставленные в пробирки-приемники. Центрифугировали в течение 1 мин при 4000 об/мин. Картриджи удаляли из приемников.

**ПЦР в реальном времени.** ПЦР в реальном времени проводили, используя анализатор АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) и соответствующий алгоритм, разработанный в ЗАО «Синтол». Используемый метод диагностики позволяет определять наличие в образце специфиче-

ских фрагментов ДНК гена IS6110, который присутствует во множестве копий в большинстве штаммов МТК, но при этом может отсутствовать в геноме *M. tuberculosis*. Одновременно метод позволяет определять количество специфического фрагмента ДНК *regX*, представленного в геноме МТК одной копией.

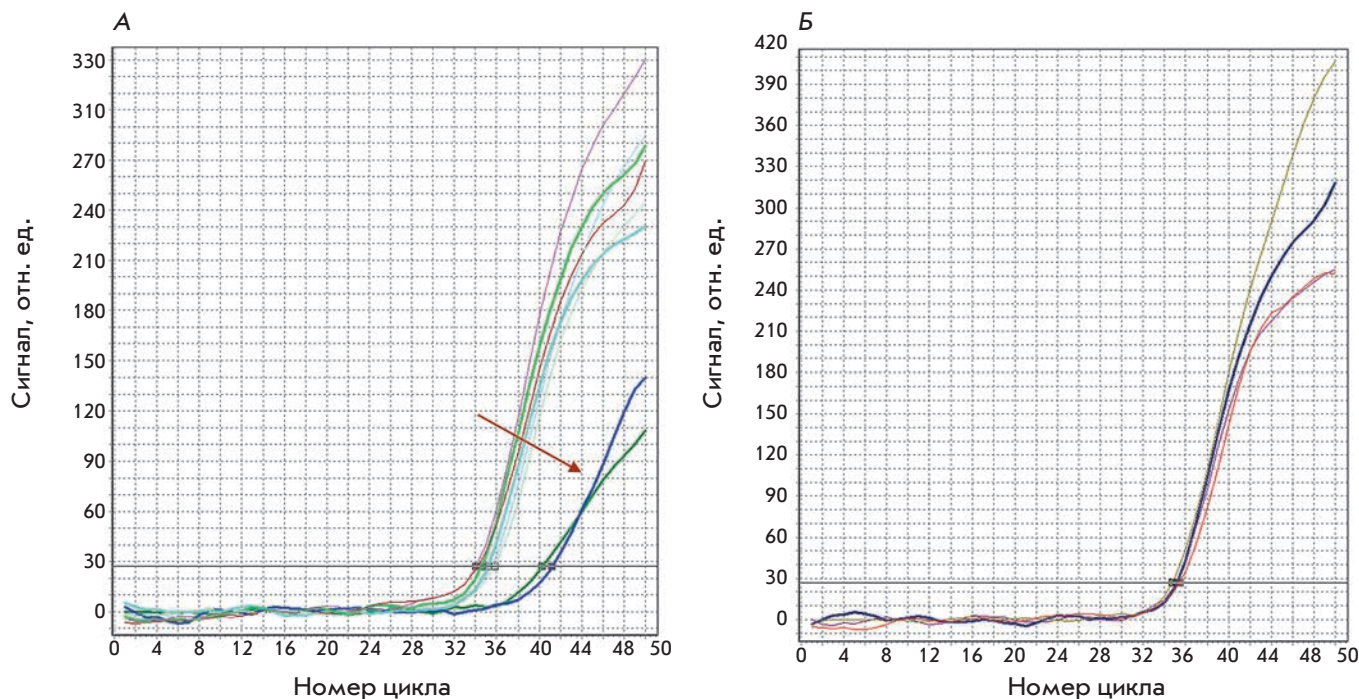
Условия проведения ПЦР с применением выделенных ДНК были идентичными.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты по выделению микобактериальной ДНК из контрольных модельных и клинических образцов мокроты проводили в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия). Сравнивали эффективность выделения ДНК из лизированных образцов мокроты двумя способами: с помощью картриджей, содержащих ФП-ПАНИ-сорбент, и с помощью автоматической системы выделения, созданной на базе роботизированной станции Tecan Freedom EVO® PCR (Tecan Trading AG, Швейцария). В последнем случае процедура выделения ДНК была основана на сорбции молекул нуклеиновой кислоты возбудителя туберкулеза на магнитных частицах, содержащих на поверхности олигонуклеотиды, последовательность нуклеотидов которых была комплементарной последовательности мишени в ДНК возбудителя. В результате в обеспечиваемых системой условиях ДНК возбудителя комплементарно связывается с поверхностью носителя. Затем автоматически проводятся удаление несвязанных с магнитными частицами примесей (включая ДНК, не содержащие последовательность-мишень) и элюция очищенной ДНК с поверхности магнитных частиц. Таким образом, в автоматизированной системе реализуется многостадийный процесс выделения ДНК, в то время как при использовании ФП-ПАНИ-сорбента осуществляется одностадийное выделение бактериальной ДНК. Выделенные препараты ДНК анализировали методом ПЦР в реальном времени. Таким образом оценивали эффективность амплификации ПЦР-фрагментов ДНК после одностадийного выделения с помощью ФП-ПАНИ-сорбента и после автоматического многостадийного выделения. Исследовали модельные образцы мокроты, содержащие 600 КОЕ/мл, и клинические образцы, полученные от случайно отобранных пациентов.

Результаты тестирования модельных образцов, представлены на *рисунке*, а также в *табл. 1*. Из *рисунка* видно, что эффективность амплификации ПЦР-фрагментов ДНК, не подвергнутых дополнительной очистке на картриджах с сорбентом (т.е. исходных неочищенных лизатов), заметно снижена (кривые, обозначенные стрелкой на *рис. А*, образец «исходный лизат» в *табл. 1*). Однако после разведения таких образцов эффективность амплификации





Результаты ПЦР в реальном времени с использованием микобактериальной ДНК, выделенной с помощью ФП-ПАНИ-сорбента из лизатов модельных образцов мокроты, содержащих 600 КОЕ/мл. А – стрелка указывает на кривые, полученные при использовании неочищенных на сорбенте образцов (исходные лизаты). Б – красная и коричневая кривые – образцы, очищенные с помощью ФП-ПАНИ-сорбента; синяя кривая – образец исходного лизата после разбавления без дополнительной очистки с помощью ФП-ПАНИ-сорбента

восстанавливается (за счет понижения относительной концентрации ингибиторов ПЦР в анализируемой пробе), и количество ПЦР-фрагментов становится сопоставимым с количеством ампликонов, полученных на образцах ДНК, очищенных с помощью ФП-ПАНИ-сорбента (рис. Б, образец «разбавленный лизат» в табл. 1). В табл. 1 также приведены контрольные значения порогового цикла и относительной концентрации ДНК для образцов с известным количеством ДНК ( $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  КОЕ соответственно). Видно, что использование ФП-ПАНИ-сорбента не снижает чувствительность ПЦР-детекции и позволяет определять порядка 10 копий анализируемой ДНК в пробе. Таким образом, ФП-ПАНИ-сорбент обеспечивает эффективное удаление ингибиторов ПЦР и сохранение исходного количества ДНК в исследуемом образце. На основании полученных данных можно предположить, что ФП-ПАНИ-содержащий материал будет эффективен при одностадийном выделении ДНК из клинических образцов, обеспечивая получение очищенного препарата нуклеиновых кислот, пригодного для проведения ПЦР-анализа.

Для подтверждения данного предположения сравнивали количество ДНК, выделенной из клинических

образцов, с помощью ФП-ПАНИ-сорбента и с использованием автоматической системы. Количество исходного материала для автоматической системы в 2 раза превышало количество, взятое для выделения на картриджах. Однако с учетом того, что при автоматическом выделении используется только половина взятого объема, количество исходного материала в обоих случаях сопоставимо. При применении автоматической системы конечный объем раствора ДНК был в 4 раза меньше, а объем, требуемый для проведения ПЦР, в 2.5 раза больше, чем при выделении ДНК на картриджах. Таким образом, количество ДНК для проведения ПЦР в автоматической системе в 10 раз превышало количество ДНК, взятой в ПЦР, после ручного выделения с помощью картриджей.

В табл. 2 приведено количество ПЦР-фрагментов ДНК микобактерий, полученное в ходе анализа клинических образцов обоими способами, а также количество ДНК, определенное в ходе автоматической амплификации с учетом разведений.

Из данных табл. 2 следует, что эффективность автоматического выделения ДНК составила от 0.3 до 7% по сравнению с выделением с использованием ФП-ПАНИ-сорбента.



**Таблица 1.** Значения порогового цикла и рассчитанное количество копий ДНК в модельных образцах после проведения ПЦР в реальном времени

Образец	Пороговый цикл, Ct	Рассчитанное количество копий ДНК
Исходный лизат	40.2	0.4
Исходный лизат	41.03	0.22
Разбавленный лизат	35.23	13.72
1	35.28	13.19
2	34.27	27.10
3	33.77	38.50
4	33.70	40.41
5	35.69	9.84
6	35.28	13.19
7	35.04	15.69
8	34.66	20.48
9	35.08	15.24
Контрольные разведения		
10000000	16.20	9.948E6
100000	21.58	2.193E5
1000	29.14	1026.34
100	32.45	97.94

*Примечание.* 1 – 9 – модельные образцы мокроты, содержащие 600 КОЕ/мл после пропускания через картридж, содержащий ФП-ПАНИ-сорбент.

Таким образом, использование сорбента, модифицированного комбинацией нанослоев ФП и ПАНИ, существенно снижает потери ДНК и обеспечивает значительно большую чувствительность выявления ДНК *M. tuberculosis* по сравнению с системой, основанной на сорбции и десорбции нуклеиновых кислот в ходе выделения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как правило, в методах выделения нуклеиновых кислот из биологических смесей реализуются три различных физико-химических процесса: экстракция, осаждение или адсорбция целевого компонента (нуклеиновой кислоты) на поверхности сорбента с последующей отмывкой от примесей и десорбция. Перечисленные процедуры трудоемки и часто сопровождаются значительными потерями выделяемой нуклеиновой кислоты.

Эффективной альтернативой многостадийным протоколам выделения нуклеиновых кислот представляется одностадийная схема с применением специальных сорбентов. При этом нуклеиновая кислота не удерживается сорбентом, в то время как содержащиеся в исходной смеси примеси (прежде всего, ингибиторы ПЦР) прочно адсорбируются. Благодаря уникальным сорбционным свойствам некоторых синтетических полимеров, таких, как фторполимеры и ПАНИ, удалось разработать ряд композиционных сорбентов, обеспечивающих одностадийное выделение нуклеиновых кислот из сложных биологических смесей, отличающихся высокой селективностью при разделении нуклеиновых кислот и белков. Особый интерес представляет исследование сорбционных свойств сорбента, последовательно модифициро-

**Таблица 2.** Количество ПЦР-фрагментов ДНК *M. tuberculosis complex* после картриджного и автоматического выделения ДНК из клинических образцов

Образец	Количество ДНК, копий/объем		
	Картриджи, 10 мкл	Автоматическое выделение, 25 мкл	Автоматическое выделение, после разбавления
1	4579	3254	325
2	65	Не определено	Не определено
3	5006	3572	357
4	Не определено	Не определено	Не определено
5	733220	23693	2369
6	98	3	< 1
7	12	2	< 1
8	178	32	3

ванного нанослоями ФП и ПАНИ. В таком материале сочетаются высокая химическая стойкость за счет наличия фторполимерного покрытия и высокая сорбционная емкость, определяемая свойствами ПАНИ-покрытия.

В настоящей работе на примере выделения ДНК *M. tuberculosis* из клинических образцов мокроты показано, что сорбент, модифицированный комбинацией нанослоев ФП и ПАНИ, эффективно удаляет ингибиторы ПЦР и обеспечивает сохранение исходного

количества ДНК, присутствующего в образце. Благодаря этому достигается большая чувствительность выявления ДНК *M. tuberculosis complex* по сравнению с системой, основанной на сорбции и десорбции нуклеиновых кислот в ходе выделения. ●

*Работа частично поддержана грантом  
Европейской комиссии DIAGNOSIS  
(договор № LSHB-CT-037212).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vogelstein B., Gillespie D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 615–619.
2. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., van der Noordaa J. // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28. P. 495–503.
3. Park M.E., Chang J.H. // Mater. Sci. Eng. C. Biomimetic and Supramolecular Systems. 2007. V. 27. № 5–8. P. 1232–1235.
4. Cady N.C., Stelick S., Batt C.A. // Biosens. Bioelectron. 2003. V. 19. P. 59–66.
5. Craig J.M., Kraus J., Cremer T. // Hum. Genet. 1997. V. 100. P. 472–476.
6. Kapustin D.V., Saburov V.V., Zavada L.L., Evstratov A.V., Barsamyam G.B., Zubov V.P. // Rus. J. Bioorgan. Chem. 1998. V. 24. P. 770–777.
7. Kapustin D.V., Yagudaeva E.Yu., Zavada L.L., Zhigis L.S., Zubov V.P., Yaroshevskaya E.M., Plobner L., Leiser R.-M., Brem G. // Rus. J. Bioorgan. Chem. 2003. V. 29. P. 281–285.
8. Yagudaeva E.Yu., Muysdinov M.R., Kapustin D.V., Zubov V.P. // Rus. Chem. Bull. Int. Ed. 2007. V. 56. № 6. P. 1166–1173.
9. Kapustin D., Prostyakova A., Bryk Ya., Yagudaeva E., Zubov V. // Nanocomposites and polymers with analytical methods / Ed. Cuppoletti J. Croatia: Intech 2011. P. 83–106.
10. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Ryazantsev D.Yu., Zubov V.P. // Nanomedicine. 2011. V. 6. № 2. P. 241–255.
11. Kapustin D., Prostyakova A., Zubov V. // Zing Conferences. Polymer Chemistry Conference. 12–16 November 2012. Cancun. Mexico. Stow Cum Quy, UK, 2012. P. 42.

УДК 575.22

# Локус *agnostic* дрозофилы: вовлеченность в становление когнитивных нарушений при синдроме Уильямса

Е. А. Никитина<sup>1,2\*</sup>, А. В. Медведева<sup>1,3</sup>, Г. А. Захаров<sup>1,3</sup>, Е. В. Савватеева-Попова<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6<sup>2</sup>Российский государственный педагогический университет, 191186, Санкт-Петербург, наб. реки Мойки, 48<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

\*E-mail: 21074@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2013

После доработки 10.04.2014

**РЕФЕРАТ** Молекулярная основа патологических процессов, влекущих развитие геномных болезней, одинакова у высших беспозвоночных и млекопитающих. Поскольку когнитивные расстройства при такой геномной болезни, как синдром Уильямса, вызываются гемизиготностью по гену *limk1*, то может ли созданная нами на дрозофиле модель этого синдрома с привлечением аллелей дикого типа и мутантов локуса *agnostic*, несущего ген *limk1*, способствовать анализу двух диагностических признаков триады когнитивных нарушений синдрома Уильямса? К ним относятся дефектность зрительно-пространственной ориентации и необычайно высокая степень сосредоточенности на лицах при внутривидовых взаимодействиях с незнакомыми. Подходом к изучению первого симптома может быть анализ локомоторного поведения личинки, при котором реализуется исследование окружающей среды, непременно вовлекающее зрительно-пространственную ориентацию. Подходом к изучению второго симптома может быть анализ самого естественного для взрослых особей дрозофилы контактов самца и самки при реализации полового ритуала, первым этапом которого является ориентация самца по отношению к самке и преследование ее при постоянной фиксации на образе преследуемой. Решению данных вопросов и посвящено данное исследование. Моделирование синдрома Уильямса с привлечением мутантных и спонтанных вариантов локуса *agnostic* позволило выявить влияние изменения структуры гена *limk1* на локомоторные и когнитивные проявления.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дрозофила, локомоторная активность, обучение, память, синдром Уильямса, LIMK1.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИО – индекс обучения; ИУ – индекс ухаживания; УРПУ – условно-рефлекторное подавление ухаживания.

## ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последних 20 лет считалось, что одной из самых привлекательных моделей, позволяющих напрямую связать гены, мозг и поведение, является синдром Уильямса [1, 2]. К возникновению синдрома приводит делеция протяженностью 1500 т.п.н. в районе 7q11.23, специфическая архитектура которого предрасполагает к неравной рекомбинации. В делецию попадает около 20 генов, и их гемизиготность проявляется как нарушение развития, характеризующееся сердечно-сосудистыми проблемами, специфическими, эльфоидными чертами лица и несколькими типичными неврологическими аномалиями и когнитивными особенностями [3]. Гемизиготность по гену LIM-киназы 1 (LIMK1 – ключевой фермент ремоде-

лирования актина) вызывает когнитивные нарушения. Они описываются триадой проявлений: 1) резко выраженный дефект зрительно-пространственного ориентирования; 2) промежуточный, варьирующий в зависимости от сложностей языковой культуры вербально-лингвистический дефект; 3) необычайно высокая пристальность взгляда – прикованность к лицам.

Эксперименты на высших животных имеют крайне высокую стоимость, поэтому для поиска и тестирования лекарственных препаратов, способных корректировать возникающие нарушения, требуются простые животные модели.

Можно ли в этих целях использовать дрозофилу? С одной стороны, функции генов болезней человека

часто устанавливаются по характеру проявления мутаций в гене дрозофилы, когда его последовательность такая же, как и выявленная для гена человека. С другой стороны, у дрозофилы известны все гены, собранные у млекопитающих вместе в одном критическом районе, входящем в делецию при синдроме Уильямса (напомним, что ген *frizzled-9* был впервые описан у дрозофилы). Несмотря на другой способ эволюционной организации генома дрозофилы, при котором эти гены находятся в разных хромосомах, подход к анализу действия конкретного гена в генезе синдрома Уильямса возможен при следующих условиях: 1) должны быть известны мутации данного гена, гемизиготность по которым приводила бы у дрозофилы к проявлению мутантного фенотипа; 2) архитектура района хромосомы, в котором локализован ген дрозофилы, может предрасполагать к возникновению хромосомных перестроек за счет неравной рекомбинации; 3) в районе локализации гена должна быть зарегистрирована повышенная частота рекомбинации, что может приводить к спонтанной генерации делеций или других перестроек. Это должно выражаться в специфичном для района полиморфизме в линиях дикого типа. Всем этим условиям удовлетворяет обнаруженный и охарактеризованный нами локус *agnostic*, несущий ген, кодирующий LIMK1.

Локус *agnostic* был обнаружен в районе 11В X-хромосомы при проведении целенаправленного скрининга температурочувствительных (*ts*) мутаций, индуцированных этилметансульфонатом (ЭМС), которые могли бы нарушать активность ферментов синтеза и распада сАМР [4]. У мух с мутацией *agn<sup>ts3</sup>* наблюдается необычайно высокая активность Са<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимой фосфодиэстеразы 1 [5]. Гетерозиготы по делеции *Df(1)368* (обнажающей этот район) и *Df(1)112* (изолированной нами по признаку *ts*-летальности в сочетании с *agn<sup>ts3</sup>*) также гибнут при развитии при 29°C, т.е. мутантный фенотип проявляется, как и при синдроме Уильямса, в гемизиготном состоянии. Молекулярно-генетические исследования показали, что ген *agnostic* кодирует фермент LIMK1, содержащий повтор из двух LIM-доменов, фланкированный протяженными АТ-богатыми повторяющимися последовательностями (The National Centre for Biotechnology Information, NCBI). В этом районе наблюдается повышенная частота неравной рекомбинации, чем и обусловлен ярко выраженный полиморфизм у линий дикого типа *Canton-S (CS)*, *Berlin* и *Oregon-R (Or-R)* [6–8].

Таким образом, ген *agnostic* в силу своего строения и нуклеотидного окружения может служить генетическим резервом полиморфизма и быть удобной моделью геномных болезней, таких, как синдром Уильямса. Если так, то может ли эта модель спо-

собствовать анализу таких двух диагностических признаков триады когнитивных нарушений при синдроме Уильямса, как дефектность зрительно-пространственной ориентации и необычайно высокая степень сосредоточенности на лицах при внутрипарных взаимодействиях с незнакомыми?

Ответ на первый вопрос мог бы дать анализ локомоторного поведения личинок, при котором одновременно реализуется исследование окружающей среды, непременно вовлекающее зрительно-пространственную ориентацию, и питание, достигаемое при ползании личинки по субстрату. Второй вопрос также можно решить при анализе самого естественного для взрослых особей дрозофилы контакта самца и самки при осуществлении полового ритуала, первым этапом которого является ориентация самца по отношению к самке и преследование ее, сочетающее как двигательную активность, так и постоянную фиксацию на образе преследуемой.

В настоящей работе показаны изменения параметров двигательной активности личинок и резкие нарушения траекторий движений при ориентации в пространстве у самцов *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>*. У имаго этих же линий выявлены сильные дефекты обучения и памяти при условно-рефлекторном подавлении ухаживания за счет резко повышенной ориентации по отношению к партнеру и его преследованию.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Линии дрозофилы

В работе использовали линии, проявляющие полиморфизм в районе локализации локуса *agnostic* (X-хромосома, 11В).

1. Линия дикого типа *Canton-S (CS)*, на генетическом фоне которой поддерживается температурочувствительная (*ts*) мутация по локусу *agnostic* – *agn<sup>ts3</sup>*.

2. Линия дикого типа *Berlin*, выделенная из природной популяции Берлина и имеющая существенные нарушения регуляции гена *limk1*.

3. Линия дикого типа *Oregon-R (Or-R)*. ПЦР-картирование гена *limk1* выявляет отсутствие фрагмента между праймерами, ограничивающими район, куда попадают оба LIM-домена и часть PDZ-домена.

4. *agn<sup>ts3</sup>* – мутант по содержащему ген *limk1* локусу *agnostic*, несущий вставку 1.7 т.п.н., удаленную приблизительно на 1 т.п.н. от 3'-нетранслируемой области гена *limk1* в области локализации А/Т-богатого района.

### Изучение двигательной активности личинок

Локомоторное поведение личинок дрозофилы изучали при помощи оригинальной автоматизированной конструкции, созданной Г.А. Захаровым



и Т.Л. Паялиной (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН) на основе установки для регистрации локомоторного поведения имаго дрозофилы, сконструированной Н.Г. Камышевым и соавт. [9]. Для регистрации локомоторного поведения личинок использовали круглые камеры диаметром 20 мм. Перемещение личинки отслеживали с помощью видеокамеры Logitech QuickCam. Для автоматизированной регистрации поведения использовали оригинальную компьютерную программу, разработанную Г.А. Захаровым и Н.Г. Камышевым. Длительность эксперимента 1 ч, температура в камерах 23–24°C.

Для анализа периодов покоя и движения общую запись разбивали на кванты, равные 1 с. Затем вычисляли скорость движения личинки на данном кванте. Если полученное значение было меньше порогового (0.5 мм/с), то считали, что личинка в течение данного кванта времени находилась в покое, в противном случае – личинка двигалась. Соседние кванты с одинаковым характером движения объединяли, формируя периоды движения и покоя.

Для анализа динамики параметров локомоторной активности общее время записи разделяли на интервалы длиной 300 с. Каждый период покоя или движения считали принадлежащим тому интервалу, на котором он начался. Для каждого интервала также считали частоту побегов (количество инициаций движения за 100 с) и индекс активности (доля времени, проведенного в движении). Анализировали не менее 25 личинок каждой линии. Статистическую значимость различий между экспериментальными группами определяли с помощью дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису с последующим множественным сравнением средних рангов для всех экспериментальных групп. Распределение траекторий сравнивали с использованием парного *t*-критерия для долей. Статистическую значимость всех различий рассчитывали при уровне значимости  $p < 0.05$ .

#### Оценка способности к обучению и сохранению памяти

Для выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ) 5-суточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру из оргстекла (диаметр – 15 мм) с оплодотворенной 5-суточной самкой *Canton-S* и оставляли на 30 мин (тренировка). Обучение и память тестировали сразу (0 мин) и через 3 ч (180 мин) после тренировки, используя новых оплодотворенных самок *Canton-S* в возрасте 5 сут. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения (наивных). Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя время начала отдельных эле-

ментов ухаживания (ориентация, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время исполнения элементов, не связанных с ухаживанием (побежка, прининг, покой). Регистрацию начинали через 45 с после помещения мухи в камеру. Для расшифровки и анализа данных использовали специально разработанные компьютерные программы (автор программ – Н.Г. Камышев). Вычисляли индекс ухаживания (ИУ) для каждого самца, т.е. время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения. Для количественной оценки результатов обучения вычисляли индекс обучения (ИО) по следующей формуле:

$$\begin{aligned} \text{ИО} &= [\text{ИУ}_H - \text{ИУ}_T] / \text{ИУ}_H \times 100\% = \\ &= (1 - \text{ИУ}_T / \text{ИУ}_H) \times 100\%, \end{aligned}$$

где ИУ<sub>Н</sub> и ИУ<sub>Т</sub> – средние индексы ухаживания в независимых выборках самцов, не имеющих опыта полового поведения, и самцов, прошедших тренировку. Статистическую обработку результатов проводили при помощи рандомизационного анализа [10–12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Суммарные отличия параметров локомоторной активности

Наиболее общим параметром, отражающим локомоторную активность личинок, является индекс активности, представленный на рис. 1.

Линия *CS* имеет более высокий индекс активности (0.34), чем все другие линии. Это заметно по медиане и обоим квартилям. Статистически значимых различий между линиями *agn<sup>ts3</sup>*, *Berlin* и *Or-R* по этому параметру не выявлено.

Изменения индекса активности могут происходить за счет изменения частоты совершения побегов и их длительности. Межлинейные различия по частоте побегов полностью аналогичны различиям в индексе активности. Это значит, что изменение индекса активности в основном можно объяснить снижением частоты побегов, однако могут существовать и различия в длительности побежки.

По этому параметру линия *CS* также отличается от всех остальных линий. Линия *CS* характеризуется большим средним временем побежки. Кроме того, выявлено отличие линии *Berlin* от *Or-R* и *agn<sup>ts3</sup>*, которого не наблюдали при рассмотрении индекса активности.

Следующий параметр, независимый от рассмотренных ранее, – скорость побежки. Наибольшее значение скорости побежки также зафиксировано у личинок *CS*. Далее следует линия *agn<sup>ts3</sup>*, затем

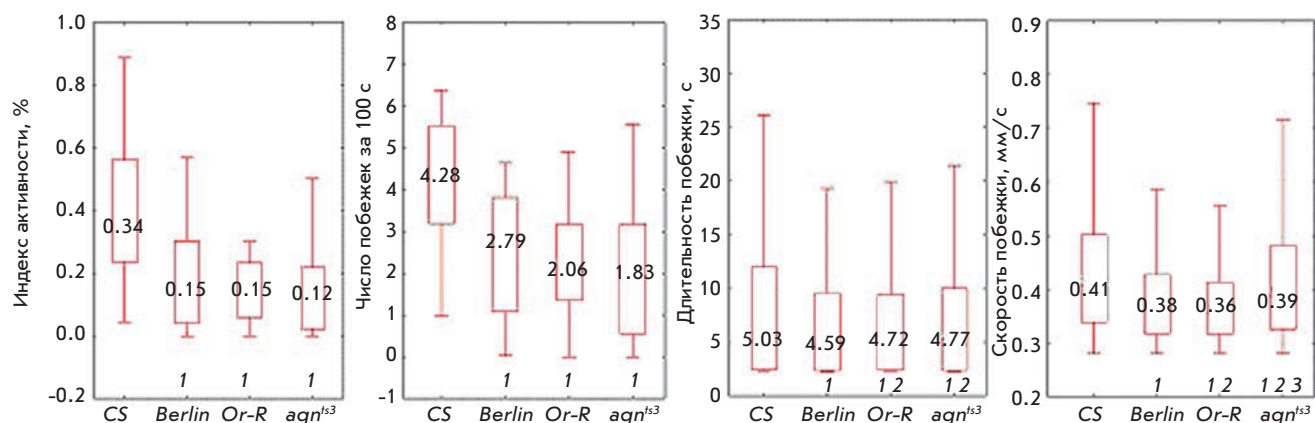


Рис. 1. Суммарные параметры локомоторной активности личинок. 1 – отличие от *CS*; 2 – отличие от линии *Berlin*; 3 – отличие *agn<sup>ts3</sup>* от *Or-R*. Дисперсионный анализ по Краскелу–Уоллису с последующим множественным сравнением средних рангов для всех экспериментальных групп,  $p < 0.05$

*Berlin* и *Or-R*. Такое же распределение имеют оба квартиля.

### Временная динамика параметров локомоторной активности

Временная зависимость параметров локомоторной активности представлена на рис. 2. Личинки *CS* активно движутся в первый момент после их помещения в экспериментальные камеры. Медиана индекса активности составляет примерно 0.55. В дальнейшем активность плавно снижается. Начиная с 40-й мин эксперимента медиана индекса активности составляет 0.3 и далее не меняется.

Личинки линий *Berlin* и *agn<sup>ts3</sup>* в нормальных условиях характеризуются существенно более низким уровнем подвижности, чем *CS*. Медиана индекса активности составляет 0.1–0.15. Различия значимы вплоть до 25-й мин эксперимента и на 35-й мин. Затем различия исчезают вследствие падения активности личинок *CS*. Мутанты *agn<sup>ts3</sup>* имеют еще более низкую активность, отличия от *CS* статистически значимы в течение всего эксперимента. Линия *Or-R* изначально имеет более низкую подвижность, чем *CS*, хотя при этом она выше, чем у *Berlin* и *agn<sup>ts3</sup>*. В ходе эксперимента активность личинок *Or-R* быстро падает, и начиная с 30-й мин значимо отличается от активности личинок *CS*.

Теперь рассмотрим подробно параметры, вносящие вклад в изменение индекса активности. Динамика частоты побегов сходна с динамикой индекса активности. Линия *CS* характеризуется достаточно большой частотой побегов (медиана примерно  $5.5 \times 10^{-2}$  Гц), которая плавно снижается и достигает приблизительно  $3.6 \times 10^{-2}$  Гц к концу эксперимента.

Линия *Or-R* изначально имеет такую же частоту побегов, как и *CS* (на 5-й мин эксперимента она статистически значимо выше, чем у *Berlin* и *agn<sup>ts3</sup>*). Частота побегов быстро падает и к 30-й мин эксперимента становится ниже, чем у *CS*. Линия *agn<sup>ts3</sup>* имеет более низкую частоту побегов, чем *CS* в течение всего эксперимента. Линия *Berlin* изначально имеет более низкую частоту побегов, чем *CS*, однако после 25-й мин эти различия исчезают.

Таким образом, наибольшими по сравнению с *CS* дефектами характеризуется линия *agn<sup>ts3</sup>*. Заметно также различие в динамике активности линий *Berlin* и *Or-R*. Более низкая подвижность *Or-R* связана с быстрым падением активности в ходе эксперимента. Линия *Berlin* имеет изначально более низкую активность, но она падает медленнее, чем у *CS*, поэтому во второй половине эксперимента статистически значимые различия исчезают.

Весьма интересной оказалась динамика продолжительности побегов. Мухи линии *CS* в течение всего эксперимента (за исключением первых 5 мин) имеют практически постоянное время побегов, равное 5 с. Линия *Berlin* также сохраняет постоянную длительность побегов, равную 4.5 с (различия статистически значимы до 55-й мин). Линия *Or-R* изначально имеет практически такую же длительность побегов, как и *CS*, и значимо большую, чем у *Berlin*. В интервале с 20-й по 25-ю мин длительность побегов резко падает и остается стабильной на уровне 2.5 с. Линия *agn<sup>ts3</sup>* до 55-й мин имеет такую же длительность побегов, как и *CS*. Различия наблюдаются только на 60-й мин. В ряду точек (5–15, 25, 35 мин) длительность побегов *agn<sup>ts3</sup>* статистически значимо выше, чем у *Berlin*. Значимых отличий от линии *Or-R* не обнаружено.

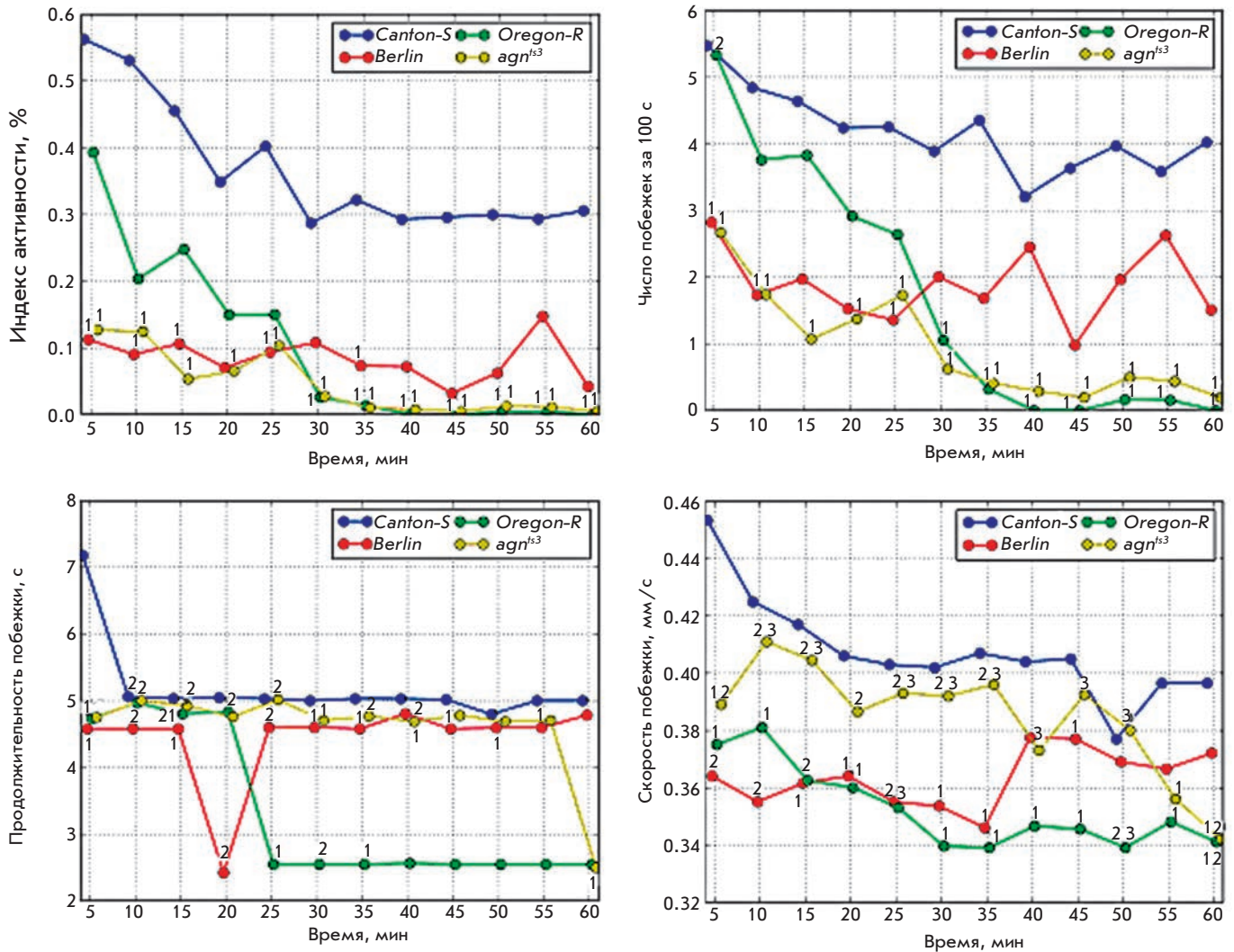


Рис. 2. Временная динамика индекса активности и скорости побежки личинок. Точки показывают медианы распределений. 1 – отличие от *CS*; 2 – отличие от линии *Berlin*; 3 – отличие *agn<sup>ts3</sup>* от *Or-R*. Дисперсионный анализ по Краскелу–Уоллису с последующим множественным сравнением средних рангов для всех экспериментальных групп,  $p < 0.05$

В начале эксперимента личинки линии *CS* имеют самую высокую скорость движения (порядка 0.45 мм/с), которая достаточно быстро снижается и достигает 0.4 мм/с к концу. Линия *Berlin* изначально имеет более низкую скорость движения, чем *CS* (порядка 0.36 мм/с). Но при этом скорость движения не падает, а, напротив, слегка возрастает к концу эксперимента. Поэтому, начиная с 40-й мин эксперимента, различия между *Berlin* и *CS* исчезают. Линия *Or-R* в течение всего эксперимента имеет более низкую скорость движения, чем *CS* (0.38 в начале и около 0.34 мм/с к концу). На 50-й и 60-й мин зафиксированы статистически значимые отличия от линии *Berlin*. При этом общая

скорость побежки у линий *Berlin* и *Or-R* отличается статистически значимо в течение всего эксперимента. Линия *agn<sup>ts3</sup>* имеет высокую скорость побежки. С 10-й по 50-ю мин подобные отличия от линии *CS* отсутствуют. В целом ряду точек наблюдаются отличия от линий *Berlin* (55–15, 25–35, 60) и *Or-R* (10–50).

Таким образом, изучение временной динамики параметров локомоторной активности показало, что индекс активности личинок и частота побежек падают в ряду *CS* → *Berlin* → *Or-R* → *agn<sup>ts3</sup>*. Причем у *Berlin* низкие значения индекса активности сохраняются в течение всего эксперимента, в то время как *Or-R* характеризуется очень быстрым падением изначально-



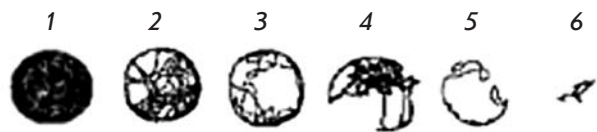


Рис. 3. Образцы классов треков. 1 – полностью заполняющие экспериментальную камеру – все доступное для передвижения пространство; 2 – с незначительными дефектами заполнения – передвижения в пространстве; 3 – со значительными дефектами передвижения в пространстве; 4 – не полностью очерченная окружность движений в пространстве; 5 – не имеющие полностью очерченной окружности и со значительными дефектами передвижения в пространстве; 6 – с ярко выраженными дефектами передвижения в пространстве

но высокого индекса активности. По длительности побегки наибольшее отличие демонстрирует линия *Or-R*, в то время как *agn<sup>ts3</sup>* ближе к дикому типу. Повидимому, именно это перекрестное изменение длительности и частоты побегки приводит к отсутствию различий в индексе активности между линиями *Berlin*, *Or-R* и *agn<sup>ts3</sup>*. Скорость побегки падает в ряду *CS* → *agn<sup>ts3</sup>* → *Berlin* → *Or-R*.

#### Распределение по форме траекторий движения (треков)

Характеристика способности к зрительно-пространственному ориентированию, т.е. того, как животное способно ориентироваться в окружающей среде при реализации исследовательской активности и прекращает ее с течением времени, может быть получена при анализе треков (траекторий движения). Все проанализированные треки были разделены на шесть классов. Характерный вид треков каждого класса представлен на рис. 3.

Распределение треков личинок по классам выявляет существенные межлинейные различия. Наиболее заметно снижение количества треков класса 1 примерно в 3 раза у *Berlin*, *Or-R* и *agn<sup>ts3</sup>* по сравнению с *CS* (рис. 4). У линии *Berlin* статистически значимо возрастает количество треков классов 3 и 6.

У линии *Or-R* также достоверно увеличивается только количество треков класса 4. У линии *agn<sup>ts3</sup>* наблюдается уменьшение треков класса 2 и заметное возрастание количества треков класса 3.

Таким образом, каждая линия имеет свойственные ей дефекты локомоторного поведения. Для линии *Berlin* характерно снижение индекса активности и нарушение распределения треков. У линии *Or-R* наблюдается дефект спонтанной активности, что выражается в быстром падении индекса актив-

ности с течением времени. Мутанту *agn<sup>ts3</sup>* свойственно падение индекса активности при сохранении скорости движения. Все эти нарушения могут свидетельствовать о существенных дефектах зрительно-пространственного ориентирования, проявляющихся у линий *Berlin*, *Or-R* и *agn<sup>ts3</sup>*.

#### Изучение двигательной активности имаго и ее вклада в когнитивные способности

Регистрация поведения при условно-рефлекторном подавлении ухаживания позволяет вычислять индекс обучения (ИО) не только на основе учета всех элементов неполового (двигательная активность, принижение, отдых) и полового поведения (ориентация/преследование, вибрация крылом – брачная песня, тэппинг, ликинг, попытка копуляции), но и анализировать записанные этограммы поведения отдельно для каждого параметра. Рис. 5 иллюстрирует, что, как показано ранее, не только у мутантов *agn<sup>ts3</sup>* [8], но и у самцов линии *Oregon-R* [13] драматически нарушены процессы обучения и формирования среднесрочной 3-часовой памяти.

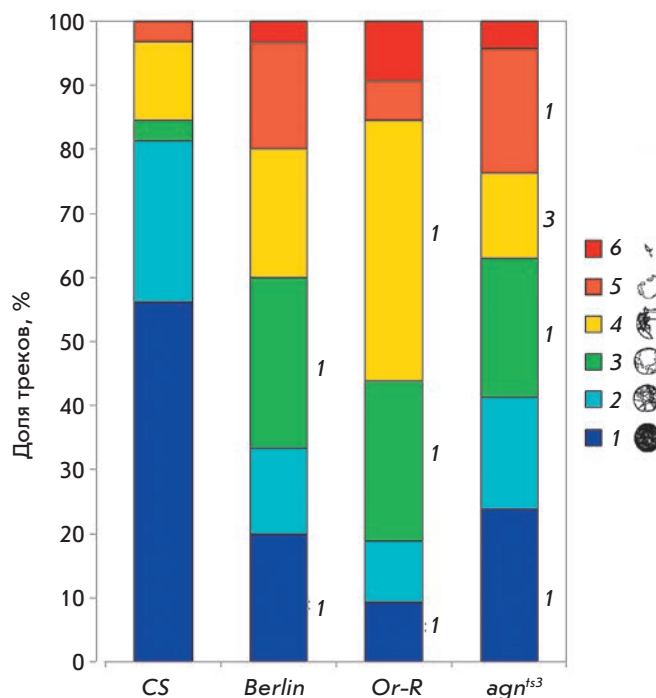


Рис. 4. Сравнение распределений треков по классам. 1 – отличие от *CS*; 3 – отличие *agn<sup>ts3</sup>* от *Or-R*. Парный *t*-критерий для долей, *p* < 0.05



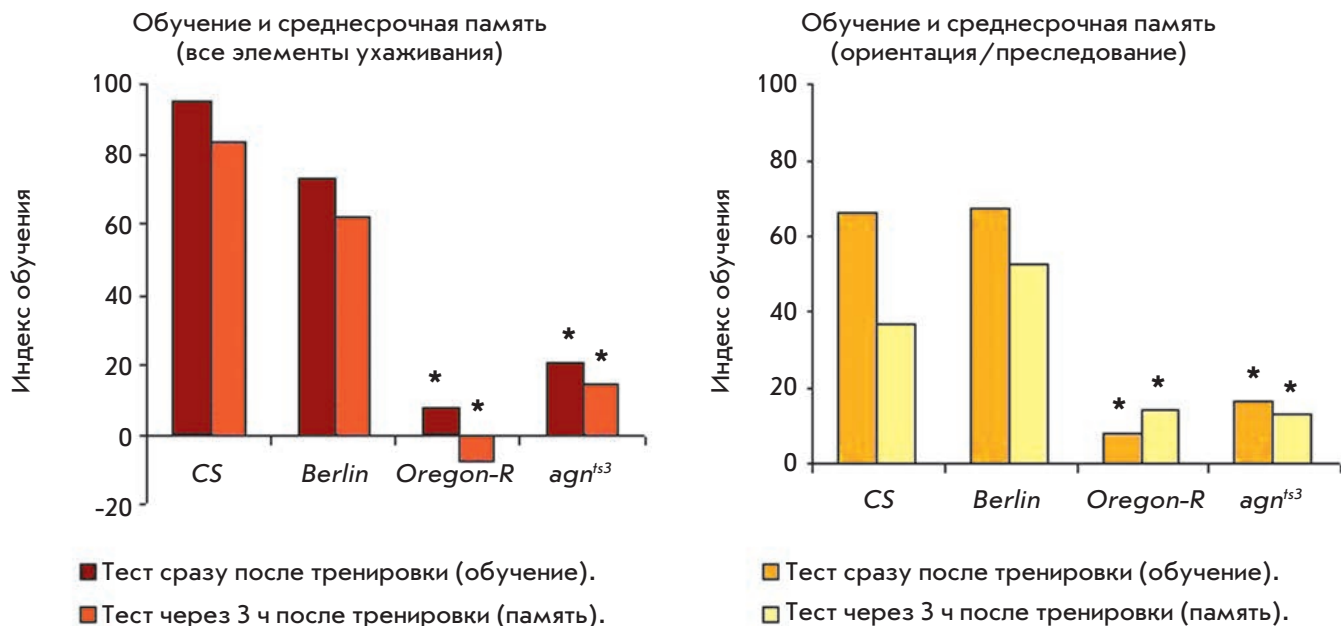


Рис. 5. Дефекты ориентации и преследования при нарушениях обучения и памяти. \* – отличия от CS,  $p < 0.05$ , двусторонний тест рандомизации

Если вычислить индекс обучения с учетом какого-либо одного элемента полового поведения, то можно определить, за счет чего возникают дефекты обучения и памяти. Оказалось, что основной вклад в общее подавление ухаживания вносит подавление ориентации/преследования. По данному параметру самцы *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>* оказались неспособными к обучению – сразу после тренировки выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания не происходило. Через 3 ч после тренировки индекс обучения сохранялся на том же уровне и также статистически значимо отличался от ИО у *Canton-S*. Из рис. 5 видно, что дефекты обучения и памяти у линий *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>* объясняются нарушениями ориентации/преследования.

Рассмотрим это подробнее, уделяя внимание такому показателю локомоторного поведения имаго при внутривидовом взаимодействии, как двигательная активность самцов, не зависящая от полового поведения. Как следует из рис. 6, в контроле, у наивных самцов линий *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>*, двигательная активность статистически значимо выше, чем у линии дикого типа *CS*; сразу после тренировки и через 3 ч после нее уровни активности были сопоставимы с уровнями у самцов *CS*.

Что касается связанной с половой деятельностью активности – ориентации/преследования (внутрипарное взаимодействие самца и самки), то она в 2 раза меньше у самцов *Berlin* и *Oregon-R*, но в 2 раза выше

уровня дикого типа у самцов *agn<sup>ts3</sup>*. Именно эта форма активности должна резко уменьшаться после тренировки, когда наблюдается условно-рефлекторное подавление ухаживания, проявляющееся в резком уменьшении доли связанной с половой деятельностью активности и резком же возрастании доли обычной двигательной активности. Это и наблюдается сразу после тренировки у самцов *CS*, *Berlin* и *Oregon-R*, но не у мутантов *agn<sup>ts3</sup>*, у которых активность, связанная с половой деятельностью, четырехкратно превышает таковую у *CS*, что свидетельствует о дефектности обучения. Через 3 ч после тренировки, когда показатели ориентации/преследования могут слегка падать, как у *CS*, у *agn<sup>ts3</sup>* ориентация/преследование превышает уровень линии *CS* в 2 раза. При этом вклад данного компонента в традиционно рассчитываемые индексы ухаживания составляет у линии дикого типа *CS* 35% (обучение) и 42% (память), у линии дикого типа *Berlin* – 33% (обучение) и 34% (память), у линии дикого типа *Oregon-R* – 50% (обучение) и 40% (память), а у мутантов *agn<sup>ts3</sup>* – 85% (обучение) и 83% (память).

Таким образом, каждая линия проявляет свойственное ей соотношение двух форм активности. Повидимому, это дает хорошую возможность для тестирования диагностического признака из триады когнитивных отклонений при синдроме Уильямса – пристальной фиксации на лицах, в данном случае на объекте ухаживания. Кроме того, такой способ

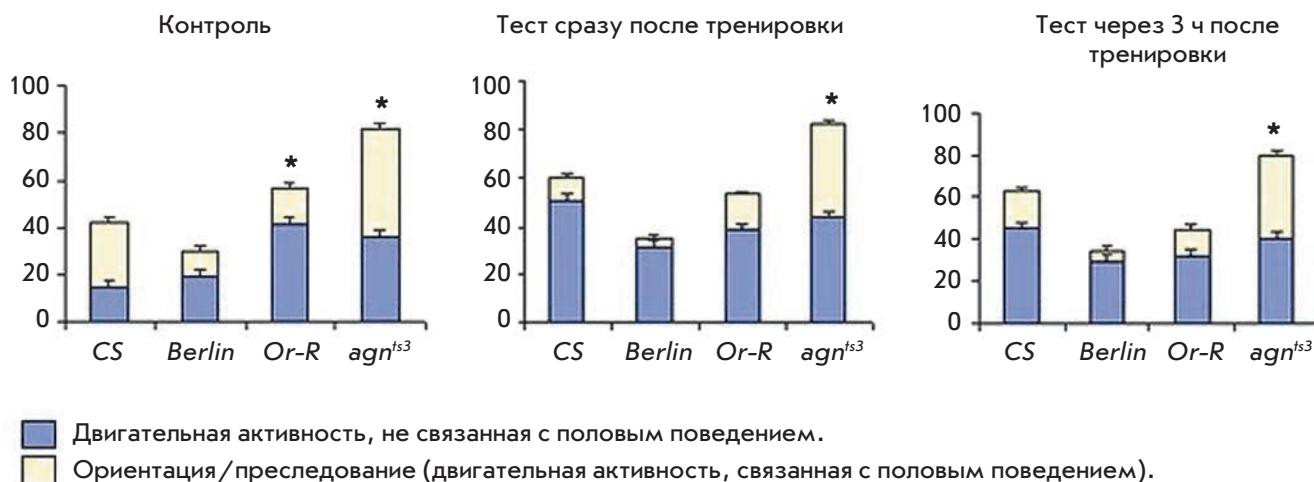


Рис. 6. Доли двигательной активности, связанные и не связанные с половым поведением сразу и через 3 ч после тренировок. \* – отличие от CS,  $\alpha \leq 0.05$ , односторонний тест рандомизации

анализа позволяет учитывать и компонент обучения (индивидуального опыта). Напомним, что при синдроме Уильямса повышенная гиперсоциализация – фиксация взгляда на лицах незнакомцев – не служит установлению прочных контактов с ровесниками, товарищами по школе, обретению друзей. Иными словами, происходит постоянное обращение к одному и тому же стимулу – лицу, без правильной интерпретации ответных реакций.

Полученные нами результаты позволяют утверждать, что у самцов *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>* выявлены когнитивные дефекты, обусловленные недостаточным подавлением ориентации/преследования (взаимодействия с партнером). Дефекты ориентации проявляются уже на стадии личинки, у личинок самцов при исследовании окружающей среды наблюдаются резкие нарушения траекторий движения в пространстве и временной динамики индекса активности и частоты побегов личинок.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Линии дрозофилы, несущие разные варианты локуса *agnostic* с изменениями в регуляторных и структурных районах гена, кодирующего LIM-киназу 1 (LIMK1), использованы для моделирования делеционного синдрома Уильямса человека, при котором, как считается, гемизиготность по гену *limk1* приводит к нарушению моторных функций, когнитивным дефектам зрительно-пространственного ориентирования и повышенной фиксации взгляда на партнере [2].

Моделирование этого синдрома с привлечением мутантных и спонтанных вариантов локуса *agnostic* позволило выявить влияние изменения структуры гена *limk1* на локомоторные и когнитивные проявле-

ния. Среди них изменения параметров двигательной активности личинок и резкие нарушения траекторий движений при ориентации в пространстве у самцов *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>*. У имаго этих же линий наблюдаются сильные дефекты обучения и памяти при условно-рефлекторном подавлении ухаживания за счет резко повышенной ориентации по отношению к партнеру и его преследованию.

Основываясь на результатах проведенного нами секвенирования гена *limk1* линий *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R*, *agn<sup>ts3</sup>* (международная база генетических данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>, номера Dlimk1\_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-CantonS JX987486 Dlimk1\_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-agnosticts3 JX987487; Dlimk1\_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-Oregon-R JX987488; Dlimk1\_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-Berlin JX987489; Dlimk1\_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-CantonS JX987486; Dlimk1\_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-agnosticts3 JX987487; Dlimk1\_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-Oregon-R JX987488; Dlimk1\_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-Berlin JX987489), можно предполагать, что нарушение LIM- и PDZ-доменов у мух линии *Oregon-R* сопровождается изменениями локомоторного поведения и резкими когнитивными нарушениями. Также изменения в LIM- и PDZ-доменах LIMK1 снижают способность не только к зрительно-пространственному ориентированию, но и к обучению. Инсерция S-транспозона в 3'-нетранслируемую область гена *limk1* у мутанта *agn<sup>ts3</sup>* также приводит к весьма любопытным эффектам. У мутанта *agn<sup>ts3</sup>* выявлены дефекты в способности к ориентированию и значительные нарушения

в когнитивной сфере, что сопровождается сверхэкспрессией LIMK1 [8, 14].

Следует отметить, что результаты нашей работы создают предпосылки для разработки метода экспресс-оценки действия различных фармакологических агентов на локомоторные и когнитивные способности дрозофилы. Предложенные методики регистрации поведения личинок и имаго дрозофилы можно использовать для поиска лекарственных препаратов, корректирующих локомоторные и когнитивные нарушения. Большая скорость и сравнительно невысокая цена исследований на дрозофиле делают ее практически идеальным объектом для предварительного экспериментального тестирования тера-

певтических средств. Препараты, прошедшие отбор на такой системе, можно переводить на следующий этап тестирования с использованием более близких к человеку позвоночных животных.

Выявленная связь мутационного повреждения гена *agnostic* и нарушений в локомоторной и когнитивной сфере позволяет использовать данную модель для изучения геномных заболеваний и, в частности, синдрома Уильямса. ●

Работа поддержана РФФИ  
(грант № 12-04-01737-а), программами  
Президиума РАН (№ 7 и 30).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bellugi U., Adolphs R., Cassady C., Chiles M. // *Neuroreport*. 1999. V. 10. № 8. P. 1653–1657.
- Järvinen-Pasley A., Bellugi U., Reilly J., Mills D.L., Galaburda A., Reiss A.L., Korenberg J.R. // *Dev. Psychopathol.* 2008. V. 20. № 1. P. 1–35.
- Pober B.R., Johnson M., Urban Z. // *J. Clin. Invest.* 2008. V. 118. № 5. P. 1606–1615.
- Савватеева Е.В., Камышев Н.Г., Розенблум С.Р. // *Докл. АН СССР*. 1978. Т. 240. С. 1443–1445.
- Savvateeva E.V., Kamyshev N.G. // *Pharmacol. Biochem. Behavior*. 1981. V. 14. P. 603–611.
- Савватеева-Попова Е.В., Переслени А.И., Шарагина Л.М., Токмачева Е.В., Медведева А.В., Камышев Н.Г., Попов А.В., Озерский П.В., Баричева Е.М., Карагодин Д. и др. // *Журн. эвол. биохим. физиол.* 2002. Т. 38. № 6. С. 557–577.
- Савватеева-Попова Е.В., Переслени А.И., Шарагина Л.М., Медведева А.В., Корочкина С.Е., Григорьева И.В., Дюжикова Н.А., Попов А.В., Баричева Е.М., Карагодин Д. и др. // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 6. С. 749–769.
- Медведева А.В., Молотков Д.А., Никитина Е.А., Попов А.А., Карагодин Д.А., Баричева Е.М., Савватеева-Попова Е.В. // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 6. С. 669–681.
- Брагина Ю.В., Молотова Н.Г., Камышева Е.А., Соболева С.А., Камышев Н.Г. // *Информ. вестник ВОГиС*. 2007. Т. 11. № 2. С. 436–444.
- Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V. // *Learn. Mem.* 1999. V. 6. № 1. P. 1–20.
- Камышев Н.Г., Илиади К.Г., Брагина Ю.В., Савватеева-Попова Е.В., Токмачева Е.В., Преа Т. // *Физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 1999. Т. 85. № 1. С. 84–92.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York: Freeman W.H., 1995. 887 p.
- Каминская А.Н., Никитина Е.А., Паялина Т.Л., Молотков Д.А., Захаров Г.А., Попов А.В., Савватеева-Попова Е.В. // *Экологическая генетика*. 2011. Т. 9. № 4. С. 3–14.
- Medvedeva A.V., Zhuravlev A.V., Savvateeva-Popova E.V. // *Horizons in Neuroscience Research*. 2010. V. 1. Ch. 4. P. 161–193.

УДК 576.524+576.532+576.535

# Клеточные модели для исследования роли экстрацеллюлярного домена муцина MUC1 человека в метастазировании

М. С. Сыркина<sup>1,4\*</sup>, М. А. Рубцов<sup>1</sup>, Д. М. Поташникова<sup>2</sup>, Ю. Д. Кондратенко<sup>1</sup>,  
А. А. Докрунова<sup>3</sup>, В. П. Вейко<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и гистологии, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>4</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

\*E-mail: krimsy@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.12.2013

После доработки 20.03.2014

**РЕФЕРАТ** На основе экспрессионного вектора рEGFP-N3 получены генетические конструкции, кодирующие различные комбинации функциональных фрагментов муцина MUC1 человека, а также маркеры для идентификации синтезируемых химерных белков (FLAG-эпитоп, располагающийся в N-концевой области синтезируемых белков, и EGFP, имеющий C-концевую локализацию). Этими конструкциями трансфицировали клетки линии HT-29. Стабильно трансфицированные клетки были охарактеризованы с использованием проточного цитофлуориметра. Высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков на фоне низкого уровня эндогенного муцина MUC1 в полученных клетках был подтвержден методом ПЦР в реальном времени. При помощи флуоресцентной микроскопии была показана мембранная локализация химерных белков. Полученные клетки могут служить моделью MUC1-экспрессирующей формы рака, а также использоваться для исследования роли различных функциональных фрагментов муцина MUC1 в метастазировании.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** клеточные модели, метастазирование, муцин, MUC1, HT-29, онкологические заболевания.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БСА – бычий сывороточный альбумин; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; ДФСБ – фосфатно-солевой буфер в модификации Дульбекко; ДЭПК – диэтилпирикарбонат; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

## ВВЕДЕНИЕ

Метастазирование – процесс, характеризующийся повышенной способностью клеток к инвазии и трансэндотелиальной миграции, является одним из ключевых в развитии онкологических заболеваний. Появление у опухолевых клеток способности к метастазированию, как правило, ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [1]. Молекулярные механизмы процессов, приводящих к изменению метастатического потенциала клеток, активно исследуются на протяжении нескольких десятилетий. Установлено, что в данном процессе принимают участие молекулы, взаимодействующие с внеклеточным матриксом [2, 3] или с молекулами клеточ-

ной адгезии [4, 5]. Одна из таких молекул – муцин MUC1 человека. Экспериментальные данные, указывающие на то, что повышение экспрессии MUC1 коррелирует со снижением способности клеток в культуре к агрегации [6], послужили основанием для предположения об участии данного гликопротеида в увеличении метастатического потенциала опухолевых клеток.

Мембранный гликопротеид MUC1 в норме располагается на апикальной поверхности эпителиальных клеток, выстилающих дыхательные пути и протоки желез, и выполняет функцию их увлажнения и лубрикации. При злокачественной трансформации клеток экспрессия гена MUC1 [7–9] увеличивается,



изменяются клеточная локализация [10, 11] и характер гликозилирования муцина MUC1 [12].

В структуре муцина MUC1 можно выделить несколько функциональных доменов – экстрацеллюлярный, трансмембранный и цитоплазматический. Накопленные к настоящему времени данные, касающиеся влияния различных доменов MUC1 на метастатический потенциал опухолевых клеток, весьма противоречивы [13–15]. Достаточно однозначно установлена лишь роль цитоплазматического домена – идентифицированы сигнальные пути, в которых принимает участие данный фрагмент, и внутриклеточные молекулы, с которыми он взаимодействует [16–18]. Однако функциональная роль экстрацеллюлярного домена MUC1 в данном процессе выяснена не до конца, хотя известно, что изменения, происходящие с молекулой муцина при злокачественной трансформации клетки, затрагивают в основном его экстрацеллюлярную область. Изменение характера гликозилирования внеклеточной части муцина MUC1 в опухолевых клетках приводит к формированию опухоль-специфичных антигенных эпитопов. Предполагается, что характер гликозилирования муцина может существенно влиять на инвазивные характеристики опухолевых клеток. Так, например, было показано, что углеводные компоненты опухоль-ассоциированного (но не «нормального») муцина MUC1 способны связываться с селектинами, продуцируемыми клетками активированного эндотелия [19]. Селектины, в свою очередь, опосредуют взаимодействие с рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, что, по всей видимости, способствует прикреплению метастазирующей клетки к стенке сосуда и ее последующей инвазии. Более того, для метастазирующих клеток характерно наличие определенных гликозидных эпитопов [20, 21]. В случае MUC1 были идентифицированы гликозидные эпитопы *syalil Lewis<sup>a</sup>* (*sLe<sup>a</sup>*) и *syalil Lewis<sup>x</sup>* (*sLe<sup>x</sup>*), присутствие которых ассоциировано со способностью клеток к метастазированию. В частности, показано, что во время неопластической трансформации клеток кишечника содержание *sLe<sup>a</sup>* постепенно увеличивается [22]. Повышенные количества димерных форм *sLe<sup>x</sup>* обнаружены также в субпопуляциях клеток аденокарциномы легкого, обладающих высокой способностью формировать колонии в легких бестимусных мышей [23]. Приведенные данные косвенно указывают на участие экстрацеллюлярного домена муцина MUC1 в повышении метастатического потенциала клеток злокачественных новообразований млекопитающих.

Тем не менее изучение влияния экстрацеллюлярного домена MUC1 на метастазирование опухолевых клеток невозможно без создания адекватных

клеточных моделей. Клеточные модели агрессивной формы MUC1-экспрессирующего рака могли бы использоваться для тестирования как противоопухолевых препаратов, так и диагностических средств, направленных на распознавание экстрацеллюлярной области муцина MUC1. Поскольку экспрессия муцина MUC1 характерна для клеток большинства эпителиальных опухолей, разработка таких агентов позволит охватить широкий спектр онкологических заболеваний.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

В работе использовали соли производства компании Merck (Германия), а также отечественного производства категории «ос.ч.»; компоненты для получения микробиологических сред (Difco, США); агарозу, ферменты и наборы для проведения ПЦР, ОТ-ПЦР, ПЦР в реальном времени, экстракции фрагментов ДНК из агарозного геля и выделения плазмидной ДНК, а также ДНК- и РНК-маркеры (Thermo Scientific, США), TRIzol (Sigma, США), ДЭПК (Sigma, США).

Для культивирования клеточных линий использовали модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), раствор Версена, раствор трипсина («ПанЭко», Россия), фетальную сыворотку теленка (Hyclone, США), антибиотики генетицин (G418), пенициллин и стрептомицин (Sigma-Aldrich, США).

### Бактериальные штаммы и клеточные культуры

Штамм JM110 *Escherichia coli* (e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)) был получен из музея ФГУП ГосНИИ генетика.

В работе были использованы культуры клеток рака молочной железы (MCF-7), рака шейки матки (HeLa) и колоректальной аденокарциномы (HT-29) человека.

### Синтетические олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды, использованные в работе, синтезированы ООО «ДНК-Синтез»; их нуклеотидные последовательности представлены в *табл. 1*.

### Выделение РНК из культуры клеток

Промытые раствором ДФСБ клетки осаждали центрифугированием (4 мин, 1000 об/мин) и ресуспендировали в 1 мл реактива TRIzol. Затем добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали, инкубировали в течение 2–3 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали (15 мин, 13000 об/мин, +4 °C) и отбирали верхнюю водную фазу в чистую пробирку. Добавляли равный объем изопропанола,

инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и осаждали нуклеиновые кислоты центрифугированием (10 мин, 13000 об/мин, +4 °С). Осадок промывали 75% этанолом, высушивали и растворяли в воде, содержащей 0.1% ДЭПК. ДНК удаляли при помощи ДНКазы I, следуя рекомендациям фирмы-изготовителя.

### Синтез кДНК

кДНК синтезировали методом обратной транскрипции с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США), следуя рекомендациям изготовителя.

Для наработки кДНК с целью получения фрагментов, кодирующих функциональные фрагменты муцина MUC1, использовали РНК, выделенную из клеток линии MCF-7, и специфические праймеры: USTR\_R – для кДНК(*ustr*) и CT\_R – для кДНК(*tmct*).

Для наработки кДНК использовали РНК, выделенную из клеток линии HeLa и HT-29. кДНК(GAPDH) получали с использованием олигонуклеотида GAPDH\_R. кДНК(MUC1) получали с использованием олигонуклеотида TM\_R, кДНК(*rMUC1*) – с использованием олигонуклеотида FLAG\_R.

### Получение фрагментов ДНК, кодирующих функциональные фрагменты муцина MUC1

Олигонуклеотиды для получения фрагментов гена муцина выбирали с учетом анализа нуклеотидной последовательности кДНК муцина MUC1 человека [24].

Фрагмент *ustr* получали при помощи ПЦР с кДНК(*ustr*) с использованием праймеров USTR\_F и USTR\_R; фрагмент *tmct* получали при помощи ПЦР с кДНК(*tmct*) с использованием праймеров TM\_F и CT\_R; фрагмент *tm* получали при помощи ПЦР с кДНК(*tmct*) с использованием праймеров TM\_F(2) и TM\_R. Продукты ПЦР разделяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле и очищали из агарозного геля с использованием набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США). Полученные фрагменты клонировали в составе векторов pUC18 – *ustr* по сайтам XhoI и HindIII, *tm* – по сайтам HindIII и BamHI и *tmct* – по сайту BamHI. В результате были получены плазмиды: pUC18-USTR, pUC18-TM и pUC18-TMCT. Соответствие нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов ожидаемым подтверждали секвенированием.

Фрагмент *tr21* получен по методике, разработанной для получения фрагментов, содержащих различное число tandemных повторов из области VNTR гена MUC1 человека [25], и клонирован в векторе pUC18-TR21 (по сайтам HindIII и BamHI).

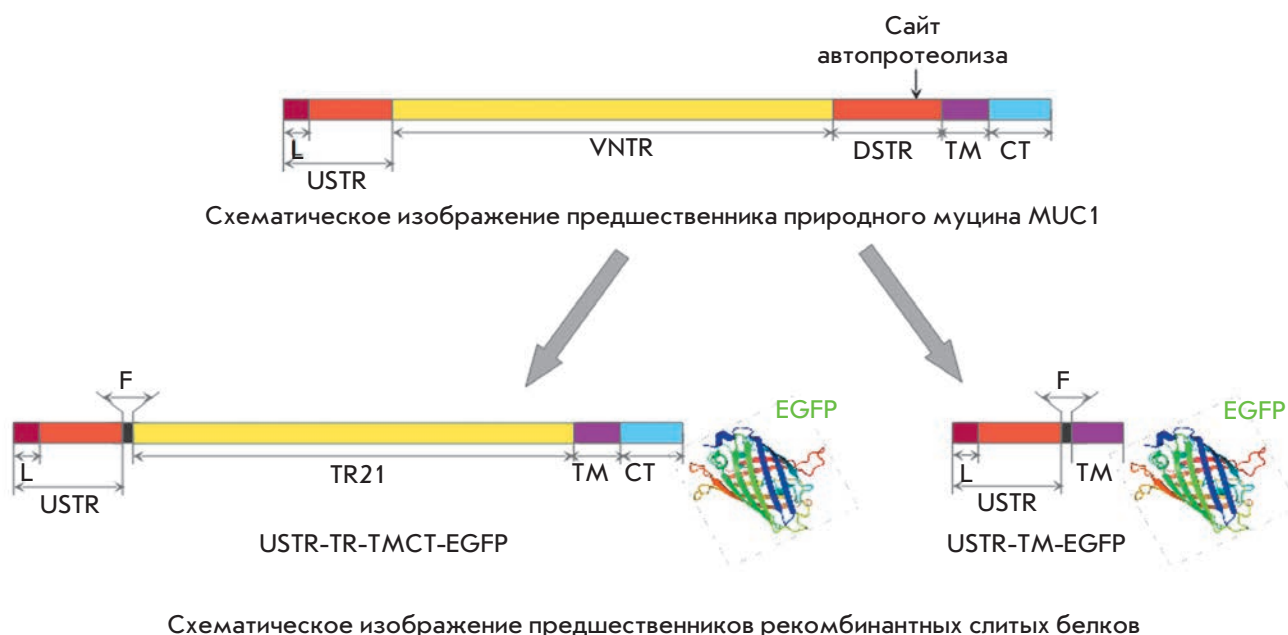
### Создание экспрессионных конструкций, содержащих различные фрагменты гена муцина MUC1

Сборку конструкций осуществляли на основе вектора pEGFP-N3 (Clontech, США). Фрагмент *f* получен путем отжига олигонуклеотидов FLAG\_F и FLAG\_R.

Вектор pUSTR-TR-TMCT-EGFP получен в результате последовательного клонирования фрагментов *ustr* (по сайтам XhoI и HindIII), *tr21* (по сайтам

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность 5'→3'
FLAG_F	AGCTTGACTACAAGGACGATGACGATAAGA
FLAG_R	AGCTTCTTATCGTCATCGTCCTTGTTAGTCA
USTR_F	ACGTCTCGAGATGACACCGGGCACCCAGT
TM_F	TGGGGGATCCGTGCCAGGCTGGGGCAT
TM_F(2)	AAGCTTGTGCCAGGCTGGGGCAT
CT_R	ACGTGGATCCCCAAGTTGGCAGAAGTGGC
TM_R	GCTAGGATCCGCACTGACAGACAGCCAAGGC
USTR_R	TGACAAGCTTCCCCAGGTGGCAGCTGAA
GAPDH_F	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG
GAPDH_R	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG



**Рис. 1.** Расположение основных функциональных доменов в составе природного муцина MUC1 человека и рекомбинантных слитых белков. L – лидерный пептид; VNTR – область переменных тандемных повторов; TR21 – 21 тандемный повтор из области VNTR; USTR и DSTR – области нерегулярных повторов, расположенные до и после VNTR соответственно; F – FLAG-эпитоп, TM – трансмембранный домен, CT – цитоплазматический домен

HindIII и BamHI), *tmet* (по сайту BamHI) и *f* (по сайту HindIII). Вектор pUSTR-TM-EGFP получен в результате последовательного клонирования фрагментов *ustr* (по сайтам XhoI и HindIII), *tm* (по сайтам HindIII и BamHI) и *f* (по сайту HindIII). Необходимые фрагменты получали рестрикцией векторов pUC18-USTR, pUC18-TM, pUC18-TMCT и pUC18-TR21 с последующей экстракцией из агарозного геля. Таким образом, были получены экспрессионные векторы pUSTR-TM-EGFP и pUSTR-TR-TMCT-EGFP, содержащие гены слитых белков USTR-TM-EGFP и USTR-TR-TMCT-EGFP соответственно. Схематическое изображение взаимного расположения доменов в составе рекомбинантных белков в сравнении со структурой природного муцина представлено на рис. 1.

### Трансфекция

Для трансфекции клеток использовали вектор pEGFP-N3, а также плазмиды pUSTR-TM-EGFP и pUSTR-TR-TMCT-EGFP. Трансфекцию клеток линии HT-29 осуществляли методом электропорации с использованием прибора Gene Pulser Xcell Total System (Bio-Rad, США). В двухмиллиметровую кювету для электропоратора вносили 20 мкл раствора плазмидной ДНК (0,4 мкг/мкл) и 180 мкл клеточной суспензии (5 млн клеток/мл), перемешивали и подвергали действию электрического поля

(500 В/см, 10 импульсов по 1 мс). Клетки высевали в культуральные чашки и растили в полной среде DMEM в течение 3 дней, затем промывали раствором ДФСБ, добавляли свежую среду DMEM, содержащую антибиотик G418 (700 мкг/мл), и культивировали в течение 10–14 дней. Наиболее ярко светящиеся колонии отбирали и помещали в лунки 96-луночного планшета. Стабильно трансфицированные клетки анализировали при помощи проточного цитофлуориметра (BD FACS AriaIII, США).

### Проточная цитофлуориметрия

Для анализа на проточном цитофлуориметре клетки трижды промывали раствором ДФСБ и ресуспендировали в растворе ДФСБ в количестве около 1 млн клеток/мл.

### Флуоресцентная микроскопия

Клетки высевали на стекла и спустя 24 ч анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ts100 (Nikon, Япония) либо LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия).

### ПЦР в реальном времени

ПЦР проводили с использованием готового мастер-микса Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, США), содержащего

Таблица 2. Результаты ПЦР в реальном времени, отражающие содержание мРНК эндогенного муцина в клетках HT-29 и HeLa

мРНК/линия клеток	Средний предельный цикл	Среднее начальное количество	% по отношению к GAPDH
GAPDH / HeLa	25.42	3214.1	100
GAPDH / HT-29	24.19	11795.4	100
MUC1 / HeLa	25.35	4007.57	125
MUC1 / HT-29	28.24	265.28	2.25

интеркалирующий агент SYBR Green. Концентрация праймеров в смесях составляла 0.03 мкмоль/л. Для калибровки использовали четыре разведения образцов кДНК – 10, 100, 1000 и 10000 раз. В качестве контроля проводили реакции в отсутствие кДНК, а также со смесью для обратной транскрипции без обратной транскриптазы M-MuLV. Все реакции проводили в трех повторах.

Уровень экспрессии эндогенного MUC1 в нетрансфицированных клетках определяли с использованием кДНК MUC1 и пары праймеров TM\_F/CT\_R; уровень экспрессии рекомбинантного муцина MUC1 анализировали с использованием кДНК rMUC1 и праймеров USTR\_F/FLAG\_R.

Результаты нормировали по уровню экспрессии гена GAPDH, используя кДНК (GAPDH) и праймеры GAPDH\_F/GAPDH\_R.

#### Определение характера роста клеток, экспрессирующих рекомбинантные белки

Клетки каждой стабильной линии – HT-29\_EGFP, HT-29\_USTR-TM-EGFP и HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP – высевали в культуральные чашки диаметром 3.5 см по 500000 клеток на чашку. После культивирования в течение 3 дней клетки промывали раствором ДФСБ и анализировали характер роста при помощи микроскопа. Количество клеток определяли методом подсчета в камере Горяева.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Выбор клеточной линии

При выборе клеточной линии для создания необходимых моделей следует учитывать ряд требований.

Поскольку клеточные модели предполагается использовать для изучения свойств молекулы, предположительно, увеличивающей метастатический потенциал клеток, для создания таких моделей следует выбирать клетки с исходно невысокой способностью к метастазированию.

Кроме того, в идеальном случае в клетках не должен экспрессироваться эндогенный муцин MUC1, чтобы избежать неоднозначности результатов. Однако клетки около 90% злокачественных новообразований содержат муцин MUC1, что предполагает использование линии опухолевых клеток с существенно пониженным уровнем экспрессии эндогенного MUC1.

Для выбора клеток важен также тип гликозилирования муцина. В работе, выполненной M.D. Burdick и соавт. в 1997 г. [20], были проанализированы формы гликозилирования рекомбинантного муцина MUC1, выделенного из клеток четырех различных линий. По результатам гибридизации гликопротеида с моноклональными антителами, полученными к наиболее распространенным опухоль-ассоциированным гликозидным эпитомам, встречающимся у природного муцина, было установлено, что только рекомбинантный муцин, выделенный из клеток линии HT-29, содержит эпитопы sLe<sup>a</sup> и sLe<sup>x</sup> [20], характерные для клеток агрессивных форм опухолей эпителиального происхождения. Согласно опубликованным данным [2], клетки линии HT-29 обладают также низким метастатическим потенциалом.

Мы сравнили уровни экспрессии эндогенного муцина в клетках линий HT-29 и HeLa методом ПЦР в реальном времени.

Известно, что в результате альтернативного сплайсинга мРНК муцина MUC1 в клетках может образоваться несколько изоформ муцина MUC1, в том числе секреторируемые [26]. В нашем случае существенной была оценка уровня экспрессии только мембранно-связанных форм данного гликопротеида, поэтому для постановки реакции мы использовали праймеры TM\_F и TM\_R, отжигающиеся в области кДНК, кодирующей трансмембранный домен MUC1. Результаты определения уровня экспрессии гена MUC1 в клетках линий HT-29 и HeLa представлены в табл. 2.

Результаты ПЦР в реальном времени показывают, что количество мРНК муцина MUC1 в клетках ли-



USTR  
 MTPGTQSPFFLLLLLTVLTATTAPKPATVVTGSGHASSTPGEEKGTSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSVL  
 SSHSPGSSTTQGQDVTLPATEPAPSGSAATWG

TR21  
 (показано 5 повторов)  
 GSTAPPANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANGV  
 TSAPDTRPAPGSTAPPANGVTSAPDTRPAP...

TM  
 KLGWGIALLVLCVLAIVYLIALAVCQC

CT  
 RRKNYGQLDIFPARDTYNPMSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

Рис. 2. Первичная структура фрагментов муцина MUC1, использованных при создании конструкций. Голубым цветом выделены потенциальные сайты O-гликозилирования, зеленым – последовательность, закрепляющая белок в плазматической мембране. Красным шрифтом выделена последовательность лидерного пептида

нии HT-29 приблизительно на два порядка ниже, чем в клетках линии HeLa. Это свидетельствует о невысоком базовом уровне экспрессии гена MUC1 в клетках линии HT-29.

Таким образом, на основании опубликованных данных и результатов собственных экспериментов для создания моделей опухолевых клеток, экспрессирующих рекомбинантные белки, содержащие определенные функциональные фрагменты муцина MUC1 человека, мы выбрали линию клеток HT-29.

### Создание модельных конструкций

При изучении роли различных функциональных фрагментов MUC1 большинство исследователей, как правило, используют ДНК, кодирующую природный MUC1 [27–29]. Однако природный MUC1 представляет собой гетеродимер, в котором экстрацеллюлярная N-концевая субъединица соединена с мембранно-связанной при помощи стабильных нековалентных взаимодействий. Данные взаимодействия могут нарушаться, что приводит к «сбрасыванию» N-концевой субъединицы с поверхности клетки [30]. Диссоциация в ходе исследования субъединицы белка, содержащей область экстрацеллюлярного домена муцина, может приводить к искажению получаемых результатов. Таким образом, нам нужно было сконструировать гены рекомбинантных белков, которые не имеют сайтов автопротеолиза, но содержат необходимые функциональные фрагменты.

Основное отличие опухоль-ассоциированного муцина MUC1 заключается в наличии определенных

гликозидных эпитопов на поверхности экстрацеллюлярного домена: углеводные компоненты молекулы, как предполагается, вовлечены во взаимодействие с молекулами внеклеточного матрикса и, как следствие, участвуют в процессе метастазирования. Следовательно, конструируемый рекомбинантный белок обязательно должен содержать фрагменты внеклеточного домена, несущие сайты O-гликозилирования. Большое количество остатков Ser и Thr, к которым, предположительно, присоединяются олигосахариды, располагается в области tandemных повторов (VNTR) – каждый повтор, содержащий 20 аминокислотных остатков, включает в себя пять потенциальных сайтов O-гликозилирования. Следуя методике, разработанной для конструирования фрагментов, кодирующих различное количество повторов из области VNTR муцина MUC1 человека [25], был получен фрагмент, кодирующий 21 tandemный повтор (рис. 2).

Кроме того, большое количество потенциальных сайтов O-гликозилирования характерно для областей вырожденных повторов (USTR и DSTR). Поскольку область DSTR содержит сайт автопротеолиза, этот фрагмент при конструировании не использовали. В то же время для создания конструкций необходимо было получить фрагмент ДНК, кодирующий последовательность USTR (см. рис. 2).

Наконец, для того чтобы экстрацеллюлярный домен MUC1, входящий в состав рекомбинантных белков, был экспонирован во внеклеточное пространство, он должен содержать, по меньшей мере, трансмем-

бренный домен (ТМ) и последовательность ССС, обеспечивающую мембранную локализацию гликопротеида [31]. Аминокислотная последовательность трансмембранного домена приведена на *рис. 2*.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая цитоплазматический домен (СТ, см. *рис. 2*), необходима для конструирования гена «полноразмерного» муцина, лишённого только области, кодирующей сайт автопротеолиза и часть вырожденных повторов.

Фрагменты, кодирующие USTR, ТМ и СТ муцина MUC1 человека, были амплифицированы с кДНК муцина MUC1, синтезированной на суммарной мРНК из клеток рака молочной железы MCF-7.

С использованием перечисленных выше фрагментов были созданы две экспрессионные конструкции, содержащие гены химерных белков, слитых на С-конце с EGFP, – «полноразмерного» MUC1 (pUSTR-TR-TMCT-EGFP) и лишённого тандемных повторов и цитоплазматического домена (pUSTR-TM-EGFP) (*рис. 1*).

Между областью тандемных повторов и фрагментом, кодирующим вырожденные повторы, мы дополнительно ввели последовательность, кодирующую FLAG-эпитоп, чтобы иметь возможность выявлять N-концевую область рекомбинантных белков при помощи специфических антител.

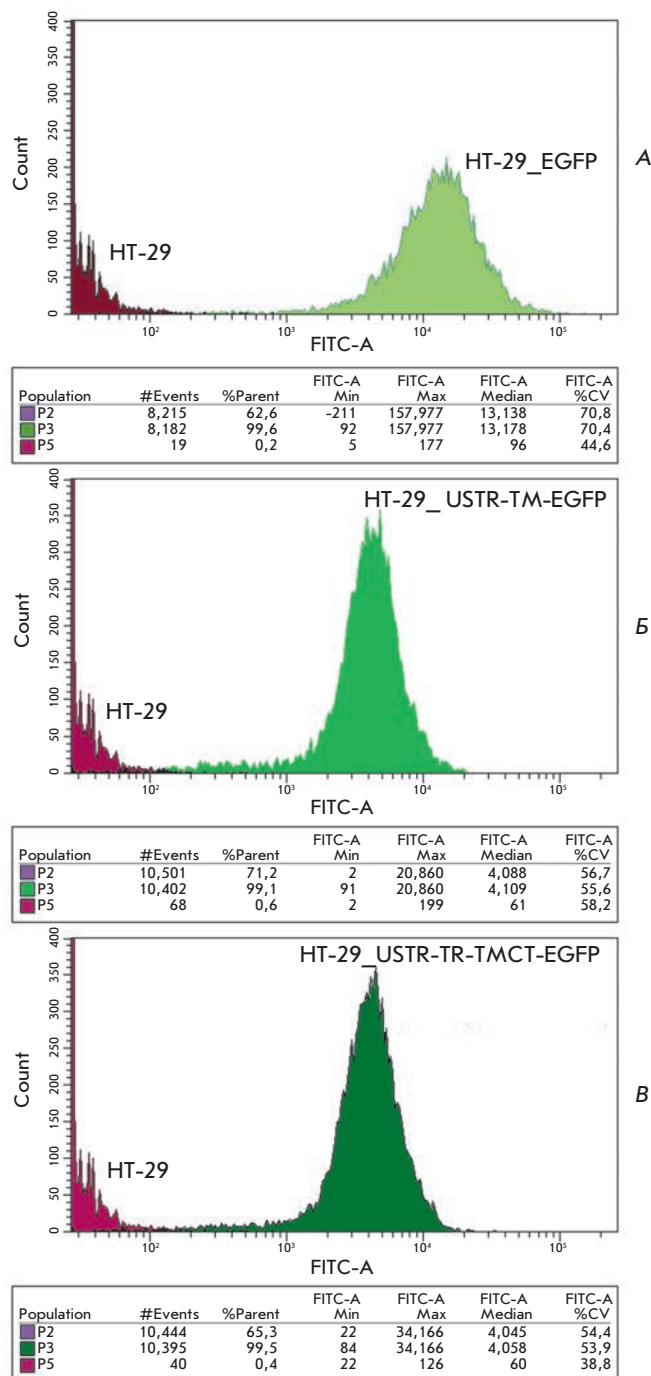
### Получение и характеристика клеточных моделей

Экспрессию рекомбинантных белков анализировали при помощи проточной цитофлуориметрии в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29 по флуоресценции EGFP (*рис. 3*).

Уровень экспрессии рекомбинантного муцина (rMUC1) в стабильно трансфицированных клетках определяли методом ПЦР в реальном времени и сравнивали с экспрессией гена домашнего хозяйства GAPDH. Результаты определения уровня экспрессии генов рекомбинантных белков в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29 представлены в *табл. 3*.

Показано, что содержание мРНК рекомбинантных белков USTR-TM-EGFP и USTR-TR-TMCT-EGFP в стабильно трансфицированных клетках HT-29\_USTR-TM-EGFP и HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP составляет приблизительно 20% от содержания мРНК GAPDH. Учитывая, что содержание мРНК эндогенного муцина MUC1 в клетках линии HT-29 составляет 2.25% (*табл. 2*), можно сделать вывод, что в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29 мРНК рекомбинантного муцина составляет примерно 85% всей мРНК MUC1 (рекомбинантного и эндогенного).

Анализ локализации рекомбинантных белков методом флуоресцентной микроскопии показал, что в клетках HT-29\_EGFP наблюдается цитоплазма-



**Рис. 3.** Флуоресценция клеток HT-29, стабильно трансфицированных векторами pEGFP-N3 (A), pUSTR-TM-EGFP (Б), pUSTR-TR-TMCT-EGFP (Б)

тическая и ядерная локализация сигнала в зеленой области спектра (*рис. 4А*), в то время как в клетках HT-29\_USTR-TM-EGFP и HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP сигнал преимущественно локализуется в области плазматической мембраны (*рис. 4Б,В*).

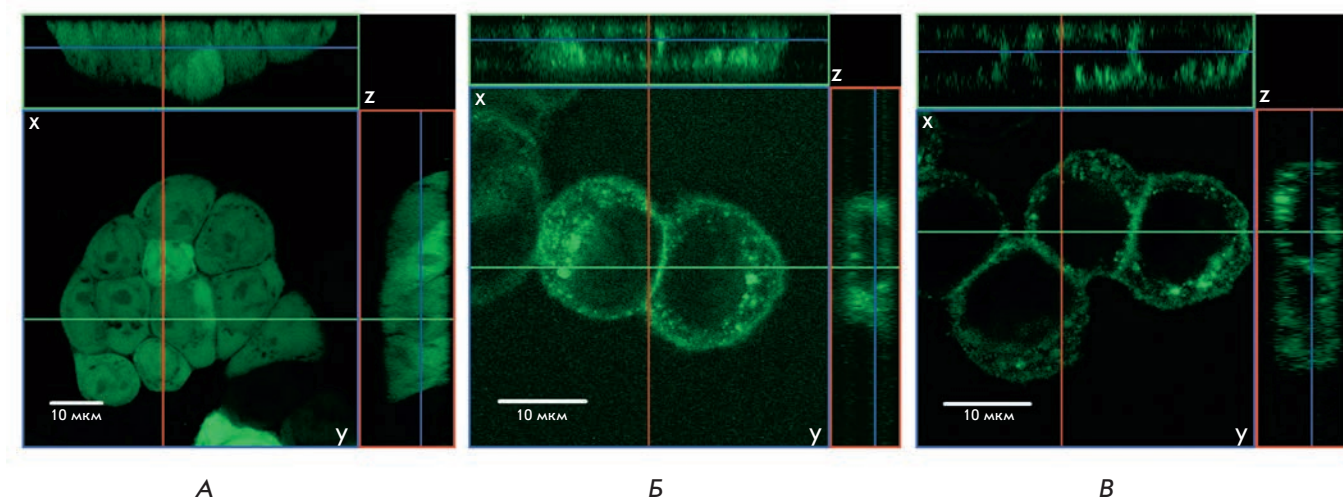


Рис. 4. Локализация флуоресценции EGFP в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29. А – HT-29\_EGFP, Б – HT-29\_USTR-TM-EGFP, В – HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP. Верхняя и боковая панели каждого изображения показывают оптический срез трехмерного изображения в плоскости xz и yz соответственно

Таблица 3. Результаты ПЦР в реальном времени, отражающие содержание мРНК рекомбинантных белков в стабильно трансфицированных клетках линии HT-29

мРНК/линия клеток	Средний предельный цикл	Среднее начальное количество	% по отношению к GAPDH
GAPDH / HT-29_EGFP	14.30	730.65	100
GAPDH / HT-29_USTR-TM-EGFP 1	12.76	1922.36	100
GAPDH / HT-29_USTR-TR-TMCT-EGFP	13.21	1347.97	100
rMUC1 / HT-29_EGFP-N3	22.62	0.94	0.129
rMUC1 / HT-29_USTR-TM-EGFP 1	14.34	373.82	19.446
rMUC1/HT-29_USTR-TR-TMCT-EGFP	14.75	278.03	20.626

Анализ трехмерных изображений, полученных с применением конфокальной микроскопии, показал, что белки, содержащие фрагменты муцина, слитые с EGFP, имеют преимущественно периферическую мембранную локализацию, в отличие от белка EGFP, ожидаемо детектируемого как в цитоплазме, так и в ядре (рис. 4, верхняя и боковая панели каждого изображения).

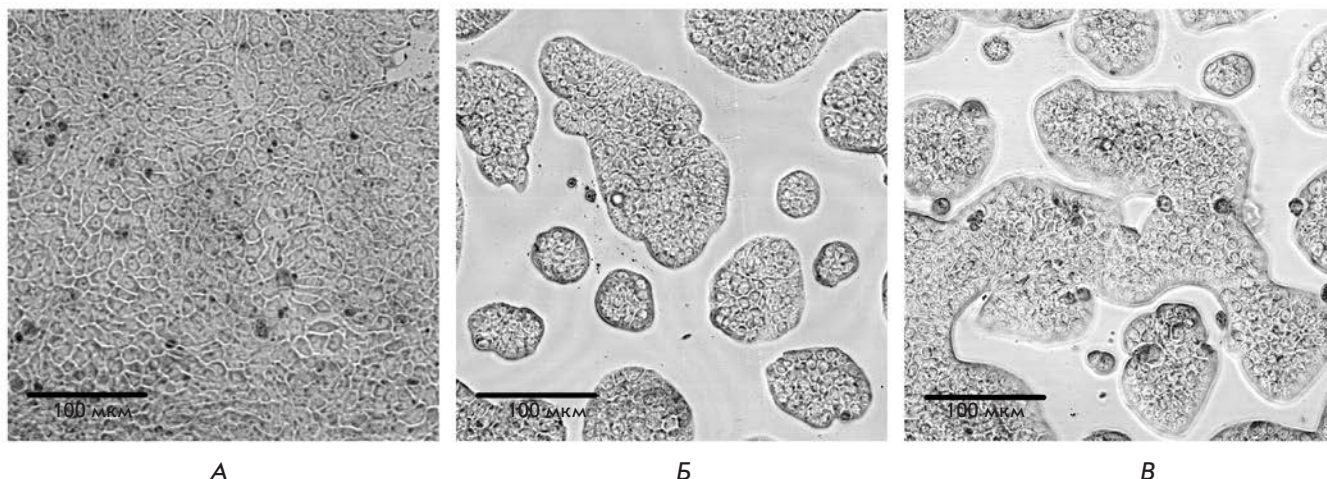
Наконец, нами установлено различие в характере роста клеток полученных линий. В то время как клетки HT-29\_EGFP по мере роста формируют монослой (рис. 5А), клетки HT-29\_USTR-TM-EGFP и HT-29\_USTR-TR-TMCT-EGFP склонны к формированию обособленных «островков» (рис. 5Б,В). Учитывая, что в данном эксперименте на чашки высевали оди-

наковое количество клеток (500000), а после 3 дней культивирования их число также отличалось незначительно, различие в скорости деления можно исключить. Наблюдаемая нами картина является свидетельством различия адгезионных характеристик клеток полученных линий, вызванного присутствием на их поверхности рекомбинантных белков, содержащих фрагменты муцина MUC1.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На базе клеток линии HT-29 получены клеточные модели, экспрессирующие слитые с EGFP белки, представляющие на внешней поверхности клеток фрагменты экстрацеллюлярного домена муцина MUC1 человека, несущие сайты O-гликозилирования.





**Рис. 5.** Влияние экспрессии рекомбинантных белков на характер роста стабильно трансфицированных клеток линии HT-29 в культуре. А – клетки, экспрессирующие EGFP, Б – клетки, экспрессирующие USTR-TM-EGFP, В – клетки, экспрессирующие USTR-TR-TMCT-EGFP

Основное различие полученных нами моделей заключается в наличии или отсутствии в структуре рекомбинантных белков области, содержащей 21 тандемный повтор. Эти модели отличаются высоким уровнем экспрессии рекомбинантных белков на фоне низкой экспрессии эндогенного муцина MUC1. Характер роста модельных клеток отличается от роста клеток, экспрессирующих EGFP. ●

*Авторы выражают благодарность И.А. Воробьеву (кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова), а также А.Ю. Архиповой, А.А. Рамоновой и М.М. Мойсеновичу (кафедра*

*биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) за содействие и помощь в проведении экспериментов.*

*Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова (клеточный сортер FACSAria SORP (BD), конфокальный микроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta).*

*Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (соглашение № 8800 и РФФИ (гранты № 12-04-33031, 12-04-31338, 12-04-31721, 13-04-01875)).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wyld L., Gutteridge E., Pinder S.E., James J.J., Chan S.Y., Cheung K.L., Robertson J.F., Evans A.J. // Br. J. Cancer. 2003. V. 89. № 2. P. 284–290.
- Haier J., Nasralla M., Nicolson G.L. // Br. J. Cancer. 1999. V. 80. № 12. P. 1867–1874.
- Doerr M.E., Jones J.I. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 5. P. 2443–2447.
- Varki A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 16. P. 7390–7397.
- Qi J., Chen N., Wang J., Siu C.H. // Mol. Biol. Cell. 2005. V. 16. № 9. P. 4386–4397.
- Hilkens J., Ligtenberg M.J., Vos H.L., Litvinov S.V. // Trends Biochem. Sci. 1992. V. 17. № 9. P. 359–363.
- Dong Y., Walsh M.D., Cummings M.C., Wright R.G., Khoo S.K., Parson P.G., McGuckin M.A. // J. Pathol. 1997. V. 183. № 3. P. 311–317.
- Hinoda Y., Ikematsu Y., Horinochi M., Sato S., Yamamoto K., Nakano T., Fukui M., Suehiro Y., Hamanaka Y., Nishikawa Y., et al. // J. Gastroenterol. 2003. V. 38. № 12. P. 1162–1166.
- McGuckin M.A., Walsh M.D., Hohn B.G., Ward B.G., Wright R.G. // Hum. Pathol. 1995. V. 26. № 4. P. 432–439.
- Li Y., Ren J., Yu W., Kuwahara H., Yin L., Carraway K.L. 3rd, Kufe D. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 38. P. 35239–35242.
- Schroeder J.A., Adriance M.C., Thompson M.C., Camenisch T.D., Gendler S.J. // Oncogene. 2003. V. 22. № 9. P. 1324–1332.
- Burchell J., Taylor-Papadimitriou J., Boshell M., Gendler S., Duhig T. // Int. J. Cancer. 1989. V. 44. № 4. P. 691–696.
- Rahn J.J., Chow J.W., Horne G.J., Mah B.K., Emerman J.T., Hoffman P., Hugh J.C. // Clin. Exp. Metastasis. 2005. V. 22. № 6. P. 475–483.
- Bernier A.J., Zhang J., Lillehoj E., Shaw A.R., Gunasekara N., Hugh J.C. // Mol. Cancer. 2011. V. 10. № 93. P. 1295–1304.
- Roy L.D., Sahraei M., Subramani D.B., Besmer D., Nath S., Tinder T.L., Bajaj E., Shanmugam K., Lee Y.Y., Hwang S.I., et al. // Oncogene. 2011. V. 30. № 12. P. 1449–1459.
- Bafna S., Kaur S., Batra S.K. // Oncogene. 2010. V. 29. № 20. P. 2893–2904.
- Ren J., Bharti A., Raina D., Chen W., Ahmad R., Kufe D. // Oncogene. 2006. V. 25. № 1. P. 20–31.



18. Wei X., Xu H., Kufe D. // *Cancer Cell*. 2005. V. 7. № 2. P. 167–178.
19. Nakamori S., Kameyama M., Imaoka S., Furukawa H., Ishikawa O., Sasaki Y., Izumi Y., Irimura T. // *Dis. Colon. Rectum*. 1997. V. 40. № 4. P. 420–431.
20. Burdick M.D., Harris A., Reid C.J., Iwamura T., Hollingsworth M.A. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 39. P. 24198–24202.
21. Julien S., Lagadec C., Krzewinski-Recchi M.A., Courtand G., Le Bourhis X., Delannoy P. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2005. V. 90. № 1. P. 77–84.
22. Gong E., Hirohashi S., Shimosato Y., Watanabe M., Ino Y., Teshima S., Kodaira S. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1985. V. 75. № 3. P. 447–454.
23. Inufusa H., Kojima N., Yasutomi M., Hakomori S. // *Clin. Exp. Metastasis*. 1991. V. 9. № 3. P. 245–257.
24. Gendler S.J., Lanscater C.A., Taylor-Papadimitriou J., Duhig T., Peat N., Burchell J., Pemberton L., Lalani E.N., Wilson D. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 25. P. 15286–15293.
25. Гулько Л.Б., Павлова О.В., Дьяков Н.А., Окорокова Н.А., Ратманова К.И., Логунова Н.Н., Бобренева Р.А., Макаров В.А., Юрин В.Л., Вейко В.П. и др. // *Биоорганическая химия*. 2000. Т. № 6. С. 423–432.
26. Imbert Y., Darling D.S., Jumblatt M.M., Foulks G.N., Couzin E.G., Steele P.S., Young W.W. Jr. // *Exp. Eye Res.* 2006. V. 83. № 3. P. 493–501.
27. Ligtenberg M.J., Kruijshaar L., Buijs F., van Meijer M., Litvinov S.V., Hilkens J. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 9. P. 6171–6177.
28. Schroeder J.A., Thompson M.C., Gardner M.M., Gendler S.J. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 16. P. 13057–13064.
29. Rahn J.J., Shen Q., Mah B.K., Hugh J.C. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 28. P. 29386–29390.
30. Julian J., Dharmaraj N., Carson D.D. // *J. Cell. Biochem.* 2009. V. 108. № 4. P. 802–815.
31. Pemberton L.F., Rughetti A., Taylor-Papadimitriou J., Gendler S.J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 4. P. 2332–2340.

УДК 575.174.015.3:599.9

# Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией

Е. А. Трифонова<sup>1</sup>, Т. В. Габидулина<sup>2</sup>, Н. И. Ершов<sup>3</sup>, В. Н. Сереброва<sup>1</sup>, А. Ю. Ворожищева<sup>4</sup>, В. А. Степанов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН, 634050, Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет Минздрава РФ, кафедра акушерства и гинекологии ФПК и ППС, 634050, Томск, ул. Московский тракт, 2

<sup>3</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

<sup>4</sup>МЛПУ «Городская клиническая больница № 1», 654057, Новокузнецк, просп. Бардина, 28

\*E-mail: vadim.stefanov@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 28.08.2013

После доработки 23.12.2013

**РЕФЕРАТ** Преэклампсия (ПЭ) – одно из наиболее тяжелых гестационных осложнений, занимает ведущее место среди причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности, причем в последние годы отмечается рост тяжелых и сочетанных форм данной патологии. Согласно современным представлениям в развитии ПЭ, которая характеризуется синдромом полиорганной недостаточности, ведущую роль играют нарушение инвазии цитотрофобласта в спиральные артерии матки и формирование в плацентарной ткани синдрома ишемии-реперфузии. В связи с этим целью нашей работы состояла в изучении паттернов транскриптома плацентарной ткани, специфичных для женщин с ПЭ и с физиологическим течением беременности, а также в выявлении потенциальных перспективных биомаркеров и молекулярных механизмов развития данной патологии. Выявлены 63 гена, экспрессия которых статистически значимо различается в плацентарной ткани женщин с ПЭ и с физиологическим течением беременности. Кластер дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), уровень экспрессии которых повышен при ПЭ, содержит не только известные гены-кандидаты, выявленные ранее во многих зарубежных полногеномных исследованиях (к примеру, *LEP*, *BHLHB2*, *SIGLEC6*, *RDH13*, *BCL6*), но и новые гены (*ANKRD37*, *SYDE1*, *CYBA*, *ITGB2* и др.), которые могут рассматриваться в качестве новых биологических маркеров ПЭ и представляют интерес для дальнейшего изучения. Результаты функциональной аннотации ДЭГ показывают, что с развитием ПЭ могут быть связаны реакция на стресс, иммунные процессы, регуляция межклеточных взаимодействий, внутриклеточные сигнальные каскады и др. Кроме того, выявлены особенности дифференциальной экспрессии генов, зависящие от степени тяжести ПЭ, получены доказательства важной роли молекулярных механизмов, обуславливающих нарушения иммунологической толерантности и запуск провоспалительного каскада в развитии тяжелой формы ПЭ. Полученные результаты расширяют представление о патофизиологии ПЭ и содержат информацию, необходимую для разработки мероприятий таргетной терапии этого заболевания.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** микрочипы, плацента, полногеномный анализ, преэклампсия, транскриптом, экспрессия генов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; МФЗ – многофакторные заболевания; ПЭ – преэклампсия; GWAS – полногеномное исследование ассоциаций; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

## ВВЕДЕНИЕ

Проведенные к настоящему времени многочисленные полногеномные исследования ассоциаций (GWAS) предоставили ценную информацию о гене-

тической архитектуре многофакторных заболеваний (МФЗ) человека и выявили сотни рискованных аллелей однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), связанных с большим количеством фенотипов. Однако они

объясняют лишь относительно малую часть наследования сложных признаков и оказывают весьма умеренный эффект на фенотип ассоциированных вариантов [1]. Эти результаты поставили интенсивно обсуждаемый в настоящее время вопрос об «упущенной наследственности» (missing heritability). Другое ограничение эффективности GWAS в отношении изучения структуры наследственной компоненты предрасположенности к МФЗ связано с использованием tagSNP: рисковые аллели, идентифицированные в ходе GWAS, как правило, не относятся к «причинным», а находятся в неравновесии по сцеплению (LD) с аллелями функционально значимых вариантов [2], поэтому серьезную проблему представляет биологическая интерпретация результатов GWAS.

Большинство используемых на сегодняшний день подходов к идентификации «причинных» аллельных вариантов, сцепленных с полиморфизмами, детектированными в GWAS, основано на анализе кодирующих или транскрибируемых участков генома [2–4]. Однако подавляющее большинство SNP, выявленных при GWAS, находятся в нетранскрибируемых областях, не сцеплены с вариантами, расположенными в экзонах, и основной механизм их действия связан, по-видимому, с регуляцией экспрессии генов [5, 6]. Поэтому при исследовании генетической архитектуры и молекулярных механизмов МФЗ особую актуальность приобретают постгеномные методы, позволяющие в короткий срок получить информацию практически обо всех компонентах, координирующих основные функции генов, РНК и белков на различных иерархических уровнях. Один из таких подходов, а именно высокопроизводительное измерение экспрессии генов с помощью технологии микрочипов, использован в представленной работе для характеристики паттернов транскриптома при физиологической беременности и при преэклампсии (ПЭ), одном из наиболее тяжелых гестационных осложнений.

Преэклампсия, при которой развивается синдром полиорганной недостаточности, – специфичный синдром, который возникает после 20-й недели беременности и определяется по наличию артериальной гипертензии и протеинурии. ПЭ диагностируется в 70% случаев гипертензивных расстройств у беременных, причем в последние годы отмечается рост частоты тяжелых и сочетанных форм данной патологии [7]. Несмотря на большое количество теорий этиопатогенеза (неврогенная, гормональная, плацентарная, иммунологическая, генетическая и др.), многочисленные исследования механизмов развития этого заболевания и появление новых методов лечения, ПЭ продолжает занимать ведущее место среди причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. На долю этой патологии приходится

до 70% мертворождений и выкидышей, а величина перинатальных потерь при ПЭ возрастает почти в 5 раз [7, 8].

Согласно современным представлениям, этиопатогенез преэклампсии тесно связан с нарушением инвазии цитотрофобласта в спиральные артерии матки и с формированием синдрома ишемии-реперфузии, обуславливающего развитие окислительного стресса и системного воспаления [9, 10]. Этиологические факторы и механизмы этого нарушения на сегодняшний день остаются не вполне ясными и требуют пристального внимания. С целью выявления возможных перспективных биомаркеров ПЭ и изучения молекулярных механизмов гестационных осложнений мы анализировали паттерны плацентарного транскриптома, специфичные для ПЭ и физиологического течения беременности, поскольку очевидно, что ведущая роль в развитии ПЭ принадлежит плацентарной ткани. Стратегия использования микрочипов в данном контексте представляется достаточно обоснованной и мощной, так как позволяет детально исследовать на уровне транскриптома возможные изменения в экспрессии генов, связанных с патофизиологией преэклампсии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Характеристика обследованных групп

В рамках данной работы были обследованы 10 пациенток с ПЭ и 11 с физиологическим течением беременности, составивших контрольную группу (табл. 1). В анкету были включены сведения о демографических (этническая принадлежность) и антропометрических (рост, вес) параметрах, образе жизни (курение, злоупотребление психоактивными веществами), а также информация о соматическом и акушерско-гинекологическом анамнезе. Диагноз ПЭ был установлен на основании ведущих клинических симптомов различной степени выраженности, таких, как протеинурия, отеки, гипертензия (систолическое давление более 140 мм рт. ст., диастолическое – от 90 мм рт. ст.), в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра. Степень тяжести ПЭ оценивали по критериям клинического протокола 2012 года «Гипертензия во время беременности. Преэклампсия. Эклампсия» [11].

Группа больных ПЭ была неоднородной как по степени тяжести (в исследование вошли шесть пациенток с умеренно выраженной и четыре пациентки с тяжелой формой ПЭ), так и по наличию предшествовавших и сопутствующих фоновых заболеваний: у четырех пациенток диагностирована ПЭ при отсутствии фоновых заболеваний, у остальных гестационное осложнение развилось на фоне таких экс-

Таблица 1. Характеристика обследованных групп

Показатель	ПЭ, N = 10	Контрольная группа, N = 11	Уровень значимости, p*
Средний возраст, лет	26 ± 2	28 ± 3	0.241
Средний вес, кг	60 ± 7	62 ± 6	0.324
Индекс массы тела, ИМТ	23 ± 4	23 ± 3	0.832
Среднее максимальное систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	162 ± 19	121 ± 3	0.0001
Среднее максимальное диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	104 ± 13	80 ± 4	0.0001
Срок родов, недели	38 ± 1	40 ± 2	0.009
Вес новорожденных, г	2783 ± 560	3549 ± 345	0.004
Рост новорожденных, см	50 ± 4	53 ± 2	0.021
Преждевременные роды, %	50	0	0.012
Наличие хронических заболеваний, %	60	50	0.575

\*Уровень значимости определен при сравнении групп с помощью критерия Манна–Уитни или точного критерия Фишера.

трагениальных заболеваний, как вегетососудистая дистония по гипо-/гипертоническому типу, хронический пиелонефрит, хронический холецистит, хроническая артериальная гипертензия. У шести женщин контрольной группы также зафиксирован хронический пиелонефрит и хронический холецистит. Возраст беременных в обеих группах варьировал от 18 до 33 лет, по показателю среднего возраста группы были сопоставимы. Выявлены статистически значимые отличия по весу и росту новорожденных из контрольной группы и группы больных. Группы различались также по показателям артериального давления и срока родов.

#### Сбор плацентарных образцов

В работе исследовали дистальную (материнскую) часть плаценты. Ткань забирали сразу после родов (время ишемии образца не превышало 10 мин). Плацентарные биоптаты забирали из центральных зон близко к пуповине на 0.5 см плацентарной глубины. Образцы были собраны из макроскопически нормальных участков плаценты (без кровоизлияний, кальцификации, некроза и осадений фибрина), не затрагивая крупные сосуды, промыты физиологическим раствором для удаления остатков материнской крови и амниотической жидкости, сразу погружены в RNAlater (Ambion, Великобритания) и перенесены на хранение при  $-80^{\circ}\text{C}$  до процедуры выделения РНК. При гистологическом исследовании

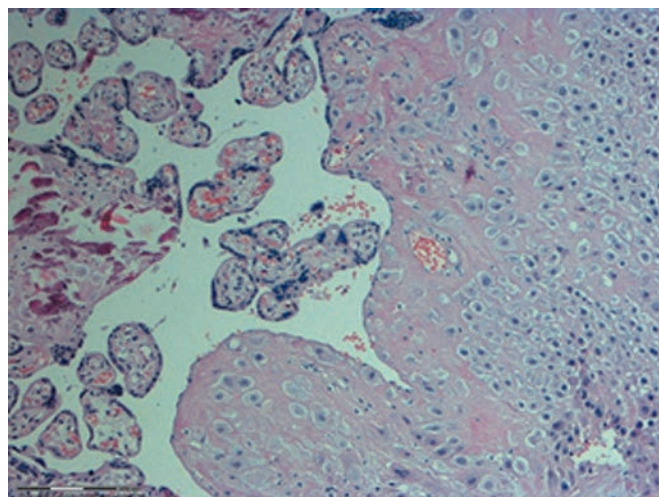


Рис. 1. Микрофотография одного из биоптатов плаценты. Окраска гематоксилином-эозином

во всех биоптатах определялись ворсинки хориона и децидуальная ткань с очагами фибриноидного некроза и мелкими кальцинатами (рис. 1).

#### Выделение РНК

Образцы ткани (100–200 мг) гомогенизировали с помощью TissueLyser (Qiagen) в Trizol и далее выделяли РНК по стандартному протоколу. Концентра-



цию суммарной РНК определяли с использованием на Nanodrop ND-1000 по поглощению при длине волны 260 нм в воде. Качество образцов контролировали с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) и спектрофотометрического сканирования.

#### Анализ микроматриц

Полногеномный профиль экспрессии генов в ткани плаценты определяли с помощью гибридизации на микроматрицах HT-12 BeadChip (Illumina, США), содержащих информацию более чем о 48000 транскриптов. После гибридизации микроматрицы сканирование на приборе Illumina BeadArray Reader. Преобразование первичных данных в средние значения интенсивности сигнала по каждой пробе (Sample Probe Profile) проводили с помощью программного пакета BeadStudio v3 (Illumina).

#### Биоинформатический анализ

Анализ данных проводили в программной среде R с помощью пакета limma [12]. Для всего набора данных проводили непараметрическую коррекцию фона с последующей квантильной нормализацией (функция *neqc*). В дальнейшем рассмотрение вошли пробы, выявленные во всех образцах хотя бы одной из экспериментальных групп (detection  $p$ -value < 0.01). Анализ дифференциальной экспрессии проводили с использованием множественной линейной регрессии и модерированной  $t$ -статистики [12], включая оценку весов качества чтения микроматриц [13] и поправку на множественные сравнения Бенжамини–Хохберга (FDR). Значимым считали изменение уровня экспрессии гена (FC – fold change) в 1.5 раза и более при скорректированном уровне значимости  $p \leq 0.1$ . Функциональную аннотацию и функциональный кластерный анализ групп дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) осуществляли с помощью Web-инструмента DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) с использованием стандартных значений параметров кластеризации и уровнем обогащения EASE  $\leq 0.01$  [14]. Конструирование генных сетей проводили с использованием программы STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) 9.0 [15].

Проведение настоящего исследования одобрено комитетом по этике при ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» СО РАМН.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного нами анализа выявлены 63 гена, экспрессия которых статистически значимо различается (FDR < 0.1; FC  $\geq 1.5$ ) в плацентарной тка-

ни женщин с ПЭ и физиологическим течением беременности (50 ДЭГ с повышенным и 13 со сниженным уровнем экспрессии). Кластер ДЭГ, экспрессия которых повышена при ПЭ, включает не только известные гены-кандидаты, выявленные ранее во многих полногеномных исследованиях профилей экспрессии генов плаценты при преэклампсии (к примеру, *LEP*, *BHLHB2*, *SIGLEC6*, *RDH13*, *BCL6*), но также новые потенциальные гены-кандидаты (*CORO2A*, *SYDE1*, *PLIN2*, *CEBPA*, *HK2*, *NDRG1*, *ERRFI1*, *EFNB1*, *GFOD2*, *NCOR2*, *HMHA1*, *HERPUD1*, *KIF2A*), связь которых с развитием ПЭ установлена либо в единичных исследованиях [16–21], либо впервые в нашей работе. Продукты некоторых из этих генов, согласно известным на сегодняшний день данным об их функциональных особенностях, вполне могут быть вовлечены в этиопатогенез ПЭ.

На *рис. 2* представлена теплокарта, показывающая результаты иерархической кластеризации женщин по уровню экспрессии 63 ДЭГ. Видно, что все пациентки с ПЭ, за исключением одной, попадают в один кластер, в то время как женщины с физиологическим течением беременности – в другой. Отнесение одного образца с ПЭ в контрольную группу обусловлено, вероятно, существенной межиндивидуальной вариабельностью уровней транскрипции генов плацентарной ткани. Подобное явление наблюдали в ряде клеточных линий человека, в частности транскриптома гепатоцитов [22, 23].

В *табл. 2* представлены данные о наиболее значимых ДЭГ (FC > 2, FDR < 0.01). Интерес вызывает присутствие в этом списке некоторых генов, продукты которых участвуют в регуляции транскрипции (*BHLHB2*, *ZNF175*, *ANKRD37*, *BCL6*), а также значительное повышение уровня экспрессии гена *LEP* и гена его рецептора *SIGLEC6* при развитии ПЭ.

С целью изучения биологических процессов, связанных с развитием ПЭ, мы проанализировали ДЭГ с помощью он-лайн ресурса DAVID (*рис. 3*). Основные категории молекулярных функций белковых продуктов данных генов включают реакцию на различные стимулы, иммунные процессы, регуляцию клеточных коммуникаций, внутриклеточные сигнальные каскады и др. Анализ метаболических путей, в которые включены ДЭГ, указывает на возможное участие в молекулярных механизмах ПЭ путей цитотоксичности, обусловленной NK-клетками, трансэндотелиальной миграции лейкоцитов и сигнальных путей, опосредованных активаторами GTP-аз.

Для выявления возможных взаимоотношений ДЭГ был проведен анализ белок-белковых взаимодействий продуктов ДЭГ (*рис. 4*). Ассоциации в построенной сети основаны в основном на «text mining» (упомянутые в резюме одной статьи). Обращает

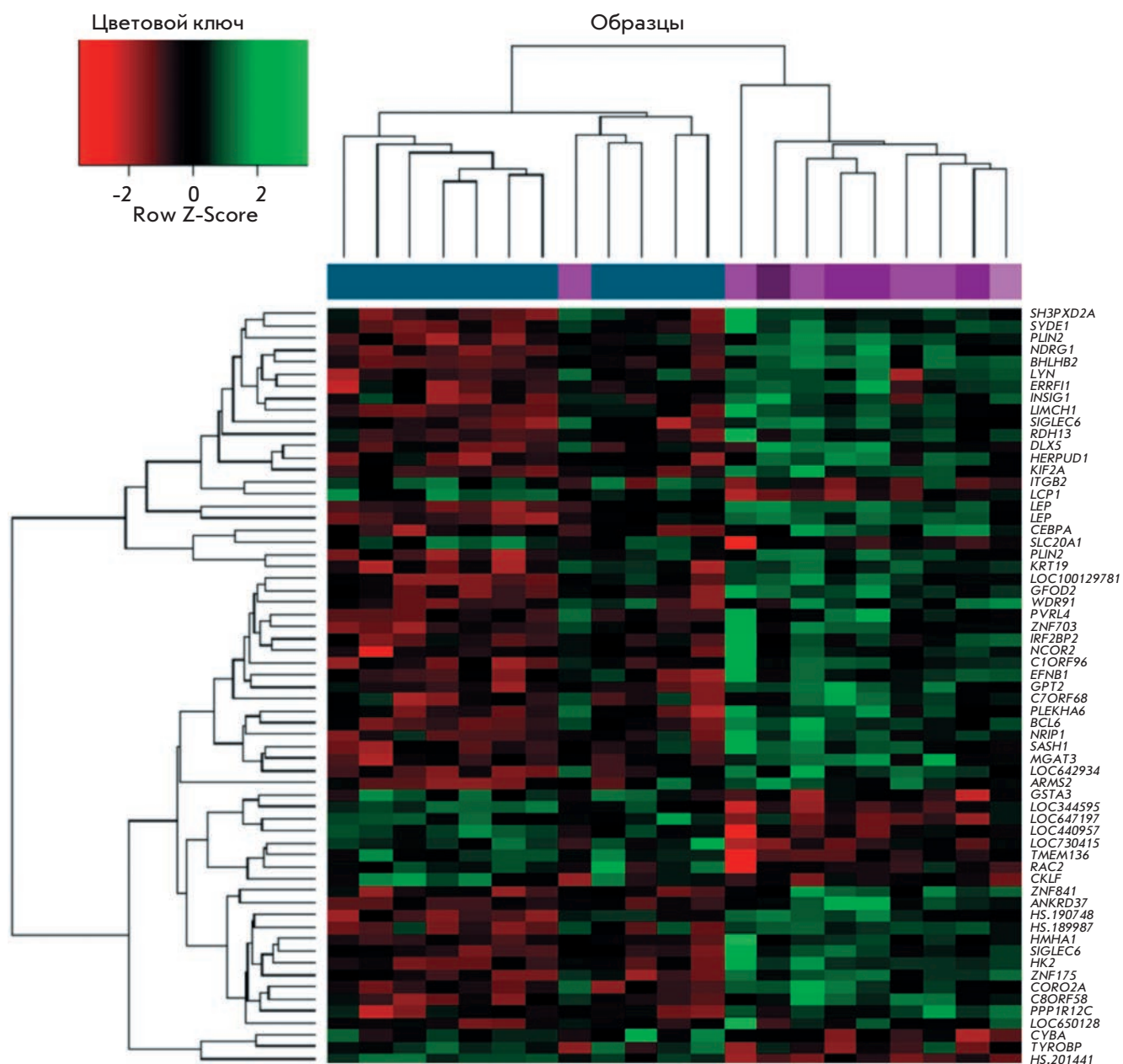


Рис. 2. Теплокарта ДЭГ (FDR < 0.1; FC ≤ 1.5). Каждый столбец представляет образец, каждая строка – ДЭГ. Розовым цветом маркированы образцы от пациенток с ПЭ, синим – от женщин контрольной группы. Цветовая шкала теплокарты обозначает отклонение нормализованного уровня экспрессии в данной ячейке от среднего по строке

на себя внимание кластер коэкспрессии, включающий гены *RAC2*, *CYBA*, *TYROBP*, *HMHA1*, *ITGB2*, *LYN* и *LCP1*. Кроме того, определенный интерес вызывают пары *LEP*/его рецептор *SIGLEC6*, эфрин и его киназа *LYN*.

В нашей работе выявлены также особенности дифференциальной экспрессии генов в зависимости

от степени тяжести ПЭ (табл. 3). Всего найдено восемь ДЭГ (FDR < 0.1; FC ≤ 1.5), уровень экспрессии которых статистически значимо отличается при умеренной и тяжелой формах заболевания. Наибольший интерес, на наш взгляд, представляет *BAG3*, кодирующий Bcl-2-связывающий белок Bis, основная функция которого – ингибирование шаперонной ак-

Таблица 2. Наиболее значимые дифференциально экспрессирующиеся гены

№	Изменение уровня экспрессии	FC	p-уровень FDR	Ген	Хромосома	Продукт гена	Основные функции*
1	↑	1.054	0.0007	<i>LEP</i>	7	Лептин	Ген кодирует белок, секретируемый адипоцитами и играющий важную роль в регуляции потребления пищи и/или расхода энергии для поддержания постоянства жировой массы. Лептин также участвует в регуляции иммунных, воспалительных реакций и процессов кровотока, стимулировании ангиогенеза и ингибировании апоптоза.
2	↓	3.84	0.0001	<i>HS.201441</i>	13	Длинная некодирующая РНК 284	По данным анализа EST-библиотек тканеспецифичная экспрессия гена <i>HS.201441</i> наблюдается преимущественно в плаценте и яйцниках.
3	↑	2.95	0.0000	<i>BHLHE40</i>	3	Транскрипционный фактор с доменом спираль-петля-спираль	Транскрипционный фактор, модулирующий хондрогенез в рамках сAMP-сигнального пути. Вовлечен в контроль клеточной дифференцировки.
4	↑	2.93	0.0031	<i>ANKRD37</i>	4	Повторяющийся домен анкирина 37	Кодируемый белок содержит четыре анкириновых повтора, которые являются медиаторами белок-белковых взаимодействий и вовлечены в регуляцию функционирования таких ключевых факторов транскрипции, как NFκB и TP53. Кроме того, получены данные, свидетельствующие о важной роли ANKRD37 в клеточном ответе на гипоксию [24].
5	↑	2.91	0.0067	<i>SIGLEC6</i>	19	Иммуноглобулинподобный лектин 6, связывающий сиаловую кислоту	Иммуноглобулинподобные лектины, связывающие сиаловые кислоты, представляют собой семейство мембранных белков типа I, которые распознают сиалированные гликаны и связываются с ними. SIGLEC6 взаимодействует с α-2,6-связанной сиаловой кислотой клеточных мембран иммунных клеток и регулирует клеточную адгезию, таким образом, принимая участие в иммунном ответе. Кроме того, SIGLEC6 является лигандом лептина [25].
6	↑	2.64	0.0006	<i>ZNF175</i>	19	Белок цинковых пальцев 175	Негативная регуляция экспрессии различных хемокиновых рецепторов.
7	↑	2.43	0.0031	<i>CCSAP (C1orf96)</i>	1	Белок, локализующийся в центриоле, ресничках и веретене деления (открывающая рамка считывания 96, хромосома 1)	Предположительно играет роль в эмбриональном развитии.

8	↑	2.43	0.0050	<i>GPT2</i>	16	Аланин-аминотрансфераза 2; глутамат-пируват-трансминаза	Катализирует обратимое трансаминирование между аланином и 2-оксоглутаратом с образованием пирувата и глутамата, участвуя в метаболизме аминокислот и глюконеогенезе.
9	↑	2.39	0.0050	<i>RDN13</i>	19	Релинолдегидрогеназа 13	Катализирует окисление и восстановление региноидов, участвует в защите митохондрий от окислительного стресса.
10	↑	2.36	0.0006	<i>BCL6</i>	3	Транскрипционный фактор – белок цинковых пальцев 51	Содержит N-концевой POZ/BTV-домен и является специфичным к последовательности репрессором транскрипции. Принимает участие в модуляции STAT-зависимого IL-4-индуцируемого иммунного ответа с привлечением В-клеток, формировании антител и лимфоангиогенезе.
11	↑	2.33	0.0056	<i>PLIN2</i>	9	Перилипин 2, белок липидных капель	Функция перилипина в базовых клетках заключается в стабилизации хранилищ нейтральных липидов. В активированных клетках его функции связаны с обеспечением PKA-активированного липолиза.
12	↑	2.31	0.0174	<i>NR1P1</i>	21	Ядерный фактор RIP140	Модулирует транскрипционную активность стероидных рецепторов, таких, как NR3C1, NR3C2 и ESR1 в ядре. Может действовать как репрессор или активатор транскрипции в зависимости от транскрипционных факторов, с которыми взаимодействует [26].
13	↑	2.18	0.0407	<i>HILPDA (C7orf68)</i>	7	Индукцируемый гипоксией белок 2 (открытая рамка считывания 68, хромосома 7)	Ген кодирует индуцируемый гипоксией фактор 2, который способствует внутриклеточному накоплению липидов, стимулирует экспрессию цитокинов, включая IL-6, MIF и VEGFA, усиливает рост и пролиферацию клеток.
14	↑	2.18	0.0006	<i>SYDE1</i>	19	Белок, активирующий GTP-азу, гомолог 1	Белок семейства Rho GTP-аз, играющих важную роль в клеточной пролиферации, апоптозе, экспрессии генов и регуляции внутриклеточной динамики актина.
15	↑	2.06	0.0050	<i>CORO2A</i>	9	Коронин 2A	Относится к семейству актинсвязывающих белков, выполняющих важные функции, связанные с клеточной подвижностью, мембранным транспортом, трансдукцией межклеточных сигналов. Показано, что коронин 2A служит медиатором Toll-подобных рецепторов и принимает участие в воспалительном ответе [27].

\*Информация из базы данных GeneCards (<http://www.genecards.org/>) с дополнениями.



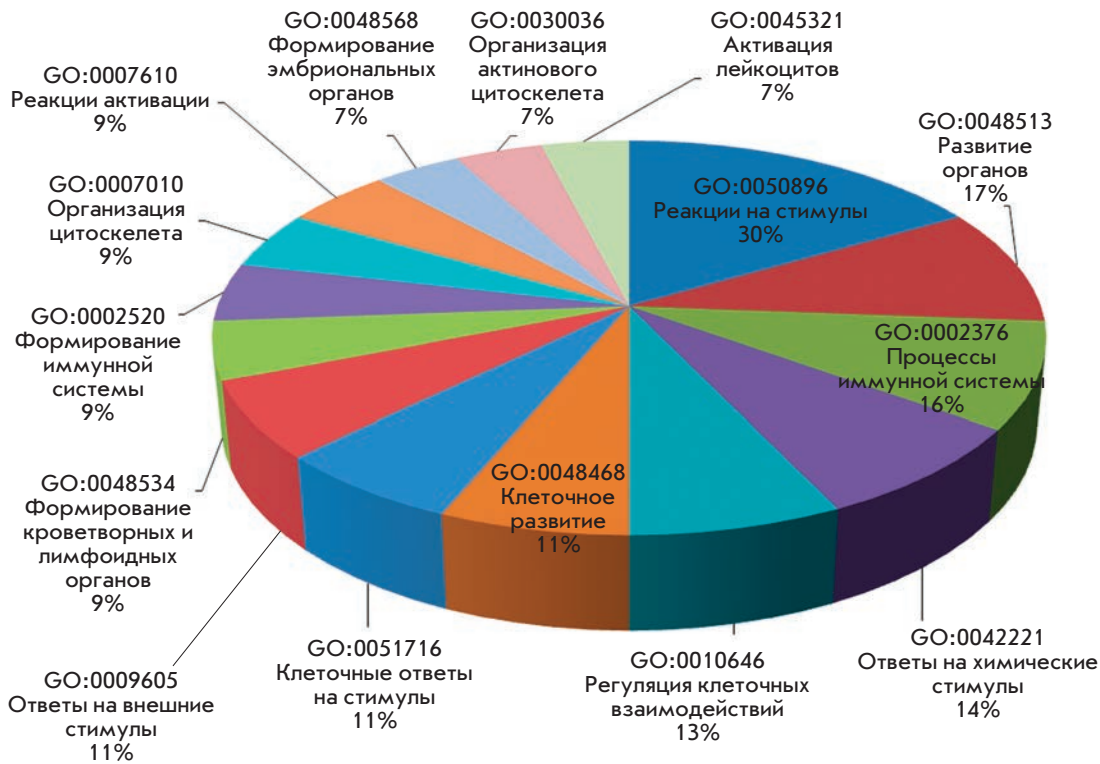
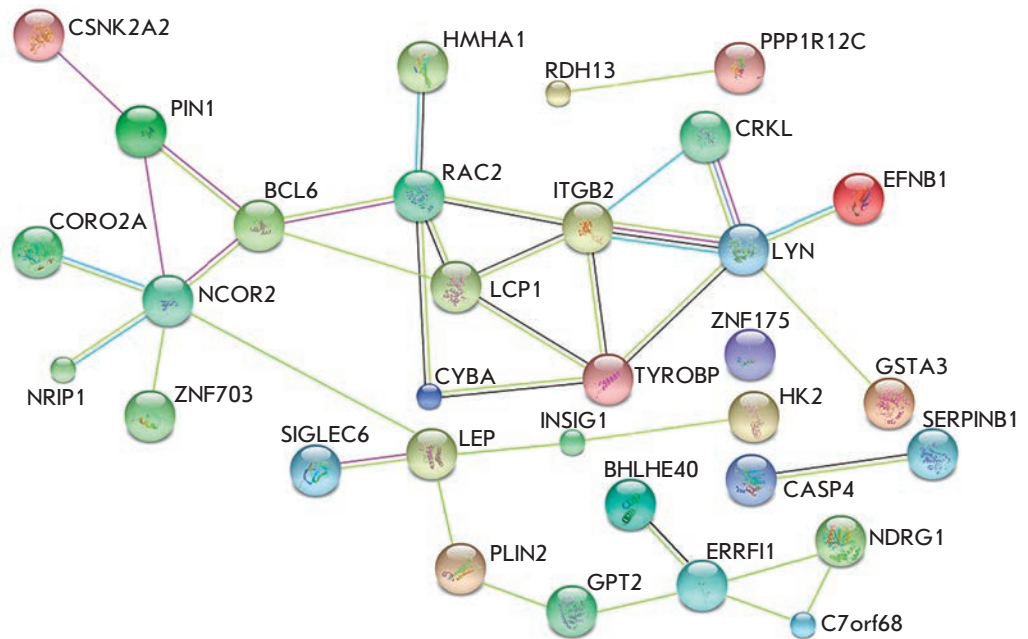


Рис. 3. Основные биологические процессы, в которые вовлечены ДЭГ, ассоциированные с преэклампсией ( $p < 0.05$ ). Процентное соотношение указывает долю идентифицированных ДЭГ, связанных с данным процессом

Рис. 4. Белок-белковые взаимодействия продуктов ДЭГ. Белки представлены на рисунке в виде кругов, цвет линии между которыми указывает на категорию доказательства белок-белковых взаимодействий: желтый – литературные данные («text mining»), черный – согласно анализу коэкспрессии генов, фиолетовый – результаты экспериментальных работ, голубой – свидетельства, полученные из баз данных, розовый – совокупные доказательства



тивности комплекса HSP70/HSC70 и *HSPA1A*, кодирующего высококонсервативный белок теплового шока 70 (HSP70).

Сравнительный анализ профилей экспрессии генов в ткани плаценты у женщин с умеренно выраженной формой ПЭ и в контрольной группе выявил 56 транскриптов 52 генов, уровни транскрипции ко-

торых статистически значимо различаются в этих выборках. Более выраженными были изменения профиля экспрессии при тяжелой форме ПЭ: обнаружено значительное повышение экспрессии 55 и снижение экспрессии 35 генов по сравнению с физиологической беременностью (рис. 5). Необходимо отметить, что наряду с небольшим количеством

Таблица 3. Список генов, дифференциально экспрессирующихся ( $FDR < 0.1$ ;  $FC \leq 1.5$ ) при умеренной и тяжелой формах преэклампсии

Ген	Изменение уровня экспрессии	FC	p-уровень FDR	Продукт гена
<i>HSPA1A</i>	↑	6.44	0.079549	Белок теплового шока 70, HSP70-1A
<i>BAG3</i>	↑	2.14	0.073131	Bcl-2-ассоциированный антагонист 3
<i>SNHG8</i>	↑	1.78	0.04105	Малая ядрышковая РНК 8
<i>LOC729660</i>	↓	2.63	0.010437	Нет данных
<i>LOC728457</i>	↓	2.43	0.010437	Нет данных
<i>APOC1</i>	↓	2.28	0.04433	Аполипопротеин C1
<i>LOC401357</i>	↓	2.27	0.010399	Нет данных
<i>LOC100128326</i>	↓	1.92	0.079549	Нет данных

Таблица 4. Основные биологические процессы, в которые вовлечены дифференциально экспрессирующиеся гены, характерные для тяжелой формы преэклампсии

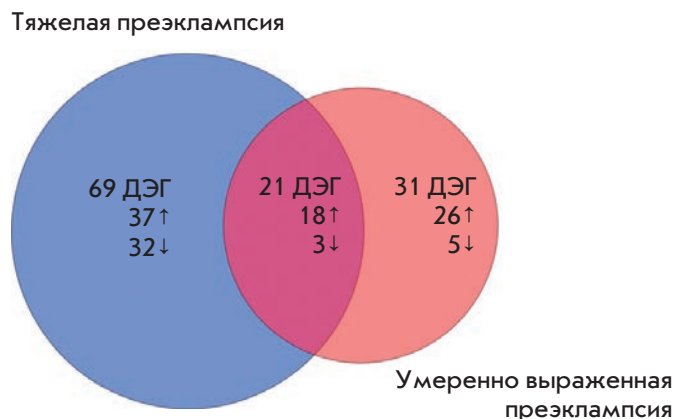
Категории биологических процессов	Ген	p*
Процессинг и представление пептидов или полисахаридных антигенов молекулами MHC класса II (GO:0002504)	<i>HLA-DPA1, CD74, HLA-DMA, HLA-DRA</i>	0.0421
Процессинг и презентация экзогенных пептидных антигенов (GO:0002478)	<i>HLA-DMA, CD74, HLA-DRA</i>	0.0453
Шаперон-опосредованный фолдинг белков (GO:0051085)	<i>ERO1L, HLA-DMA, CD74</i>	0.0467
Посттрансляционный фолдинг белков <i>de novo</i> (GO:0051084)	<i>ERO1L, HLA-DMA, CD74</i>	0.0478
Реакции с участием несвернутых белковых молекул (GO:0006986)	<i>ERO1L, HSPH1, HSPA1A, HERPUD1</i>	0.0489

\*Уровень значимости с поправкой на множественные сравнения Бенжамини–Хохберга, характеризующий правдивость отнесения данного набора генов к определенному биологическому процессу.

общих генов (21 ген), дифференциально экспрессирующихся как при тяжелой, так и при умеренной ПЭ, более 60 ДЭГ были специфичны только для тяжелой формы этой патологии. Результаты функциональной аннотации данных генов в WEB-ресурсе DAVID указывают на ряд биологических процессов, статистически значимо ассоциированных с развитием тяжелой формы ПЭ, таких, как процессинг и представление пептидных или полисахаридных антигенов и фолдинг белков (табл. 4). Анализ метаболических путей, в которые вовлечены эти гены, также свидетельствует о важной роли механизмов процессинга и презентации антигенов в молекулярном патогенезе тяжелой формы ПЭ (согласно базам данных KEGG и BIOCARТА).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Плацента – ключевой компонент в понимании физиологических процессов, связанных с беременностью. Характеристика генов, важных для функционирования плаценты, необходима для понимания механизмов, лежащих в основе нормальной и патологической гестации. Результаты настоящей работы свидетельствуют о принадлежности идентифицированных ДЭГ к ряду биологических процессов, связанных с иммунными реакциями, межклеточным взаимодействием и ответами на различные стимулы. Необходимо отметить, что анализ, проведенный с помощью модуля для кластеризации функциональных аннотаций («functional annotation clustering») биоинформатического ресурса DAVID, позволил выделить 16 класте-



**Рис. 5.** Диаграмма Венна, показывающая результаты определения профиля экспрессии генов при умеренно выраженной и тяжелой формах преэклампсии и при физиологической беременности. ДЭГ – гены, которые по-разному экспрессируются у женщин с преэклампсией и при физиологическом течении беременности (контрольная группа). Стрелка показывает повышение (↑) или снижение (↓) экспрессии генов

ров, однако только один из них имеет коэффициент обогащения («enrichment score») более 2. Этот кластер включает пять генов (*KRT19*, *RAC2*, *LIMCH1*, *BCL6*, *LCP1*), вовлеченных в биологические процессы, связанные с организацией актинового цитоскелета (GO:0030036; GO:0030029; GO:0007010). Изучение функциональной роли актинового цитоскелета представляет собой одно из актуальных направлений в изучении механизмов передачи сигнала в клетке. За последние несколько лет опубликованы многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие о включении актина в регуляцию экспрессии генов, опосредованную его участием в процессе элонгации транскрипции, сборке преинициаторного комплекса, созревании и экспорте мРНК, реорганизации хроматина и др. [28, 29]. Интересным в данном контексте представляется повышение уровня экспрессии гена *CORO2A*, продукт которого, коронин 2А, входит в семейство актинсвязывающих белков и опосредует *Coro2A*/актинзависимый механизм де-репрессии генов воспалительного ответа [27].

Нами не найдено ассоциации развития ПЭ с такими каноническими путями, как нарушение процессов апоптоза и ангиогенеза, описанной в ряде работ [16, 19, 30, 31]. Возможно, это связано с межэтнической вариабельностью профилей экспрессии генов в ткани плаценты, обусловленной популяционной дифференциацией регуляторных участков генома, либо с различными критериями (объем выборок, срок родов, степень тяжести заболевания и т.п.), использованны-

ми при формировании групп обследуемых. Другой фактор, влияющий, по-видимому, на возникновение этих противоречий, – различная плацентарная локализация биоптата, использованного в отдельных исследованиях транскриптома при ПЭ. Так, методом высокопроизводительного секвенирования (RNA-Seq) выявлены значительные различия в профилях экспрессии генов в амнионе, хорионе и децидуальной оболочке плаценты человека [32]. Ранее подобные результаты были получены при анализе на микроматрицах паттернов транскриптома в различных участках плаценты [33].

Несмотря на вышеописанные различия в результатах функциональной аннотации ДЭГ, интересным представляется тот факт, что изменение уровня экспрессии некоторых ДЭГ, идентифицированных в нашей работе, описано также в других исследованиях (табл. 5).

Так, значительное повышение экспрессии гена *LEP* при преэклампсии наблюдали практически во всех полногеномных исследованиях профилей экспрессии генов в плацентарной ткани. Лептин, продукт данного гена, является одним из новых сывороточных маркеров ПЭ. Известно, что лептин относится к адипоцитспецифическим цитокинам, регулирующим энергетический обмен и участвующим в различных метаболических и нейроэндокринных процессах [39]. По показателям веса и индексу массы тела обследованная нами группа пациенток с ПЭ не отличалась статистически значимо от контрольной группы, у них отсутствовала патологическая прибавка веса на протяжении беременности, в связи с чем можно предположить, что вклад лептина в развитие ПЭ определяется другими функциями этого белка. Известно, что плацентарный лептин принимает участие в обеспечении притока питательных веществ к фетоплацентарному комплексу и индуцирует пролиферацию трофобласта путем ингибирования апоптоза [40, 41]. Таким образом, увеличение уровня лептина в плаценте может быть компенсаторным механизмом, направленным против эндотелиальной дисфункции, наблюдаемой при ПЭ. В то же время показано, что лептин участвует в активации симпатoadrenalовой системы, которая способствует возникновению артериальной гипертензии, основного симптома ПЭ [42]. Кроме того, обнаружена важная иммуномодулирующая функция лептина, которая также может вносить вклад в развитие патологии беременности [43]. Несмотря на активное изучение экспрессии гена *LEP*, только отдельные работы посвящены анализу наследственной вариабельности этого гена и ее роли в изменении уровня транскрипции и структуре подверженности к патологии беременности. Показано, что у носителей генотипа AA локуса rs2167270

Таблица 5. Выявленные в настоящей работе дифференциально экспрессирующиеся гены, ассоциация которых с преэклампсией была показана ранее при изучении транскриптома плацентарной ткани

№	Ген	Продукт гена	FC	Уровень значимости	Этническая выборка	Ссылка
1	<i>LEP</i>	Лептин	10.94	< 0.0001*	Японцы	[30]
			8.58	0.036*	Китайцы	[34]
			40.11	$1.35 \times 10^{-9}$	Европеоиды	[16]
			5.52	0.0020	Европеоиды Афроамериканцы Монголоиды Испанцы	[18]
			108.9	< 0.0001	Европеоиды	[35]
			4.4	< 0.0001	Корейцы	[36]
			≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
			11.79	< 0.01*	Жители США	[38]
2	<i>BCL6</i>	Транскрипционный фактор – белок цинковых пальцев 51	1.78	0.0154	Европеоиды Афроамериканцы Монголоиды Испанцы	[18]
			2.02	0.0024	Японцы	[30]
			2.24	$3.58 \times 10^{-5}$	Европеоиды	[16]
			2.60	< 0.01*	Жители США	[38]
			≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
3	<i>SIGLEC6</i>	Иммуноглобулинподобный лектин 6, связывающий сиаловую кислоту		0.02*	Жители США	[31]
			2.13	0.001	Европеоиды	[16]
			2.73	< 0.01*	Жители США	[38]
			≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
			4.5	0.019	Европеоиды	[35]
4	<i>RDH13</i>	Ретинолдегидрогеназа 13	-	$3.86 \times 10^{-8**}$	Жители США	[31]
			1.91	< 0.01*	Жители США	[38]
			≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
5	<i>NDRG1</i>	Цитоплазматический белок суперсемейства гидролаз	2.02	0.0001	Японцы	[30]
			2.67	$1.12 \times 10^{-5}$	Европеоиды	[16]
6	<i>BHLHE40</i>	Транскрипционный фактор с доменом спираль-петля-спираль	1.95	0.0004	Японцы	[30]
			3.08	$2.18 \times 10^{-5}$	Европеоиды	[16]
7	<i>KRT19</i>	Кератин 19	1.75	0.0071	Японцы	[30]
			2.28	$1.59 \times 10^{-5}$	Европеоиды	[16]
8	<i>GPT2</i>	Аланинаминотрансфераза 2	2.45	$3.70 \times 10^{-5}$	Европеоиды	[16]
9	<i>PPP1R12C</i>	Регуляторная субъединица 12А фосфатазы 1	-	$2.16 \times 10^{-8**}$	Жители США	[31]
10	<i>CEBPA</i>	ССААТ/энхансерсвязывающий белок α	-	$2.52 \times 10^{-8**}$	Жители США	[31]
11	<i>HK2</i>	Гексокиназа типа 2	3.90	$3.87 \times 10^{-6}$	Европеоиды	[16]
12	<i>HMHA1</i>	Минорный антиген гистосовместимости HA1	-	$1.23 \times 10^{-8**}$	Жители США	[31]
13	<i>PVRL4</i>	Нектин 4	2.54	$3.62 \times 10^{-5}$	Европеоиды	[16]
14	<i>SASH1</i>	SAM- и SH3-доменсодержащий белок 1	2.54	$1.22 \times 10^{-7}$	Европеоиды	[16]
15	<i>SH3PXD2A</i>	SH3- и PX-доменсодержащий белок 2A	≥ 1.5	< 0.05	Китайцы	[37]
16	<i>SYDE1</i>	Белок, активирующий GTP-азу, гомолог 1	1.55	< 0.01*	Жители США	[38]

\*Уровень значимости, рассчитанный с поправкой на множественные сравнения.



(G19A), расположенного в области промотора гена *LEP*, повышен уровень экспрессии этого гена в крови, а также риск развития ПЭ и артериальной гипертензии [44]. В чешской популяции обнаружена ассоциация другого полиморфизма – G2548A, локализованного в промоторе гена *LEP*, с гестационным диабетом [45]. Наряду с этим, в ряде работ [37, 46, 47] выявлено значимое гипометилирование данного локуса, а также нарушение регуляции эпигенома плацентарной ткани при развитии ПЭ.

Особый интерес в контексте роли эпигенетической дисрегуляции в формировании данной патологии представляет наблюдаемое в нашей работе повышение экспрессии гена длиной некодирующей РНК 284 в плацентарной ткани пациенток с ПЭ. Недавно показано, что длинные нкРНК выполняют в клетках жизненно важные регуляторные функции. В частности, предполагается, что они могут функционировать в качестве модульного скаффолда при специфичной высокоупорядоченной организации рибонуклеопротеидных комплексов и индукции эпигенетических изменений этих локусов. Некоторые из длинных нкРНК могут связывать хроматин при помощи ремоделирующих ферментов, а затем принимать участие в модификации локального хроматина, например при метилировании ДНК, иницируя или репрессируя транскрипцию. РНК данного класса могут включаться в связывание транскрипционных факторов и ингибирование экспрессии генов [48].

Интересной представляется ассоциация гиперэкспрессии генов *BAG3* и *HSPA1A* с развитием тяжелой формы ПЭ. Известно, что белковый продукт гена *BAG3* конкурирует с кошапероном Hsp за связывание с АТФ-азным доменом комплекса HSP70/HSC70 и таким образом ингибирует шаперонную активность белка теплового шока 70 (Hsp70) – продукта гена *HSPA1A*, экспрессия которого существенно повышена при тяжелой форме ПЭ (более чем в 6 раз по сравнению с умеренно выраженной ПЭ и в 8 раз по сравнению с контрольной выборкой). Известно, что Hsp70 выполняет различные функции, основные из которых – повышение устойчивости аппарата биосинтеза белка к повреждающим воздействиям и шаперонная активность. Кроме того, получены данные об участии Hsp70 в транспорте белков, проведении внутриклеточного сигнала и протеасомозависимой деградации [49]. Необходимо отметить, что по результатам функциональной аннотации ДЭГ основными процессами, характерными для развития тяжелой формы ПЭ являются процессинг и представление пептидных и полисахаридных антигенов и шаперон-опосредованный фолдинг белков. Поскольку белок теплового шока Hsp70 способен образовывать комплексы с нефолдированными белками и широким спектром пептидных

фрагментов, предшественников антигенных пептидов, представленных на клеточной мембране в составе молекул МНС классов I и II [50], логично предположить, что ключевую роль в патогенезе тяжелой ПЭ играют механизмы иммунологического контроля инвазии трофобласта в стенку матки и факторы иммунологической толерантности в системе мать–плод, патологическое действие которых, как известно, может приводить к осложненному течению беременности. Кроме того, многие белки теплового шока обладают иммунорегуляторной активностью, стимулируют созревание дендритных клеток и являются индукторами некоторых провоспалительных цитокинов [51]. Эти свойства белков также могут вносить свой вклад в механизмы тяжелой ПЭ.

Обнаруженное в настоящей работе статистически значимое снижение экспрессии гена *APOC1* при тяжелой форме ПЭ, вероятно, связано с развитием окислительного стресса в сосудах плаценты либо с недавно открытыми иммуносупрессорными свойствами аполипопротеина С1, кодируемого данным геном [52]. Ранее было показано, что в сыворотке крови пациенток с преэклампсией повышена концентрация триглицерид-богатых липопротеинов, которые могут способствовать развитию эндотелиальной дисфункции [53, 54]. В то же время содержание аполипопротеинов Е и А1 в крови снижено при развитии данной патологии [55, 56]. Кроме того, показана протективная роль аллеля  $\epsilon 2$  гена *APOE* в популяции курдов, связанная, по мнению авторов работы [57], с высокими антиоксидантными свойствами этого аллеля. Нами не найдены сведения об ассоциации полиморфных вариантов гена *APOC1* с осложненным течением беременности, однако, показано, что инсерционно-делеционный полиморфизм в положении –317 промоторной области данного гена (rs11568822) связан с болезнью Альцгеймера, а маркер rs4803770 – с ишемической болезнью сердца [58, 59]. Поскольку ген *APOC1* расположен в одном кластере с геном *APOE*, предполагается, что эти ассоциации обусловлены сильным неравновесием по сцеплению между данными генами [60]. Тем не менее нами не найдено статистически значимых изменений уровня экспрессии гена *APOE*, поэтому логично рассматривать ген *APOC1* в качестве «самостоятельного» нового ген-кандидата ПЭ. Однако это предположение нуждается в подтверждении.

Таким образом, в настоящей работе получены данные, косвенно подтверждающие иммунологическую гипотезу развития тяжелой формы ПЭ, которая постулирует ключевую роль иммунокомпетентных клеток (В-лимфоцитов, моноцитов, дендритных и НК-клеток) в патофизиологии этого заболевания. В рамках этой теории предполагается, что пусковым

механизмом в этиопатогенезе ПЭ является недостаточная инвазия трофобласта в материнские спиральные артерии, связанная со сниженной экспрессией антигенов HLA и «агрессией» со стороны НК-клеток. В результате снижается плацентарная перфузия и возникает гипоксия на границе мать/плод, которая, в свою очередь, инициирует запуск провоспалительных цитокинов, что приводит к эндотелиальной дисфункции [61]. В-клетки также могут вносить свой вклад в развитие преэклампсии, продуцируя аутоантитела против адренорецепторов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа – первое в России полномасштабное исследование дифференциальной экспрессии генов в тканях плаценты при физиологическом и осложненном течении беременности. Полученные результаты свидетельствуют о некоторых процессах, которые могут играть важную роль в молекулярном патогенезе ПЭ: реакции, связанные с иммунным ответом, организацией цитоскелета, межклеточным взаимодействием, ответами на различные стимулы и шаперон-опосредованным фолдингом белков. Интеграция результатов функциональной аннотации ДЭГ, анализа сетевых взаимодействий белков, кодируемых этими генами, и изучения транскриптома плацентарной ткани позволяют выделить ряд новых генов, потенциально связанных с ПЭ: *LEP*, *SIGLEC6*, *VHLHE40*, *BCL6*, *RDH13*, *HSPH1*, *HSPA1A*, *BAG3*, *KRT19*, *RAC2*, *LIMCH1*, *BCL6* и *LCP1*.

Также в нашей работе получены данные, указывающие на значительную роль в развитии тяжелой

формы ПЭ окислительного стресса, индуцирующего повышение экспрессии генов белков теплового шока *Hsp70* и *Hsp105*, вовлеченных в молекулярные механизмы, связанные с нарушением иммунологической толерантности и запуском провоспалительного каскада. В то же время наблюдаемое повышение экспрессии гена *BAG3*, вероятно, связано с компенсаторными механизмами либо с антиапоптотическими свойствами белка, кодируемого данным локусом. Это предположение подтверждается статистически значимым повышением экспрессии белков теплового шока *Hsp70* и *Hsp90*, фактора теплового шока 1 (*HSF1*) и антиапоптотического фактора *Bcl-2* в эндотелиальных клетках плаценты пациенток с преэклампсией по сравнению с женщинами с нормотензивной беременностью [62]. Кроме того, значимость индуцируемых стрессом белков, в том числе и *Hsp70*, в патогенезе ПЭ показана при анализе протеома плацентарной ткани женщин с физиологической и осложненной беременностью [63].

Результаты представленной работы могут быть полезны для понимания молекулярных механизмов ПЭ, поиска новых генов-кандидатов и биомаркеров данной патологии, а также дают информацию для разработки таргетной терапии этого заболевания. ●

*Работа поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (соглашение № 8118) и РФФИ (грант № 14-04-01467).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Marigorta U.M., Navarro A. // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 6. P. e1003566.
- Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J., Goldstein D.B., Hindorf L.A., Hunter D.J., McCarthy M.I., Ramos E.M., Cardon L.R., Chakravarti A., et al. // Nature. 2009. V. 461. № 7265. P. 747–753.
- Saccone S.F., Rice J.P., Saccone N.L. // Genet Epidemiol. 2006. V. 30. № 6. P. 459–470.
- Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. // Nat. Methods. 2010. V. 7. № 4. P. 248–249.
- Nicolae D.L., Gamazon E., Zhang W., Duan S., Dolan M.E., Cox N.J. // PLoS Genet. 2010. V. 6. № 4. P. e1000888.
- Zhong H., Yang X., Kaplan L.M., Molony C., Schadt E.E. // Am. J. Hum. Genet. 2010. V. 86. № 4. P. 581–591.
- Макаров О.В., Волкова Е.В., Джохадзе Л.С. // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2012. № 1. С. 35–42.
- Айламазян Э.К., Мозговая Е.В. Гестоз: теория и практика. М.: МЕДпресс-информ, 2008. 272 с.
- George E.M., Granger J.P. // Expert Rev. Obstet. Gynecol. 2010. V. 5. № 5. P. 557–566.
- Naljayan M.V., Karumanchi S.A. // Adv. Chronic. Kidney Dis. 2013. V. 20. № 3. P. 265–270.
- Проект «Мать и Дитя». Гипертензия во время беременности. Преэклампсия. Эклампсия. Клинический протокол. М.: ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России, Институт здоровья семьи, 2012. 51 с.
- Smyth G.K. // Stat. Appl. Genet. Mol. Biol. 2004. V. 3. № 1. P. 1544–6115.
- Ritchie M.E., Diyagama D., Neilson J., van Laar R., Dobrovic A., Holloway A., Smyth G.K. // BMC Bioinformatics. 2006. V. 7. P. e261.
- Huang da W., Sherman B.T., Tan Q., Kir J., Liu D., Bryant D., Guo Y., Stephens R., Baseler M.W., Lane H.C., Lempicki R.A. // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. P. 169–175.
- Szklarczyk D., Franceschini A., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Minguez P., Doerks T., Stark M., Muller J., Bork P., et al. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. 561–568.
- Sitras V., Paulssen R.H., Grønaas H., Leirvik J., Hanssen T.A., Vårtun A., Acharya G. // Placenta. 2009. V. 30. № 5. P. 424–433.
- Nishizawa H., Pryor-Koishi K., Kato T., Kowa H., Kurahashi H., Udagawa Y. // Placenta. 2007. V. 28. № 5. P. 487–497.

18. Enquobahrie D.A., Meller M., Rice K., Psaty B.M., Siscovick D.S., Williams M.A. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. V. 199. № 5. P. e1–11.
19. Founds S.A., Dorman J.S., Conley Y.P. // *J. Obstet. Gynecol. Neonatal. Nurs.* 2008. V. 37. № 2. P. 146–157.
20. Winn V.D., Gormley M., Paquet A.C., Kjaer-Sorensen K., Kramer A., Rumer K.K., Haimov-Kochman R., Yeh R.F., Overgaard M.T., Varki A., et al. // *Endocrinology.* 2009. V. 150. № 1. P. 452–462.
21. Lapaire O., Grill S., Lalevee S., Kolla V., Hösl I., Hahn S. // *Fetal Diagn. Ther.* 2012. V. 31. № 3. P. 147–153.
22. Rogue A., Lambert C., Spire C., Claude N., Guillouzo A. // *Drug Metab. Dispos.* 2012. V. 40. № 1. P. 151–158.
23. Hulse A.M., Cai J.J. // *Genetics.* 2013. V. 193. № 1. P. 95–108.
24. Benita Y., Kikuchi H., Smith A.D., Zhang M.Q., Chung D.C., Xavier R.J. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 14. P. 4587–4602.
25. Lam K.K., Chiu P.C., Lee C.L., Pang R.T., Leung C.O., Koistinen H., Seppala M., Ho P.C., Yeung W.S. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 43. P. 37118–37127.
26. Nichol D., Christian M., Steel J.H., White R., Parker M.G. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 43. P. 32140–32147.
27. Huang W., Ghisletti S., Saijo K., Gandhi M., Aouadi M., Tesz G.J., Zhang D.X., Yao J., Czech M.P., Goode B.L., et al. // *Nature.* 2011. V. 470. № 7334. P. 414–418.
28. Gettemans J., van Impe K., Delanote V., Hubert T., Vandekerckhove J., De Corte V. // *Traffic.* 2005. V. 6. № 10. P. 847–857.
29. Percipalle P. // *Nucleus.* 2013. V. 4. № 1. P. 43–52.
30. Nishizawa H., Ota S., Suzuki M., Kato T., Sekiya T., Kurahashi H., Udagawa Y. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011. V. 2. № 9. P. 107.
31. Tsai S., Hardison N.E., James A.H., Motsinger-Reif A.A., Bischoff S.R., Thames B.H., Piedrahita J.A. // *Placenta.* 2011. V. 32. № 2. P. 175–182.
32. Kim J., Zhao K., Jiang P., Lu Z.X., Wang J., Murray J.C., Xing Y. // *BMC Genomics.* 2012. V. 27. № 13. P. 115.
33. Sood R., Zehnder J.L., Druzin M.L., Brown P.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 14. P. 5478–5483.
34. Meng T., Chen H., Sun M., Wang H., Zhao G., Wang X. // *OMICS.* 2012. V. 16. № 6. P. 301–311.
35. Várkonyi T., Nagy B., Füle T., Tarca A.L., Karázi K., Schönleber J., Hupuczi P., Mihalik N., Kovalszky I., Rigó J. Jr., et al. // *Placenta.* 2011. V. 32. Suppl. S21. P. 9.
36. Lee G.S., Joe Y.S., Kim S.J., Shin J.C. // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2010. V. 282. № 4. P. 363–369.
37. Xiang Y., Cheng Y., Li X., Li Q., Xu J., Zhang J., Liu Y., Xing Q., Wang L., He L., Zhao X. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 3. P. e59753.
38. Winn V.D., Gormley M., Fisher S.J. // *Pregnancy Hypertens.* 2011. V. 1. № 1. P. 100–108.
39. Denver R.J., Bonett R.M., Boorse G.C. // *Neuroendocrinology.* 2011. V. 94. № 1. P. 21–38.
40. Domali E., Messinis I.E. // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2002. V. 12. № 4. P. 222–230.
41. Laivuori H. // *Front. Biosci.* 2007. V. 12. P. 2372–2382.
42. Aizawa-Abe M. // *J. Clin. Invest.* 2000. V. 105. P. 1243–1252.
43. Fairfax B.P., Vannberg F.O., Radhakrishnan J. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 4. P. 720–730.
44. Sugathadasa B.H., Tennekoon K.H., Karunanayake E.H. // *Hypertens. Pregnancy.* 2010. V. 29. P. 366–374.
45. Vasku J., Dostalova Z., Kankova K. // *J. Obstet. Gynecol.* 2008. V. 34. № 5. P. 858–864.
46. Jia R.Z., Zhang X., Hu P., Liu X.M., Hua X.D., Wang X., Ding H.J. // *Int. J. Mol. Med.* 2012. V. 30. № 1. P. 133–141.
47. Hogg K., Blair J.D., von Dadelszen P., Robinson W.P. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013. V. 367. № 1. P. 64–73.
48. Rinn J.L., Chang H.Y. // *Annu. Rev. Biochem.* 2012. V. 81. P. 145–166.
49. Евдоин А.Л., Медведева Н.Д. // *Цитология.* 2009. Т. 51. № 2. С. 130–137.
50. Черников В.А., Гороховец Н.В., Савватеева Л.В., Северин С.Е. // *Биомед. химия.* 2012. Т. 58. № 6. С. 651–661.
51. Abdulsid A., Hanretty K., Lyall F. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 1. P. e54540.
52. Cudaback E., Li X., Yang Y., Yoo T., Montine K.S., Craft S., Montine T.J., Keene C.D. // *J. Neuroinflammation.* 2012. V. 10. № 9. P. 192.
53. Cekmen M.B., Erbagci A.B., Balat A., Duman C., Maral H., Ergen K., Ozden M., Balat O., Kuskay S. // *Clin. Biochem.* 2003. V. 36. № 7. P. 575–578.
54. Bayhan G., Koçyigit Y., Atamer A., Atamer Y., Akkus Z. // *Gynecol. Endocrinol.* 2005. V. 21. № 1. P. 1–6.
55. Koçyigit Y., Atamer Y., Atamer A., Tuzcu A., Akkus Z. // *Gynecol. Endocrinol.* 2004. V. 19. № 5. P. 267–273.
56. Catarino C., Rebelo I., Belo L., Rocha-Pereira P., Rocha S., Castro E.B., Patrício B., Quintanilha A., Santos-Silva A. // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2008. V. 87. № 6. P. 628–634.
57. Ahmadi R., Rahimi Z., Vaisi-Raygani A., Kiani A., Jalilian N., Rahimi Z. // *Hypertens. Pregnancy.* 2012. V. 31. № 4. P. 405–418.
58. Drigalenko E., Poduslo S., Elston R. // *Neurology.* 1998. V. 51. P. 131–135.
59. Ken-Dror G., Talmud P.J., Humphries S.E., Drenos F. // *Mol. Med.* 2010. V. 16. № 9. P. 389–399.
60. Lucatelli J.F., Barros A.C., Silva V.K., Machado Fda S., Constantin P.C., Dias A.A., Hutz M.H., de Andrade F.M. // *Neurochem. Res.* 2011. V. 36. № 8. P. 1533–1539.
61. Laresgoiti-Servitje E. // *J. Leukoc. Biol.* 2013. V. 94. № 2. P. 247–257.
62. Padmini E., Venkatraman U., Srinivasan L. // *Toxicol. Mech. Methods.* 2012. V. 22. № 5. P. 367–374.
63. Gharesi-Fard B., Zolghadri J., Kamali-Sarvestani E. // *Placenta.* 2010. V. 31. № 2. P. 121–125.

УДК 577.29

# Липид-белковые нанодиски: новые возможности для структурно-функциональных исследований водорастворимых мембраноактивных пептидов

З. О. Шенкарев<sup>1\*</sup>, Е. Н. Люкманова<sup>1</sup>, А. С. Парамонов<sup>1</sup>, П. В. Пантелеев<sup>1</sup>, С. В. Баладин<sup>1</sup>, М. А. Шулепко<sup>1,2</sup>, К. С. Минеев<sup>1</sup>, Т. В. Овчинникова<sup>1,3</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,2</sup>, А. С. Арсеньев<sup>1,3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет), 141700, Долгопрудный Московской обл., Институтский пер., 9

\*E-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.10.2013

После доработки 19.03.2014

**РЕФЕРАТ** Липид-белковые нанодиски (ЛБН) представляют собой наноразмерные частицы, содержащие фрагмент бислоевой липидной мембраны, стабилизированный в растворе молекулами аполипопротеина или специальным белком MSP. В представленной работе изучена возможность применения мембраномоделирующих сред на основе ЛБН для исследования водорастворимых пептидов, обладающих сродством к липидным мембранам. Показано, что порообразующий антимикробный пептид ареницин-2 из морского пескожила (заряд +6) вызывает разрушение ЛБН, содержащих как цвиттер-ионные молекулы фосфатидилхолина (PC), так и анионные молекулы фосфатидилглицерина (PG). Напротив, токсин паука VSTx1 (заряд +3), блокирующий потенциал-зависимую активацию K<sup>+</sup>-каналов, эффективно взаимодействует с ЛБН, содержащими анионные липиды (POPC/DOPG, 3 : 1), не вызывая их разрушения. VSTx1 имеет меньшее сродство к ЛБН, содержащим цвиттер-ионные липиды (POPC), и слабо взаимодействует с белковой компонентой нанодисков – MSP (заряд -6). Нейротоксин II из яда кобры (NTII, заряд +4), ингибитор никотинового ацетилхолинового рецептора, имеет сравнительно небольшое сродство к ЛБН, содержащим анионные липиды (POPC/DOPG, 3 : 1 и POPC/DOPS, 4 : 1), и не связывается с ЛБН/POPC. Показано, что NTII взаимодействует с поверхностью ЛБН/POPC/DOPS в нескольких ориентациях, и обменные процессы между комплексами с различной топологией идут быстро по шкале ЯМР. Только одна из возможных ориентаций NTII допускает описанное ранее специфическое взаимодействие с полярной головкой фосфатидилсерина из мембранного окружения рецептора. Показано, что ЛБН могут применяться в структурно-функциональных исследованиях водорастворимых мембраноактивных нейротоксинов, а также для изучения механизма взаимодействия пептидных молекул с липидной мембраной.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антимикробные пептиды, липид-белковые нанодиски, липопротеиновые частицы высокой плотности, мембраноактивные пептиды, мембраномоделирующие среды, нейротоксины, ЯМР-спектроскопия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 5-DSA – 5-доксилстеариновая кислота; Ar2 – ареницин-2 из морского пескожила *Arenicola marina*; DLPC – дилауроилфосфатидилхолин; DLPG – дилауроилфосфатидилглицерин; DOPG – диолеоилфосфатидилглицерин; DOPS – диолеоилфосфатидилсерин; MSP – фрагмент 44–243 аполипопротеина A1 человека (membrane scaffold protein); NTII – нейротоксин II из яда кобры *Naja oxiana*; POPC – пальмитоилолеоилфосфатидилхолин; POPE – пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин; POPG – пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин; R<sub>n</sub> – гидродинамический радиус частицы, радиус Стокса; TROSY – transverse relaxation-optimized spectroscopy; TRX – тиоредоксин из *Escherichia coli*; VSTx1 –



«вольт-сенсорный» токсин из яда паука *Grammostola spatulata*; АМП – антимикробный мембраноактивный пептид; ЛБН – липид-белковый нанодиск; МП – мембраноактивный пептид;  $\eta_{xy}$  – скорость процесса кросс-корреляции между диполь-дипольной релаксацией и релаксацией, возникающей благодаря анизотропии химического сдвига ядра  $^{15}\text{N}$ ;  $\tau_r$  – эффективное время корреляции вращательных движений.

## ВВЕДЕНИЕ

Мембраноактивные пептиды (МП) представляют собой класс биомолекул, играющих важную роль в существовании отдельных организмов и их сообществ. Например, антимикробные мембраноактивные пептиды (АМП), селективно действующие на мембраны различных клеток, – одни из основных эффекторов в системе «врожденного иммунитета» – древнейшей защитной системе эукариотических организмов [1]. Некоторые пептидные медиаторы нервной и эндокринной систем организма и ряд токсинов животного происхождения, нацеленных на рецепторы клеточной мембраны, также обладают мембранной активностью и действуют в несколько этапов, изначально связываясь с мембраной, окружающей рецептор, и только потом образуя лиганд-рецепторный комплекс [2, 3]. В этом случае реализуются механизмы так называемого «мембранного катализа», которые значительно увеличивают эффективность взаимодействия лиганд-рецептор [3].

Сложность исследования мембраноактивных пептидов связана с особенностями их пространственной организации. Из-за гидрофобных свойств и большой конформационной подвижности многие МП формируют «активную» пространственную структуру только в присутствии биологической мембраны или подходящей мембраномоделирующей среды (мембранного миметика). Эти факторы значительно затрудняют кристаллизацию МП и обуславливают необходимость использования альтернативных методов исследования. Одним из таких методов является ЯМР-спектроскопия высокого разрешения, которая позволяет изучать пространственную структуру и внутримолекулярную динамику МП в растворе мембраномоделирующих сред [4, 5]. Традиционно используемые мембранные миметики имеют ряд недостатков, которые ограничивают их применение для изучения специфических взаимодействий пептид-мембрана. Так, большая кривизна поверхности и рыхлая упаковка сред на основе детергентов (в форме мицелл или небольших смешанных бицелл с липидами) может приводить к значительным искажениям структуры пептида [6] и к появлению неспецифических взаимодействий пептид-детергент. В то же время среды, содержащие реальные бислоиные мембраны в виде липидных везикул или липид/детергентных бицелл, обладают слишком большими размерами и не мо-

гут напрямую использоваться для структурно-динамических исследований МП методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [4, 7].

Липид-белковые нанодиски (ЛБН), или реконструированные незрелые липопротеиновые частицы высокой плотности, представляют собой наноразмерные дискоидные частицы (обычно  $10 \times 4$  нм), содержащие фрагмент бислоиной липидной мембраны (~150 молекул липида), гидрофобная часть которого экранирована от растворителя двумя молекулами аполипротеина или его синтетического аналога MSP (membrane scaffold protein) [8]. В отличие от традиционно используемых мембранных миметиков, фрагмент липидной мембраны в составе липид-белкового нанодиска обладает повышенной стабильностью и сохраняет многие биофизические свойства, присущие настоящим мембранным системам, например фазовый переход из жидкокристаллического в гелевое состояние [9]. Недавно в ряде работ было показано, что ЛБН могут выступать в качестве альтернативной мембраномоделирующей среды для структурно-функциональных исследований мембранных белков и гидрофобных (слаборастворимых) МП [10–16], в том числе методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [12–15]. Использование ЛБН, содержащих различные липиды и их смеси, позволяет изучать различные аспекты функционирования мембранных белков и МП [15, 16].

Вопрос о применимости мембраномоделирующих сред на основе ЛБН в структурных и биофизических исследованиях водорастворимых МП ранее не изучали. Следует отметить, что это не тривиальный вопрос, так как ЛБН, в отличие от везикул, бицелл и мицелл, содержат дополнительную компоненту – MSP, которая является анионным белком (заряд –6). В данной работе взаимодействие водорастворимых МП с ЛБН изучали на примере трех модельных катионных  $\beta$ -структурных пептидов (рис. 1), которые имеют различные физико-химические свойства и представляют три класса мембраноактивных соединений. Антимикробный пептид ареницин-2 (Ar2, 21 а.о., 2772 Да, заряд +6, средний индекс гидрофобности по шкале Kyte и Doolittle [17]  $-0.06^1$ ) из целомоцитов морского многощетинкового червя *Arenicola marina* селективно

<sup>1</sup> Максимальное и минимальное значения индекса гидрофобности по шкале Kyte и Doolittle [17] равны +4.5 и –4.5 для poly-Ile- и poly-Arg-последовательностей соответственно.

взаимодействует с мембранами, содержащими отрицательно заряженные липидные молекулы, и образует в них олигомерные поры [18]. Токсин VSTx1 (34 а.о., 4010 Да, заряд +3, индекс гидрофобности -0.27) из яда паука *Grammostola spatulata* использует механизм «мембранного катализа» для взаимодействия с потенциал-чувствительными доменами K<sup>+</sup>-каналов, локализованными в клеточной мембране, и при этом не обладает способностью к порообразованию [3]. Нейротоксин II (NTII, 61 а.о., 6885 Да, заряд +4, индекс гидрофобности -1.10) из яда кобры *Naja oxiana* блокирует активацию никотинового ацетилхолинового рецептора, связываясь с его внеклеточным доменом, но, возможно, также использует механизм «мембранного катализа», взаимодействуя с полярными головками фосфатидилсерина (PS) из мембранного окружения рецептора [19]. Выбранные в качестве объектов исследования пептиды растворимы в воде в миллимолярных концентрациях, однако, они значительно отличаются друг от друга по своим гидрофобным/гидрофильным свойствам. Так, несмотря на большой положительный заряд, Ar2 является наиболее гидрофобным из исследуемых пептидов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реконструкция и очистка ЛБН

В качестве белка MSP в работе использовали рекомбинантный фрагмент 44–243 аполипопротеина A1 человека, содержащий на N-конце последовательность из шести остатков His. Очищенный белок MSP, полученный как описано в [20], смешивали в молярном соотношении 1 : 75 с липидами в присутствии детергента холата натрия (молярное соотношение холат/липиды 2 : 1) и инкубировали смесь в течение 3 ч при 4 °С. При использовании насыщенных липидов (DLPC, DLPG) температуру реакции поддерживали не ниже 25 °С. Самопроизвольную сборку ЛБН инициировали путем сорбции детергента на смолу Bio-Beads™ (Bio-Rad, США) в течение 1.5 ч. Очистку нанодисков производили на металлоаффинной смоле Ni<sup>2+</sup> Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, США), уравновешенной буфером А (20 мМ Трис-НСl, 0.5 М NaCl, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, рН 8.0). После нанесения реакционной смеси смолу промывали пятикратным объемом буфера А. Элюцию ЛБН проводили буфером А, содержащим 100 мМ имидазола. Концентрацию MSP определяли спектрофотометрически по поглощению

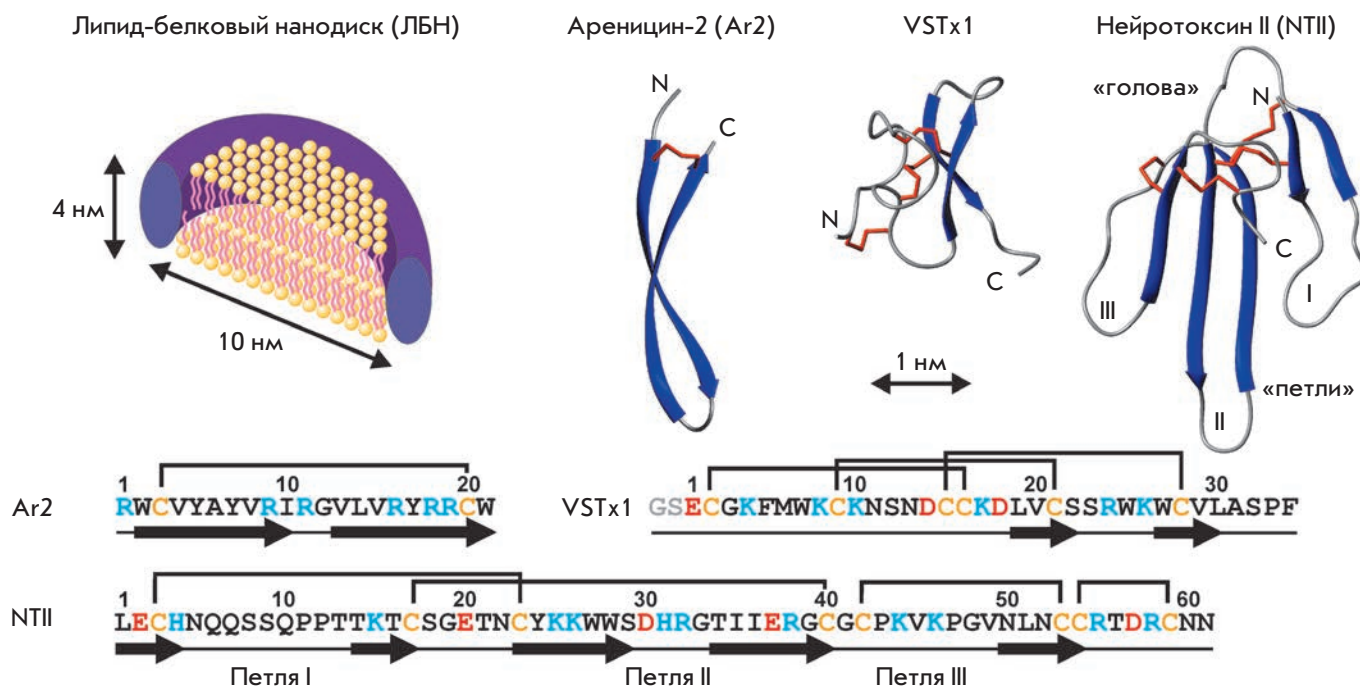


Рис. 1. Схема строения липид-белкового нанодиска и аминокислотные последовательности и пространственные структуры ареницина-2, VSTx1 и NTII (PDB-коды 2JN1, 1S6X и 1NOR соответственно). Две молекулы MSP, экранирующие фрагмент фосфолипидной мембраны нанодиска от растворителя, показаны в виде тора. На последовательностях пептидов цветом показаны заряженные остатки и остатки Cys. В работе использовали рекомбинантный аналог VSTx1, дополнительно содержащий остатки Gly-Ser на N-конце (показаны серым цветом)

нию при  $\lambda = 280$  нм. Концентрацию ЛБН определяли, предполагая, что каждый нанодиск содержит две молекулы MSP.

### Гель-фильтрация

Гель-фильтрацию с разделением частиц по размеру проводили на смоле Superdex-200, на колонке Tricorn 5/200 (GE Healthcare, Швеция) в буфере (10 мМ Трис-НСl, 0.1 М NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4). В качестве калибровочных белков использовали тироглобулин (669 кДа, радиус Стокса  $R_H = 8.5$  нм), ферритин (440 кДа,  $R_H = 6.1$  нм), каталазу (232 кДа,  $R_H = 5.22$  нм), альдолазу (158 кДа,  $R_H = 4.81$  нм), БСА (67 кДа,  $R_H = 3.55$  нм), овальбумин (43 кДа,  $R_H = 3.05$  нм). Скорость потока через колонку – 0.3 мл/мин, детектирование производили на длине волны 280 нм. Размер частиц определяли по калибровочной кривой зависимости объема элюции от  $\lg R_H$ . Все приведенные ниже значения размера (диаметра) частиц соответствуют удвоенным значениям  $R_H$ .

### Получение рекомбинантного аналога Ar2

Рекомбинантный аналог ареницина-2, по аминокислотной последовательности полностью соответствующий природному пептиду, получен согласно протоколам [18, 21].

### Продукция и очистка VSTx1

В работе использовали стандартные генно-инженерные методики. Ген *VSTx1* получен с помощью ПЦР с шестью перекрывающимися синтетическими олигонуклеотидами (ЗАО «Евроген», Москва), оптимизированными по редким в *Escherichia coli* кодонам. Ген *VSTx1* был клонирован в вектор pET-32a(+) (Novagen) по сайтам KpnI и BamHI в единой рамке считывания с геном тиоредоксина (TRX). Затем последовательность, кодирующую сайт гидролиза гибридного белка энтерокиназой, предусмотренную в векторе pET-32a(+), заменили на последовательность, кодирующую сайт гидролиза тромбином. Полученную плазмиду назвали pET/TRX-VSTx1.

Клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали рекомбинантным вектором pET/TRX-VSTx1 и рассевали на чашки Петри с LB-агаром (10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl на 1 л среды, pH 7.4) и ампициллином (100 мг/л). Колонии с чашки переносили в питательную среду ТВ (12 г бактотриптона, 24 г дрожжевого экстракта, 4 мл глицерина, 2.3 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 12.5 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  на 1 л среды, pH 7.4), содержащую ампициллин (100 мг/л), культивировали при 37°C с умеренным перемешиванием до достижения оптической плотности 0.6 о.е. Индуцировали транскрипцию гена *TRX-VSTx1* добавлением изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозиды (ИПТГ)

до конечной концентрации 0.025 мМ и продолжали культивирование клеточной культуры в среде ТВ при 37°C в течение ночи.

Клеточную культуру центрифугировали (20 мин, 8000 об/мин, 4°C). Клеточный осадок с 1 л культуры ресуспендировали в буфере А. Клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора (Branson Digital Sonifier) по 10 с с 12-кратным повтором. Лизат центрифугировали в течение 30 мин при 30000 g, далее отбирали надосадочную жидкость. Лизат очищали на металлоаффинной смоле, уравновешенной буфером А. После нанесения препарата белка колонку промывали последовательно трехкратными объемами: буфера А и буфера А, содержащего 50 мМ имидазола. TRX-VSTx1 элюировали буфером А, содержащим 150 мМ имидазола. После очистки проводили специфический гидролиз гибридного белка тромбином. Препарат VSTx1 выделяли с помощью вычитающей металлоаффинной хроматографии. Для окончательной очистки препарата VSTx1 применяли ВЭЖХ на обращенной фазе (колонка C4, 4.6 × 250 мм, A300, Jupiter, Phenomenex). Выход токсина составил 1 мг/л бактериальной культуры. В отличие от природного токсина, рекомбинантный аналог VSTx1 содержал на N-конце дополнительные остатки Gly-Ser, возникающие в результате гидролиза тромбином. Идентичность молекулярной массы рекомбинантного токсина расчетному значению подтверждена с помощью масс-спектрометрии.

### Получение NTII и его $^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -меченого варианта

Препарат рекомбинантного нейротоксина II был получен согласно [22].  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -меченый препарат NTII получали следующим образом. Клетки BL21(DE3), трансформированные вектором pET-22b(+)/STII/NTII [22], рассевали на чашки Петри с LB-агаром и ампициллином (100 мг/л). Колонии с чашки инокулировали в 10 мл среды LB и культивировали при 37°C в течение 1 ч. Затем к клеткам каждый час добавляли по 10 мл среды LB, приготовленной на дейтерированной воде ( $^2\text{H}_2\text{O}$ , 99% дейтерия), до тех пор, пока общий объем среды не достиг 110 мл. В этих условиях культивирование продолжили в течение ночи. После этого в стерильных условиях собирали клеточный осадок и ресуспендировали его в 1 л минимальной среды M9 (6 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 г NaCl, 2 г  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , 240 мг безводного  $\text{MgSO}_4$ , 11 мг  $\text{CaCl}_2$ , 4 мл глицерина, 2 мг дрожжевого экстракта, 200 мкл 5% тиаминхлорида на 1 л среды, pH 7.4), приготовленной на  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Клетки инкубировали при 37°C до достижения культурой оптической плотности, равной 0.6 о.е. Транскрипцию гена *stII-ntII* индуцировали ИПТГ, который добавляли до конечной концентрации 0.05 мМ, и продолжали культивировать клеточную культуру в течение 1 сут.



Выделение и очистку  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -NTII осуществляли согласно [22].

### ЯМР-спектроскопия

ЯМР-спектры получали при температуре 40–45°C на спектрометрах AVANCE-700 и AVANCE-III-800 (Bruker, Германия), укомплектованных датчиками с криогенно охлаждаемой  $^1\text{H}$ -катушкой, с рабочей частотой по протонам 700 и 800 МГц соответственно.

Для измерения изотерм связывания токсинов с ЛБН и молекулами MSP образцы VSTx1 и NTII (20 мкМ, 10 мМ Трис-Ас, pH 7.0) титровали раствором нанодисков (70 мкМ) различного липидного состава или раствором MSP (0.7 мМ). В каждой точке измеряли 1D  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр. Анализ данных проводили, предполагая, что интенсивность наблюдаемых ЯМР-сигналов пептида пропорциональна его равновесной концентрации в растворе ( $[\text{P}]_{\text{free}}$ ). Кривые связывания аппроксимировали либо уравнением равновесного распределения (1), либо с помощью изотермы Ленгмюра (2), учитывая разведение исходных образцов при титровании:

$$\frac{[\text{P}]_{\text{bound}}}{[\text{ЛБН/Липид}]} = K_p \cdot [\text{P}]_{\text{free}}, \quad (1)$$

$$\frac{1}{K_n} = \frac{[\text{P}]_{\text{free}} \cdot (n \cdot [\text{ЛБН}] - [\text{P}]_{\text{bound}})}{[\text{P}]_{\text{bound}}}, \quad (2)$$

где  $[\text{ЛБН/Липид}]$  – концентрация ЛБН (в предположении, что один нанодиск содержит две молекулы MSP) или концентрация липидов (в предположении, что один нанодиск содержит 150 молекул липида),  $[\text{P}]_{\text{bound}}$  – концентрация пептида, связанного с ЛБН ( $[\text{P}]_0 = [\text{P}]_{\text{free}} + [\text{P}]_{\text{bound}}$ ),  $K_p$  – коэффициент распределения,  $n$  – число сайтов связывания пептида на поверхности нанодиска,  $K_n$  – константа формирования комплекса пептид–сайт связывания.

Взаимодействие NTII с ЛБН изучали с использованием образца, содержащего 45 мкМ  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -NTII и 75 мкМ ЛБН/POPC/DOPS (4 : 1) (10 мМ Трис-Ас, pH 7.0). Для идентификации NH-групп пептида, сближенных с поверхностью нанодиска, в 2D  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -TROSY-спектрах наблюдали изменения интенсивностей кросс-пиков NTII при преднасыщении холиновой группы липида POPC. Сигнал  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ -группы (химический сдвиг – 3.2 м.д.) насыщали на мощности 125 Гц в течение 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 и 3.0 с, используя задержку на релаксацию, равную 3 с. Для идентификации NH-групп пептида, сближенных с гидрофобным регионом мембраны нанодиска, к образцу NTII в комплексе с ЛБН/POPC/DOPS добавляли 5-доксилстеариновую кислоту (5-DSA), растворен-

ную в небольшом количестве метанола, до конечной концентрации 10, 30 и 75 мкМ. Ослабление интенсивности сигналов NTII, возникающее за счет парамагнитного усиления релаксации ядер  $^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N}$ , наблюдали в 2D  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -TROSY-спектрах. Скорости процесса кросс-корреляции между диполь-дипольной релаксацией и релаксацией, возникающей из-за анизотропии химического сдвига ядра,  $^{15}\text{N}$  ( $\eta_{\text{xy}}$ ) измеряли для комплексов NTII с ЛБН/POPC/DOPS при температуре 40°C на спектрометре AVANCE-III-800, используя эксперименты на основе 2D  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -TROSY [23]. Время корреляции вращательных движений ( $\tau_R$ ) для NH-групп пептида было рассчитано из измеренных значений  $\eta_{\text{xy}}$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

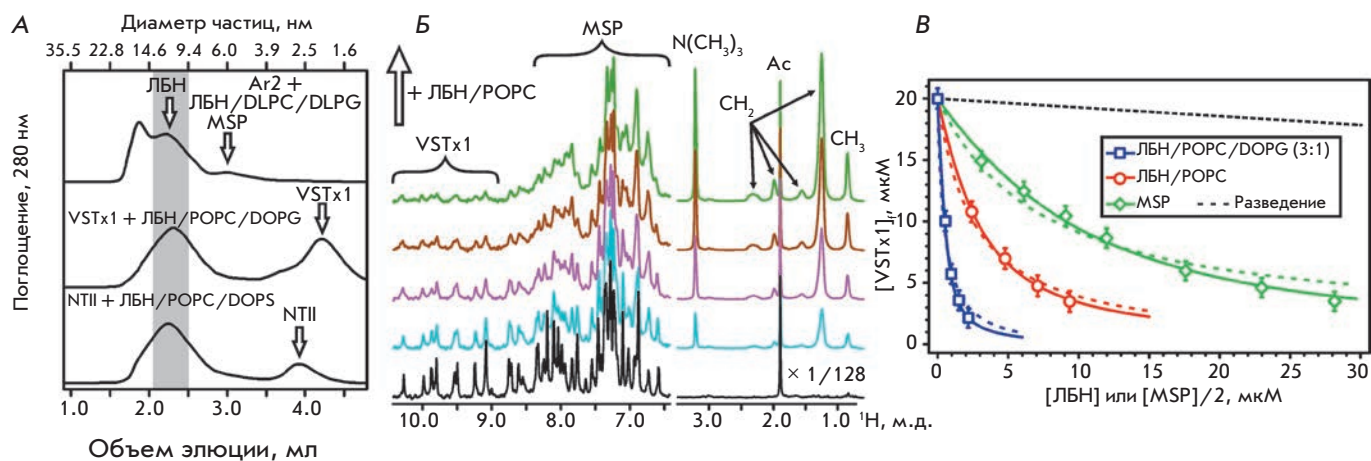
#### Взаимодействие апеницина-2 с нанодисками

Катионный АМП Ar2 содержит в основном положительно заряженные и гидрофобные остатки и в воде имеет структуру  $\beta$ -шпильки, стабилизированной одной дисульфидной связью (рис. 1) [21]. Апеницин-2 селективно взаимодействует с мембранами, содержащими отрицательно заряженные молекулы липидов, и образует в них олигомерные поры, сформированные с участием фосфолипидов (так называемые тороидальные поры) [18]. В больших концентрациях Ar2, вероятно, приводит к мицеллизации бислоя [24]. Как предполагается, в составе поры  $\beta$ -шпильки индивидуальных пептидов имеют трансмембранную ориентацию, так что N- и C-концевые фрагменты и регион  $\beta$ -поворота контактируют с полярными регионами на наружной и внутренней сторонах мембраны [18].

С целью изучения возможности получения стабильных комплексов Ar2 с ЛБН использовали нанодиски, содержащие нейтральные (POPC) и анионные (DOPG) «длинноцепочечные» липиды. Ранее методом КД-спектроскопии было показано, что Ar2 не взаимодействует с везикулами, сформированными из POPC, и с высокой аффинностью связывается с липосомами на основе DOPG [18, 21]. Для моделирования возможного перехода  $\beta$ -шпильки Ar2 (длина ~ 3.5 нм) в трансмембранное состояние использовали смесь «короткоцепочечных» липидов различного заряда (DLPC/DLPG = 4 : 1, жирнокислотные цепи длиной 12 атомов углерода, расстояние между фосфатными группами на противоположных сторонах мембраны ~ 3.4 против ~ 3.7 нм у длинноцепочечных липидов [25]). Ранее ЛБН на основе смеси DLPC/DLPG использовали для наблюдения переходов между поверхностно-связанным и трансмембранным состоянием пептидного канала образующего антибиотика антиамебина I [15].

В ходе исследования водный раствор Ar2 добавляли к образцам нанодисков. Во всех случаях, даже





**Рис. 2.** Гель-фильтрационный анализ препаратов ЛБН после добавления мембраноактивных пептидов и анализ изотерм связывания VSTx1 с ЛБН и MSP. А – на хроматограммах показано положение пиков, соответствующее нанодискам, агрегатам MSP, NTII и VSTx1. Б – взаимодействие VSTx1 с ЛБН/РОРС. Показаны фрагменты 1D <sup>1</sup>H-спектров 20 мкМ VSTx1, измеренных при различных концентрациях ЛБН. В – изотермы связывания VSTx1 с ЛБН и MSP, аппроксимированные уравнением равновесного распределения (уравнение (1), пунктирные линии) и уравнением Ленгмюра (уравнение (2), сплошные линии). Полученные параметры приведены в таблице

при добавлении малых концентраций пептида, растворы ЛБН сильно опалесцировали, а при эквимольных концентрациях ( $Ar2/LBN = 1 : 1$ ) и выше растворы мутнели, что указывало на разрушение нанодисков с образованием более крупных частиц. Анализ супернатанта препаратов с помощью гель-фильтрации подтвердил это предположение. В образцах выявлены большие комплексы, имеющие характерные размеры  $\sim 15$  нм, остаточная фракция ЛБН диаметром  $\sim 10-11$  нм, а также небольшое количество частиц диаметром  $\sim 6$  нм (рис. 2А). Сравнение с результатами предыдущих исследований [20, 26] позволило предположить, что эти частицы представляют собой агрегаты белка MSP. По-видимому, Ar2 вызывает слияние нанодисков, сопровождаемое высвобождением молекул MSP. Сходный процесс известен как ремоделирование липопротеинов высокой плотности (lipoprotein remodeling), которое может происходить как *in vitro*, так и *in vivo* при взаимодействии липопротеиновых частиц с липофильными белками плазмы крови [27]. Ранее слияние нанодисков наблюдали в бесклеточных системах биосинтеза белка при котрансляционном встраивании мембранных белков в ЛБН, содержащие ненасыщенные липиды [26]. Процессы самопроизвольного слияния ЛБН *in vitro* идут чрезвычайно медленно, но они значительно ускоряются в денатурирующих условиях [28].

Для периферической стабилизации фрагмента мембраны молекулы MSP, обладающие амфифильными свойствами, должны вносить в липидный бислой значительную положительную спонтанную кривизну. Аналогичное влияние на спонтанную кривизну

бислоя оказывают многие амфифильные мембрано-активные пептиды, в частности АМП, чье действие опосредовано формированием «тороидальных» пор – регионов с большой положительной кривизной [29], или мицеллизацией бислоя. Ar2 не взаимодействует с липосомами на основе РОРС [21], поэтому мы можем предположить, что слияние нанодисков, наблюдаемое в случае ЛБН/РОРС, не связано напрямую с порообразующей активностью пептида, а вызвано его присоединением к периферическому участку фрагмента липидной мембраны ЛБН. Присоединенные молекулы Ar2 смещают отдельные участки белка MSP, что приводит к образованию дефектов в структуре ЛБН и слиянию нанодисков с образованием липопротеиновых частиц, содержащих большие фосфолипидные домены, и высвобождению свободных молекул MSP. В случае ЛБН, содержащих анионные липиды, может быть предложен альтернативный механизм формирования дефектов в структуре ЛБН, обусловленный способностью Ar2 взаимодействовать непосредственно с мембраной нанодиска.

Учитывая, что механизмы, связанные с изменением локальной кривизны липидного бислоя (образование «тороидальных» пор, мицеллизация бислоя), лежат в основе действия подавляющего большинства водорастворимых катионных АМП, мы можем предположить, что многие из этих молекул будут обладать разрушающим действием на ЛБН. Таким образом, нанодиски, вероятно, не подходят в качестве среды для исследования подобных пептидов. Следует отметить, что существуют другие классы поро- и каналобразующих биомолекул, которые могут изу-

чаться в средах на основе ЛБН. Так, описано формирование стабильных комплексов ЛБН с гидрофобным каналообразующим антибиотиком антиамебином I (верхний предел растворимости в воде 30 мкМ) [12, 15, 20], а также успешное встраивание в нанодиски интегральных мембранных белков, образующих ионные каналы и поры, таких, как  $K^+$ -канал KcsA [20], никотиновый ацетилхолиновый рецептор [30], порообразующий компонент токсина сибирской язвы [11], и ряда белков, имеющих структуру  $\beta$ -бочонка [14].

### Взаимодействие токсина VSTx1 с нанодисками и белком MSP

Токсин VSTx1 – небольшой  $\beta$ -структурный пептид, стабилизированный тремя дисульфидными связями, образующими «цистеиновый узел» (рис. 1) [31]. VSTx1 слабо взаимодействует с мембранами на основе цвиттер-ионных липидов, имеет значительное сродство к интерфейсу фосфолипидных мембран, содержащих анионные липиды, и при этом не обладает мембранолитической активностью [31]. Согласно современным данным, VSTx1 ингибирует потенциал-зависимую активацию  $K^+$ -каналов и при образовании комплекса с потенциал-чувствительным доменом канала использует механизмы «мембранного катализа» [3]. Активность токсина значительно зависит от липидного состава и механического состояния бислоевой мембраны, окружающей канал [32].

Ранее для исследования взаимодействия VSTx1 с липосомами использовали смесь фосфолипидов на основе цвиттер-ионного фосфатидилэтаноламина и анионного фосфатидилглицерина (POPE/POPG, 3 : 1) [3]. Однако формирование ЛБН, содержащих значительную фракцию фосфатидилэтаноламина, малоэффективно, вероятно, из-за высокой отрицательной спонтанной кривизны образуемого бислоя [20, 33]. Поэтому для оценки энергетики взаимодействия токсина VSTx1 с мембранами ЛБН использовали нанодиски, содержащие цвиттер-ионный фосфатидилхолин и анионный фосфатидилглицерин (POPC и смесь POPC/DOPG, 3 : 1). Для оценки вклада неспецифических взаимодействий, обусловленных присутствием в ЛБН белковой компоненты, использовали препарат MSP, не содержащий липиды. Титрование образца VSTx1 раствором ЛБН либо раствором белка MSP, который в водном окружении образует сравнительно большие агрегаты (диаметр ~ 6 нм), приводило к постепенному уменьшению интенсивности ЯМР-сигналов пептида (рис. 2Б), что указывало на ассоциацию VSTx1 с поверхностью нанодисков или молекулами MSP. В этом случае из-за медленной реориентации нанодисков и агрегатов MSP в растворе связывание пептида вело к значительному увеличению ширины ЯМР-линий и умень-

шению интенсивности сигналов. Расчеты показали, что в условиях эксперимента с хорошей точностью можно использовать предположение о том, что интенсивность наблюдаемого сигнала ЯМР прямо пропорциональна равновесной концентрации свободного пептида в растворе ( $[VSTx1]_f$ ).

Анализ измеренных кривых связывания с помощью уравнения равновесного распределения (уравнение 1, рис. 2В, таблица) показал, что VSTx1 эффективно взаимодействует с ЛБН, содержащими анионные липиды (смесь POPC/DOPG), и менее эффективно взаимодействует с нанодисками на основе цвиттер-ионных липидов (POPC). Рассчитанные коэффициенты распределения ( $K_p \sim 17.8 \times 10^3$  и  $2.6 \times 10^3 M^{-1}$  соответственно) значительно превышали значения, наблюдаемые ранее для везикул POPE/POPG (3 : 1) и POPC ( $K_p \sim 2 \times 10^3$  и  $< 0.002 \times 10^3 M^{-1}$  соответственно) [3, 31]. Эти различия в аффинности токсина могут быть обусловлены как отличиями в упаковке молекул фосфолипидов в мембранах ЛБН и везикулах [34], так и использованием в экспериментах различных буферных систем. В работах [3, 31] связывание токсина изучали в буферах, содержащих 150 мМ KCl и NaCl соответственно, в то время как в нашей работе использовали буфер без добавления соли. Увеличение ионной силы раствора, приводящее к частичному экранированию электростатических взаимодействий, вероятно, уменьшает сродство VSTx1 к липидным мембранам. Наблюдаемое слабое взаимодействие VSTx1 с белком MSP (рис. 2В, таблица), по-видимому, обусловленное электростатическим взаимодействием между положительно заряженной молекулой токсина и анионной молекулой MSP, также может выступать в роли дополнительного фактора, усиливающего аффинность токсина к ЛБН.

Анализ кривых связывания с помощью изотермы Ленгмюра (уравнение (2), рис. 2В, таблица) позволил установить, что VSTx1 имеет примерно одинаковую аффинность к сайтам на поверхности нанодиска или на молекуле MSP ( $K_n \sim 0.05 \times 10^6 - 0.13 \times 10^6 M^{-1}$ , таблица), однако, число сайтов связывания значительно отличается. Так, нанодиск, содержащий POPC (~150 молекул), может связать до ~10 молекул токсина, а добавление отрицательно заряженных липидов увеличивает число сайтов связывания до ~35 (~4 молекулы липидов на молекулу токсина). В свою очередь, каждая молекула MSP (в отсутствие липидов) способна связать до 1.6 молекулы VSTx1, что ведет к практически полной компенсации ее заряда.

Гель-фильтрационный анализ комплексов VSTx1/ЛБН не выявил разрушения нанодисков при связывании токсина. На хроматограммах (рис. 2А) видны отдельные пики для частиц диаметром ~10–11

Энергетические и стехиометрические параметры, описывающие взаимодействие VSTx1 и NTII с ЛБН и MSP, полученные с использованием уравнения равновесного распределения (уравнение (1)) либо уравнения изотермы Ленгмюра (уравнение (2))

Пептид	ЛБН или MSP	Равновесное распределение		Изотерма Ленгмюра	
		$K_p$ (ЛБН, MSP×2)* × 10 <sup>6</sup> , М <sup>-1</sup>	$K_p$ (Липиды)* × 10 <sup>3</sup> , М <sup>-1</sup>	$K^{**}$ × 10 <sup>6</sup> , М <sup>-1</sup>	$n^{***}$
VSTx1	ЛБН/POPC	0.39 ± 0.02	2.6 ± 0.2	0.06 ± 0.01	9.6 ± 1.5
	ЛБН/POPC/DOPG (3 : 1)	2.68 ± 0.24	17.8 ± 1.6	0.13 ± 0.02	34.5 ± 3.9
	MSP×2	0.10 ± 0.01		0.05 ± 0.02	3.2 ± 0.9
NTII	ЛБН/POPC/DOPG (3 : 1)	0.32 ± 0.01	2.13 ± 0.07		
	ЛБН/POPC/DOPS (4 : 1)	0.16 ± 0.01	1.07±0.07		

\* $K_p$  – коэффициент распределения. В качестве концентрации «неводной» среды использовали концентрацию ЛБН или липидов, предполагая, что один нанодиск содержит две молекулы MSP и 150 молекул липида.

\*\* $K_n$  – константа формирования комплекса пептид–сайт связывания.

\*\*\* $n$  – число сайтов связывания пептида на поверхности нанодиска.

и ~2.0 нм, которые, вероятно, соответствовали нанодискам и свободному токсину, диссоциированному с поверхности нанодиска (для хроматографии использовали буфер, содержащий 100 мМ NaCl).

#### Взаимодействие нейротоксина NTII с нанодисками

Нейротоксин II (NTII) – катионный негидрофобный пептид, стабилизирован четырьмя дисульфидными связями и имеет так называемую «трехпетельную» β-структурную организацию, характерную для токсинов змей (рис. 1) [35]. NTII является высокоспецифичным ингибитором никотинового ацетилхолинового рецептора мышечного типа, своей центральной петлей он блокирует сайты связывания лигандов, располагающиеся на внеклеточном домене рецептора [36]. В отличие от VSTx1, NTII не имеет явно выраженной мембранной активности. В то же время в ходе исследований, проведенных с использованием методов <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N- и <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии на липосомах DOPC/DOPS/холестерин (3 : 1 : 1), моделирующих мембранное окружение ацетилхолинового рецептора, предположили, что механизм действия NTII также включает элементы «мембранного катализа» [19]. По-видимому, сайт, локализованный в области «головы» токсина вблизи остатков Glu2, Asp57 и Arg58 (рис. 3Б), способен в стехиометрии 1 : 1 связывать заряженную головку молекулы фосфатидилсерина (PS) биологической мембраны, окружающей рецептор. Это взаимодействие, возможно, играет роль на начальных этапах действия NTII и служит для придания молекуле токсина ориентации, оптимальной для образования комплекса токсин–рецептор [19].

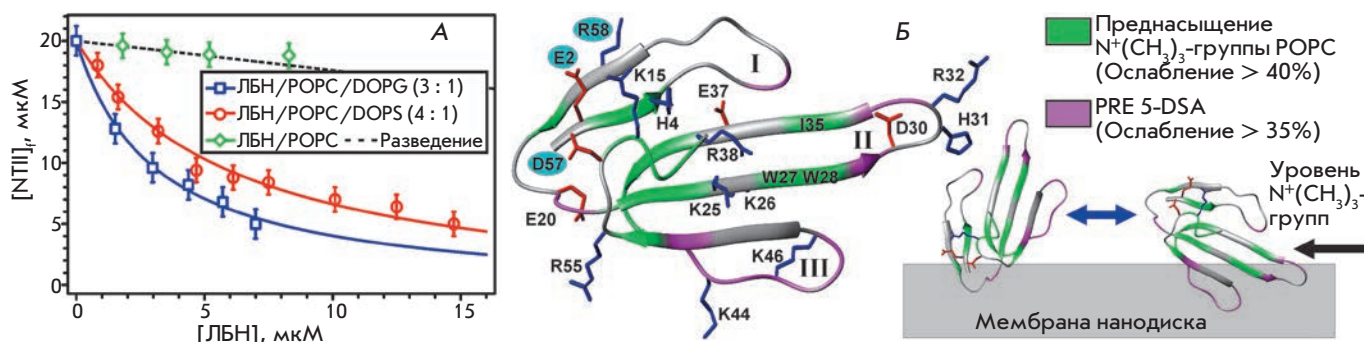
Формирование ЛБН из смеси фосфолипидов POPC/DOPS/холестерин (3 : 1 : 1) при помощи стандартного протокола сборки нанодисков (см. «Экспериментальную часть») оказалось малоэф-

фективным, поэтому были выбраны ЛБН на основе смеси POPC/DOPS (4 : 1). Кроме того, для сравнения были протестированы нанодиски на основе POPC и POPC/DOPG (3 : 1). Титрование образца NTII растворами нанодисков показало, что токсин не связывается с нанодисками на основе цвиттер-ионных липидов (POPC) и имеет небольшое сродство к ЛБН, содержащим анионные липиды (POPC/DOPG и POPC/DOPS) (рис. 3А, таблица). Большую аффинность NTII к ЛБН на основе POPC/DOPG (3 : 1) можно объяснить большим зарядом мембраны нанодиска (относительное содержание заряженного липида 25% против 20% у мембраны POPC/DOPS (4 : 1)). Кроме того, в мембране, содержащей DOPS, заряды NH<sub>3</sub><sup>+</sup> и COOH-групп серина образуют диполь, который может экранировать отрицательный заряд фосфатной группы. Таким образом, кажущийся заряд полярной головки у DOPS будет меньше, чем у DOPG. Полученные данные позволяют сделать предположение об отсутствии значительной селективности у молекулы NTII при взаимодействии с анионными липидами, различающимися структурой полярных головок (фосфатидилсерин и фосфатидилглицерин).

Отсутствие детектируемого связывания NTII с ЛБН/POPC косвенно указало на отсутствие неспецифического взаимодействия токсина с белковой компонентой нанодисков – MSP. Так же, как и в случае с VSTx1, гель-фильтрационный анализ комплексов NTII/ЛБН не выявил разрушения нанодисков при связывании токсина (рис. 2А). На хроматограммах видны отдельные пики, соответствующие нанодискам и свободному токсину (диаметр ~2.6 нм).

Топологию взаимодействия молекулы NTII с поверхностью мембраны POPC/DOPS в составе ЛБН изучали с использованием <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N-меченого аналога NTII. ЯМР-эксперименты проводили в условиях, ког-





**Рис. 3.** Анализ изотерм связывания NTII с ЛБН и возможная топология взаимодействия молекулы NTII с поверхностью мембраны РОРС/ДОРС в составе ЛБН. А – изотермы связывания NTII с ЛБН аппроксимированы уравнением равновесного распределения (уравнение (1)). Полученные параметры приведены в таблице. Б – структура NTII окрашена в соответствии с полученными экспериментальными данными (рис. 4Г, Д). Остатки, формирующие предполагаемый сайт связывания с полярной головкой фосфатидилсерина [19], выделены голубыми кружками

да практически весь токсин был связан с поверхностью нанодиска. Несмотря на значительное уширение и ослабление сигналов связанного пептида (рис. 4А), применение дейтерированного аналога NTII и экспериментов TROSY, оптимизированных для уменьшения поперечной релаксации ядер  $^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N}$ , позволило получить  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -корреляционный спектр NTII в комплексе с ЛБН (рис. 4Б). Сравнение  $^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N}$  химических сдвигов молекулы NTII в водном окружении и в комплексе с ЛБН не выявило значительных изменений в пространственной структуре токсина при образовании комплекса. Изменения химических сдвигов, превышающие 0.03 и 0.2 м.д. соответственно, отмечены только для одного остатка Arg32 (данные не показаны).

Скорости кросс-корреляции релаксации ядер  $^{15}\text{N}$  ( $\eta_{\text{XY}}$ ), измеренные для HN-групп NTII в комплексе с ЛБН (рис. 4В), показали большой разброс значений (от 2.5 до 40 Гц, среднее значение  $16.3 \pm 9.2$  Гц, частота 800 МГц,  $40^\circ\text{C}$ ), что соответствовало временам корреляции вращательных движений ( $\tau_{\text{R}}$ ) в диапазоне от 2 до 31 нс, со средним  $\sim 12.5$  нс. Рассчитанное среднее значение  $\tau_{\text{R}}$  соответствовало реориентации глобулярной частицы диаметром  $\sim 5.4$  нм и массой  $\sim 34$  кДа, что значительно превышает размеры молекулы NTII, но существенно меньше размеров нанодиска. Полученные данные указывают на значительную анизотропию взаимодействий в комплексе NTII/ЛБН, которая может объясняться либо наличием дополнительных степеней свободы у молекулы токсина в составе комплекса, либо вовлечением молекулы NTII в быстрый (по шкале ЯМР) обменный процесс между связанным и свободным состояниями.

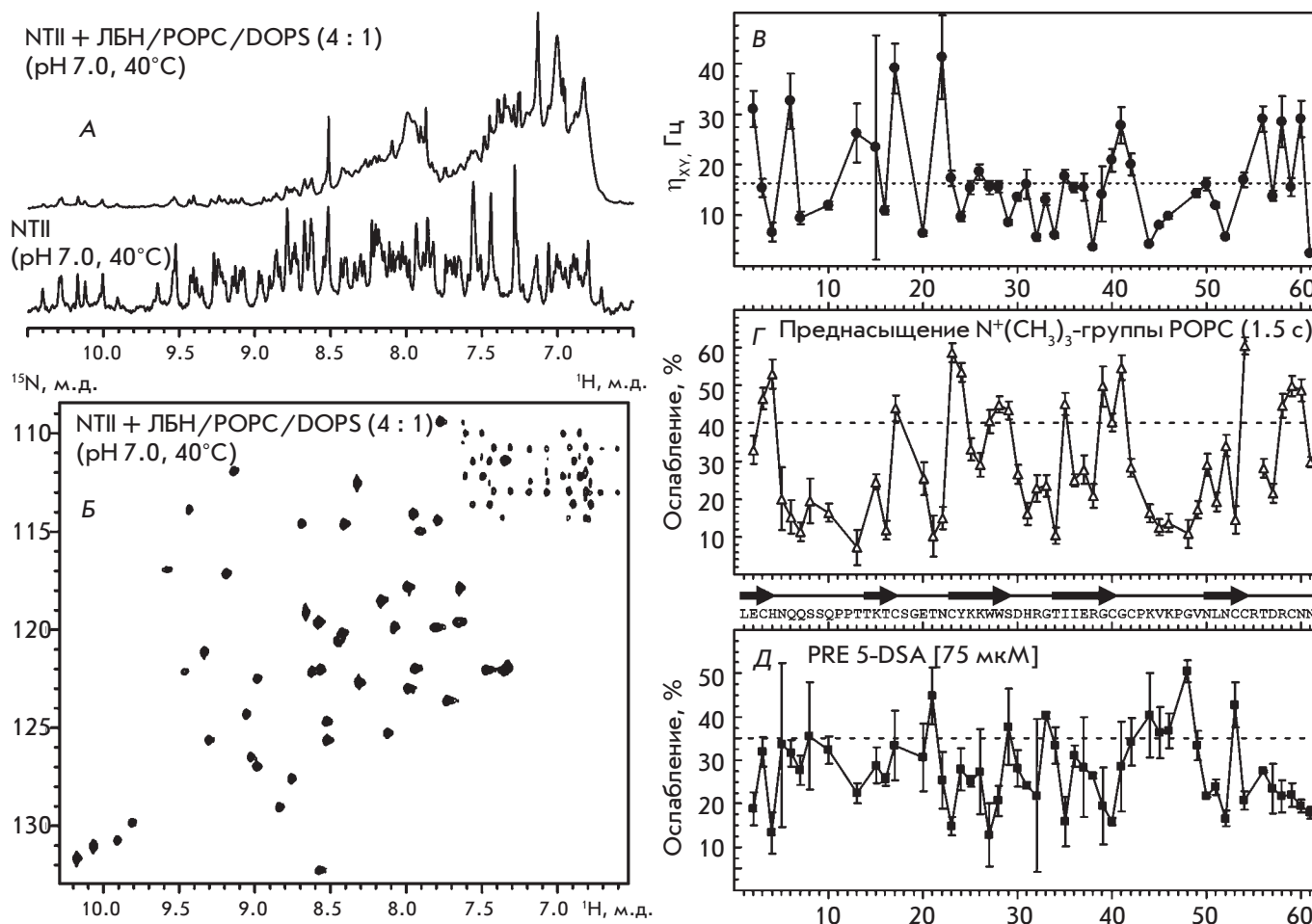
Возможную ориентацию NTII на поверхности мембраны нанодиска определяли, измеряя перенос намагниченности между протонами липидов и HN-

группами нейротоксина за счет ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Наибольший отклик в ЯМР-спектрах пептида детектировался при насыщении сигналов холиновой группы РОРС. Существенное падение интенсивности  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -кросс-пиков наблюдалось для остатков, локализованных на двух участках молекулы NTII: 1) в области «головы» токсина, вблизи от предполагаемого сайта связывания фосфатидилсерина, и 2) в центральной (второй) петле на уровне остатков Trp27, Trp28 и Ile35 (рис. 3Б, 4Г). Наблюдаемое уменьшение интенсивности указывало на пространственную сближенность соответствующих HN-групп токсина с поверхностью бислоя ЛБН.

Дополнительно с целью определения топологии NTII на поверхности нанодиска использовали липофильный спиновый зонд 5-DSA, который встраивается в бислой таким образом, что его спиновая метка располагается в гидрофобном регионе мембраны вблизи от области, занимаемой полярными головками. Наибольшее ослабление интенсивностей HN-сигналов, вызванное эффектом парамагнитного усиления релаксации, наблюдалось у остатка Thr21 из «головы» токсина и остатков из третьей и второй петель (рис. 3Б, 4Д), что указывало на наличие контакта соответствующих HN-групп с гидрофобным регионом бислоя ЛБН.

Полученные данные не согласуются с одной преимущественной ориентацией молекулы NTII на поверхности мембраны нанодиска (рис. 3Б). Вероятно, токсин взаимодействует с поверхностью нанодиска в нескольких (минимум двух) ориентациях и участвует в быстрых (по шкале химических сдвигов ЯМР) обменных процессах между комплексами с различной топологией. При этом только одна из возможных топологий (рис. 3Б) «совместима» со специфическим взаимодействием NTII с полярной головкой фосфа-





**Рис. 4.** Анализ взаимодействия NTII с ЛБН методом ЯМР-спектроскопии. А – сравнение 1D <sup>1</sup>H-спектров 45 мкМ <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N-меченого аналога NTII в водном растворе (внизу) и в комплексе с 75 мкМ ЛБН/РОРС/ДОПС (4 : 1) (вверху). Б – 2D <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-TROSY-спектр 45 мкМ <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N-меченого NTII в комплексе с 75 мкМ ЛБН/РОРС/ДОПС (4 : 1). В – скорость кросс-корреляции релаксации ядер <sup>15</sup>N (η<sub>xy</sub>) молекулы NTII в комплексе с ЛБН/РОРС/ДОПС (4 : 1). Среднее значение показано пунктиром. Г, Д – относительное ослабление интенсивностей <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-TROSY-кросс-пиков NTII в комплексе с ЛБН/РОРС/ДОПС, вызванное (Г) преднасыщением сигнала холиновой группы РОРС в течение 1.5 с или (Д) парамагнитным усилением релаксации (PRE) от 75 мкМ 5-DSA

тидилсерина в предполагаемом сайте связывания [19]. Таким образом, в комплексе NTII с ЛБН/РОРС/ДОПС неспецифические электростатические и гидрофобные взаимодействия имеют сравнимую энергию со специфическими взаимодействиями.

Следует отметить, что динамическое равновесие между комплексами с различной топологией может играть определенную роль в функционировании периферических мембранных белков и мембраноактивных пептидов. Так, в ходе недавнего ЯМР-исследования комплекса GTP-азы Rheb (семейство Ras) с ЛБН было установлено, что белок имеет две возможные ориентации относительно поверхности мембраны нанодиска. При этом заселенность этих состояний меняется в ходе гидролиза GTP [37].

### ВЫВОДЫ

В представленной работе на примере трех модельных β-структурных пептидов: ареницина-2, VSTx1 и NTII, исследована возможность применения ЛБН для изучения специфических взаимодействий пептид/мембрана и механизмов «мембранного катализа» в функционировании водорастворимых мембраноактивных антимикробных пептидов и нейропептидов. Установлено, что нанодиски, содержащие молекулы фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина, могут разрушаться при взаимодействии с катионными порообразующими пептидами и, возможно, не подходят в качестве мембраноимитирующей среды для изучения подобных молекул. В то же время среды на основе ЛБН могут приме-

няться для исследования энергетики, стехиометрии и топологии взаимодействия мембраноактивных нейротоксинов с липидной мембраной. В ходе подобных исследований необходимо учитывать возможность неспецифических взаимодействий пептидных молекул с белковой компонентой MSP и с липидной мембраной нанодиска. ●

*Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», РФФИ (гранты № 12-04-31485, 12-04-01639 и 14-04-01270), Министерством образования и науки РФ (соглашение № 8789), стипендией Президента РФ (СП-5823.2013.4) и грантом Президента РФ (НШ-1766.2014.4).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zasloff M. // Nature. 2002. V. 415. № 6870. P. 389–395.
- Thomas L., Scheidt H.A., Bettio A., Beck-Sickinger A.G., Huster D., Zschörnig O. // Eur. Biophys. J. 2009. V. 38. № 5. P. 663–677.
- Lee S.Y., MacKinnon R. // Nature. 2004. V. 430. № 6996. P. 232–235.
- Mäler L. // Mol. Membr. Biol. 2012. V. 29. № 5. P. 155–176.
- Oxenoid K., Chou J.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2013. V. 23. № 4. P. 547–554.
- Chou J.J., Kaufman J.D., Stahl S.J., Wingfield P.T., Bax A. // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. № 11. P. 2450–2451.
- Warschawski D.E., Arnold A.A., Beaugrand M., Gravel A., Chartrand É., Marcotte I. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1808. № 8. P. 1957–1974.
- Bayburt T.H., Sligar S.G. // FEBS Lett. 2010. V. 584. № 9. P. 1721–1727.
- Denisov I.G., McLean M.A., Shaw A.W., Grinkova Y.V., Sligar S.G. // J. Phys. Chem. B. 2005. V. 109. № 32. P. 15580–15588.
- Frauenfeld J., Gumbart J., van der Sluis E.O., Funes S., Gartmann M., Beatrix B., Mielke T., Berninghausen O., Becker T., Schulten K., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2011. V. 18. № 5. P. 614–621.
- Katayama H., Wang J., Tama F., Chollet L., Gogol E.P., Collier R.J., Fisher M.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 8. P. 3453–3457.
- Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Sobol A.G., Ovchinnikova T.V., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Blommers M.J., Arseniev A.S. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 7. P. 2140–2141.
- Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Paramonov A.S., Shingarova L.N., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Blommers M.J., Arseniev A.S. // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. № 16. P. 5628–5629.
- Hagn F., Etzkorn M., Raschle T., Wagner G. // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. № 5. P. 1919–1925.
- Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Gizatullina A.K., Zhuravleva A.V., Tagaev A.A., Yakimenko Z.A., Telezhinskaya I.N., Kirpichnikov M.P., Ovchinnikova T.V., et al. // Chem. Biodivers. 2013. V. 10. № 5. P. 838–863.
- Schuler M.A., Denisov I.G., Sligar S.G. // Meth. Mol. Biol. 2013. V. 974. P. 415–433.
- Kyte J., Doolittle R.F. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. № 1. P. 105–132.
- Shenkarev Z.O., Balandin S.V., Trunov K.I., Paramonov A.S., Sukhanov S.V., Barsukov L.I., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // Biochemistry. 2011. V. 50. № 28. P. 6255–6265.
- Lesovoy D.M., Bocharov E.V., Lyukmanova E.N., Kosinsky Y.A., Shulepko M.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Biophys. J. 2009. V. 97. № 7. P. 2089–2097.
- Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Solozhenkin O.I., Gagnidze I.E., Nekrasova O.V., Chupin V.V., Tagaev A.A., Yakimenko Z.A., Ovchinnikova T.V., Kirpichnikov M.P., et al. // Biochemistry (Mosc.). 2009. V. 74. № 7. P. 756–765.
- Ovchinnikova T.V., Shenkarev Z.O., Nadezhdin K.D., Balandin S.V., Zhmak M.N., Kudelina I.A., Finkina E.I., Kokryakov V.N., Arseniev A.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 360. № 1. P. 156–162.
- Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Schulga A.A., Ermolyuk Y.S., Mordvintsev D.Y., Utkin Y.N., Shoulepko M.A., Hogg R.C., Bertrand D., Dolgikh D.A., et al. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 34. P. 24784–24791.
- Chill J.H., Louis J.M., Baber J.L., Bax A. // J. Biomol. NMR. 2006. V. 36. № 2. P. 123–136.
- Andrä J., Jakovkin I., Grötzinger J., Hecht O., Krasnosdembskaya A.D., Goldmann T., Gutschmann T., Leippe M. // Biochem. J. 2008. V. 410. № 1. P. 113–122.
- Nagle J.F., Tristram-Nagle S. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1469. № 3. P. 159–195.
- Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Khabibullina N.F., Kopeina G.S., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Mineev K.S., Tikhonov R.V., Shingarova L.N., Petrovskaya L.E., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1818. № 3. P. 349–358.
- Clay M.A., Pyle D.H., Rye K.-A., Barter P.J. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 12. P. 9019–9025.
- Jayaraman S., Gantz D.L., Gursky O. // Biophys. J. 2005. V. 88. № 4. P. 2907–2918.
- Huang H.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1758. № 9. P. 1292–1302.
- Sheng J.R., Grimme S., Bhattacharya P., Stowell M.H.B., Artinger M., Prabahakar B.S., Meriggioli M.N. // Exp. Neurol. 2010. V. 225. № 2. P. 320–327.
- Jung H.J., Lee J.Y., Kim S.H., Eu Y.J., Shin S.Y., Milescu M., Swartz K.J., Kim J.I. // Biochemistry. 2005. V. 44. № 16. P. 6015–6023.
- Schmidt D., MacKinnon R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 49. P. 19276–19281.
- Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Butenko I.O., Petrovskaya L.E., Paramonov A.S., Shulepko M.A., Nekrasova O.V., Kirpichnikov M.P., Arseniev A.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1828. № 2. P. 776–784.
- Nakano M., Fukuda M., Kudo T., Miyazaki M., Wada Y., Matsuzaki N., Endo H., Handa T. // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. № 23. P. 8308–8312.
- Golovanov A.P., Lomize A.L., Arseniev A.S., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 213. № 3. P. 1213–1223.
- Teixeira-Clerc F., Ménez A., Kessler P. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 28. P. 25741–25747.
- Mazhab-Jafari M.T., Marshall C.B., Stathopoulos P.B., Kobashigawa Y., Stambolic V., Kay L.E., Inagaki F., Ikura M. // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. № 9. P. 3367–3370.

УДК 578.233.22

# Мишень-специфичная доставка генов с помощью рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц, способных эффективно связываться с наноантителами

М. Н. Гарас<sup>1\*</sup>, С. В. Тиллиб<sup>2</sup>, О. В. Зубкова<sup>1</sup>, В. Н. Рогожин<sup>1,3</sup>, Т. И. Иванова<sup>2</sup>, Л. А. Васильев<sup>2</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>1</sup>, М. М. Шмаров<sup>1</sup>, И. Л. Тутыхина<sup>1</sup>, И. Б. Есмагамбетов<sup>1</sup>, И. Ю. Грибова<sup>1</sup>, А. С. Банделюк<sup>1</sup>, Б. С. Народицкий<sup>1</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>2</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

<sup>3</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Акад. Скрябина, 23

\*E-mail: max.garas@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.10.2013

После доработки 08.04.2014

**РЕФЕРАТ** Существующие на сегодняшний день подходы по изменению тропизма генетических векторов требуют получения отдельного вектора для каждого целевого рецептора, что создает дополнительные временные и экономические затраты. В связи с этим большой интерес представляет универсальная векторная система, которая позволит специфически связывать на своей поверхности молекулы, обеспечивающие эффективную мишень-специфичную доставку («таргетинг»). В представленном исследовании предложен новый подход к получению таргетных носителей с использованием рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц (РПАН) на основе генома аденовируса человека серотипа 5 с модифицированным геном капсидного белка рIX (Ad5-EGFP-рIX-ER). Такие РПАН способны с высокой аффинностью связывать на своей поверхности соответственно модифицированные химерные наноантитела, специфически узнающие определенный антиген (раковоэмбриональный антиген, РЭА). Эффективное связывание наноантител (аСЕА-RE) с поверхностью капсидов РПАН доказано с помощью иммуоферментного анализа. Способность полученного вектора к таргетной доставке доказана в эксперименте с использованием опухолевых клеточных линий A549 и Lim1215, экспрессирующих РЭА. Показано, что Ad5-EGFP-рIX-ER, несущий на поверхности аСЕА-RE, в 3 раза более эффективно проникает в опухолевые клетки линий A549 и Lim1215 независимо от рецепторов коксаки- и аденовируса путем, чем немодифицированные РПАН и препарат Ad5-EGFP-рIX-ER без адсорбции наноантител на поверхности капсида. Полученный нами препарат РПАН Ad5-EGFP-рIX-ER представляет собой универсальную платформу, которая посредством специфического присоединения на поверхности РПАН молекул наноантител против определенного поверхностного антигена может обеспечить доставку целевого гена в заданные клетки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аденовирус, рIX, лейциновая молния, наноантитела, раковоэмбриональный антиген.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БОЕ – бляшкообразующая единица; РЭА – раковоэмбриональный антиген; Ad – аденовирус человека; Ad5 – Ad серотипа 5; CAR – коксакивирусный и аденовирусный рецептор; а.о. – аминокислотный остаток, при числе.

## ВВЕДЕНИЕ

Препараты рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц (РПАН), полученные на основе генома аденовируса человека серотипа 5 (Ad5) с делецией области, ответственной за репликацию, рассматриваются как одни из наиболее перспективных средств достав-

ки генетической информации в клетки млекопитающих. РПАН широко используются для разработки рекомбинантных вакцин и генотерапевтических средств [1, 2]. Безопасность РПАН подтверждена целым рядом клинических испытаний различных вакцинных и терапевтических препаратов на основе ге-

нома Ad5. С 2008 года в одной четверти клинических испытаний по генной терапии исследуются РПАН на основе Ad [3]. Кроме того, в Китае уже разрешены два препарата на основе Ad5. Такая популярность объясняется целым рядом преимуществ: векторы на основе Ad5 способны трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки; ДНК аденовируса не интегрируется в геном клетки-хозяина и остается в экстрахромосомной форме; РПАН могут быть получены в титре более  $10^{10}$  БОЕ/мл, что может позволить использовать их в качестве живых рекомбинантных вакцин; РПАН обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого гена в клетке-мишени.

Однако следует отметить, что существует ряд ограничений для применения РПАН на основе Ad5. Например, низкая эффективность трансдукции некоторых типов клеток млекопитающих, в частности опухолевых клеток человека. Это связано с тем, что первичный рецептор Ad5 – коксаки- и аденовирусный рецептор (CAR) – экспрессируется не на всех типах клеток [4–6]. Для таргетной доставки генов в CAR-дефицитные и CAR-негативные клетки разработаны технологии модификации белков капсида Ad5 (отростка пентона, гексона, rIX, rIIIa). На сегодняшний день существуют стратегии, которые позволяют направлять РПАН на основе Ad5 в клетки различного типа, например в клетки рака шейки матки, глиомы, почечно-клеточного рака, рака яичника, а также в гладкомышечные клетки сосудов [7–12].

В последнее время в качестве мишени для встраивания белковых лигандов в капсид аденовируса большой интерес вызывает минорный капсидный белок IX (rIX). Преимущества его модификации – возможность встраивания на С-конец относительно крупных пептидных фрагментов; высокая структурная совместимость rIX со встраиваемыми лигандами и широкий спектр возможных направлений использования аденовекторов с модификацией rIX [13].

Недавно было показано, что введение в структуру rIX RGD-мотива (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота) позволяет увеличивать эффективность связывания РПАН на основе Ad5 с клетками, экспрессирующими  $\alpha_v\beta$ -интегрины [14]. Получены также РПАН, несущие на С-конец rIX одноцепочечный Т-клеточный рецептор (TCR) против ассоциированного с меланомой антигена в комплексе с HLA I (главный комплекс гистосовместимости), способные эффективно трансдуцировать клетки меланомы человека [15].

Следует отметить, что существующие на сегодняшний день подходы по модификации rIX требуют получения отдельного препарата РПАН для каждого целевого рецептора, что создает дополнительные временные и экономические затраты. В связи с этим

большой интерес представляет получение универсальной технологической платформы на основе РПАН, которая позволит специфически связывать на поверхности капсида аденовируса молекулы, обеспечивающие эффективную мишень-специфичную доставку (таргетинг).

Для разработки такой универсальной платформы были получены РПАН, несущие на С-конец rIX особый синтетический домен  $EE_{12}RR_{345}L$  (ER-домен), способный с высокой эффективностью гетеродимеризоваться с доменом-партнером –  $RR_{12}EE_{345}L$  (RE-домен) с образованием стабильной структуры (лейциновой молнии). Эти синтетические домены были получены ранее генно-инженерным путем на основе соответствующего домена из белка, связывающегося с геном вителлогена (VBP) [16, 17]. Каждый из двух указанных 43-аминокислотных доменов не способен гомодимеризоваться даже при низких температурах (от  $6^\circ\text{C}$  и выше), но при этом способен к эффективной гетеродимеризации при физиологических условиях с образованием стабильной структуры лейциновой молнии  $EE_{12}RR_{345}L/RR_{12}EE_{345}L$  (или ER/RE), которая имеет температуру плавления  $73^\circ\text{C}$  и константу диссоциации  $K_d = 1.3 \times 10^{-11}$  М [17].

Следует отметить, что подход к модификации РПАН на основе Ad, весьма сходный с использованным в нашей работе, недавно уже был описан [18]. Однако в представляемой нами работе есть существенные отличия, касающиеся как модификации иного капсидного белка, так и использования другого формата антитела, а также способа получения комбинированного вектора.

Мы предлагаем использовать в качестве носителя ER-домена белок IX, так как количество мономеров rIX на капсиде Ad5 в 6 раз больше, чем мономеров отростка пентона, следовательно, и антител с РПАН будет связываться больше, что обеспечит более эффективное проникновение rIX-модифицированных РПАН в целевые клетки.

В качестве молекулы, обеспечивающей таргетинг модифицированных РПАН к определенным клеткам, в данной работе применяли однодоменные антитела (наноантитела) к раковоэмбриональному антигену (РЭА, или СЕА, carcinoembryonic antigen) (aCEA-RE). Выбор наноантител был обусловлен рядом их преимуществ, к которым, в частности, относятся простота всевозможных генно-инженерных модификаций, сниженный иммунный ответ, лучшая фармакокинетика, хорошая растворимость, устойчивость к изменениям рН-среды и высокая термостабильность. Выбор наноантител к РЭА обусловлен высокой частотой встречаемости данного рецептора на опухолевых клетках. Важным фактором выбора именно наноантител стал имеющийся у нас опыт по их получению и использо-



ванию, в том числе с введением в их состав гомотриме- ризирующегося домена изолейциновой молнии [19, 20], а также по использованию РПАН для экспрессии на- ноантител *in vivo* [21, 22].

Использованные аСЕА-RE способны эффектив- но узнавать антиген РЭА, в повышенном количе- стве представленный на поверхности опухолевых клеточных линий A549 и Lim1215. В данной работе показано, что рIX-модифицированные РПАН (Ad5-EGFP-рIX-ER), несущие на своей поверхности нано- антитела аСЕА-RE, в 3 раза более эффективно про- никают в опухолевые клетки линий A549 и Lim1215 SAR-независимым путем, чем немодифицированный РПАН (Ad5-EGFP) и препарат Ad5-EGFP-рIX-ER (без присоединения наноантител на поверхности капсида). Полученная нами векторная система Ad5-EGFP-рIX-ER представляет собой универсальную платформу, которая посредством специфического присоединения на поверхности РПАН молекул на- ноантител против определенного (опухолеспецифи- ческого) поверхностного антигена может обеспечить доставку нужного гена в заданные (опухолевые) клетки.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Плазмидные векторы

В работе использовали плазмидный вектор pBluescript II SK (+) (Fermentas MBI, Литва), плазмидную систему pGEM-T-Easy (Promega, США); челночный вектор pShuttle-CMV-EGFP, содержащий промотор цитомегаловируса (CMV), репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и фрагмен- ты генома Ad5, плазмиду pAdEasy-1 (Stratagene, США).

### Препараты РПАН и бактериальные штаммы

РПАН Ad5-EGFP, содержащие полноразмерный геном аденовируса Ad5 и кассету экспрессии с ре- портерным геном зеленого флуоресцентного белка под контролем промотора цитомегаловируса, полу- чены ранее в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи [23].

В работе использовали клетки *Escherichia coli* штаммов DH5α и BJ5183.

### Клеточные линии

В работе использовали следующие линии клеток: HEK293 (клетки почки эмбриона человека, несущие E1-область Ad5), A549 (аденокарцинома легкого че- ловека), H1299 (немелкоклеточный рак легкого че- ловека), H460 (рак легкого человека), H292 (мукоэпи- телиоидная карцинома легкого человека), Lim1215 (аденокарцинома толстой кишки человека), SW480 (аденокарцинома толстой кишки человека), HCT-116

(рак толстой кишки человека). Клетки культивиро- вали в среде DMEM (минимальная среда Игла, мо- дифицированная Дульбекко) с добавлением 10% эм- бриональной сыворотки телят производства Hyclone (США), глутамина, пенициллина и стрептомицина.

### Ферменты

Специфические эндонуклеазы рестрик- ции, ДНК-лигаза фага T4 и другие ферменты полу- чены от фирм Promega (США), New England BioLabs (США), Fermentas MBI (Литва).

### Конструирование плазмид, кодирующих последовательности ER- или RE-доменов лейциновой молнии

Гетеродимеризирующиеся последовательности ER- или RE-доменов [17, 18] клонировали с помощью ПЦР (рис. 1) с использованием праймеров, представленных в таблице. При амплификации с парой прайме- ров ER1F и ER1R (для ER-домена) или RE1F и RE1R (для RE-домена) был получен ПЦР1-продукт раз- мером 97 п.н. (ПЦР1). При амплификации с прайме- рами ER2F и NotI-Cend-Zipper-rev (для ER-домена) или RE2F и NotI-Cend-Zipper-rev (для RE-домена) получен ПЦР2-продукт из 71 п.н. (ПЦР2). В сле- дующей ПЦР в качестве праймеров использовали ПЦР1- и ПЦР2-продукты и получили ПЦР3-продукт из 154 п.н., содержащий последовательность ER- или RE-доменов лейциновой молнии. Этот фрагмент затем встроили по сайтам XhoI и NotI в плазмидный вектор pBluescript II SK (+) и получили соответствен- но плазмиды pER и pRE, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерные гетеродимеризирующиеся домены. Правильность по- лученных последовательностей проверяли секве- нированием. Для удобства клонирования (введения на 5'-конец последовательности XhoI-сайта) третий нуклеотидный остаток G исходной последовательности заменяли на C, аминокислотная последователь- ность при этом полностью сохранялась.

### Конструирование плазмиды, несущей геном Ad5 с делецией E1-области, кассету с геном EGFP и гетеродимеризирующуюся последовательность лейциновой молнии на С-конец рIX

Для введения ER-домена на С-конец рIX была син- тезирована последовательность (ЗАО «Евроген»), со- держащая ген *pIX* с делетированным стоп-кодоном, спейсер (последовательность длиннейшей α-спирали аполипопротеина человека E4 (33 а.о.)) [18], поли- линкер с рестрикторными сайтами BamHI, Kpn2I, NotI, HindIII, AscI и SmaI для встраивания целевых лигандов и ген *pIVa2* (от 1 до 832 п.н.). Эта последо- вательность была клонирована в плазмидный век-

Праймеры, использованные для ПЦР-клонирования ER- и RE-последовательностей

Название праймера	Последовательность праймера
ER1F	5'-ccagaactcgagatcgaggcagctttctggaacgggagaacctgcactgg-3'
ER2F	5'-ccagcgtctgcggaaccgagtctcacagtatcgaactcgttacggacctctg-3'
ER1R	5'-tccgcagacgctggactcgctgccgagttcagctacacagatctccagtgcagtgttc-3'
RE1F	5'-ccagaactcgagatccgtgcagctttctgcgtcaacggaacctgcactgc-3'
RE2F	5'-ccagcgtctggagaacgaagtctcacagtatgaaactcgttacggacctctg-3'
RE1R	5'-tctccagacgctggacctctgctccagttcagctacctcagtacgcagtgcagtgttc-3'
NotI-Cend-Zipper-rev	5'-cgtacgggtagcggccgctcagagggtccgtaacgag-3'

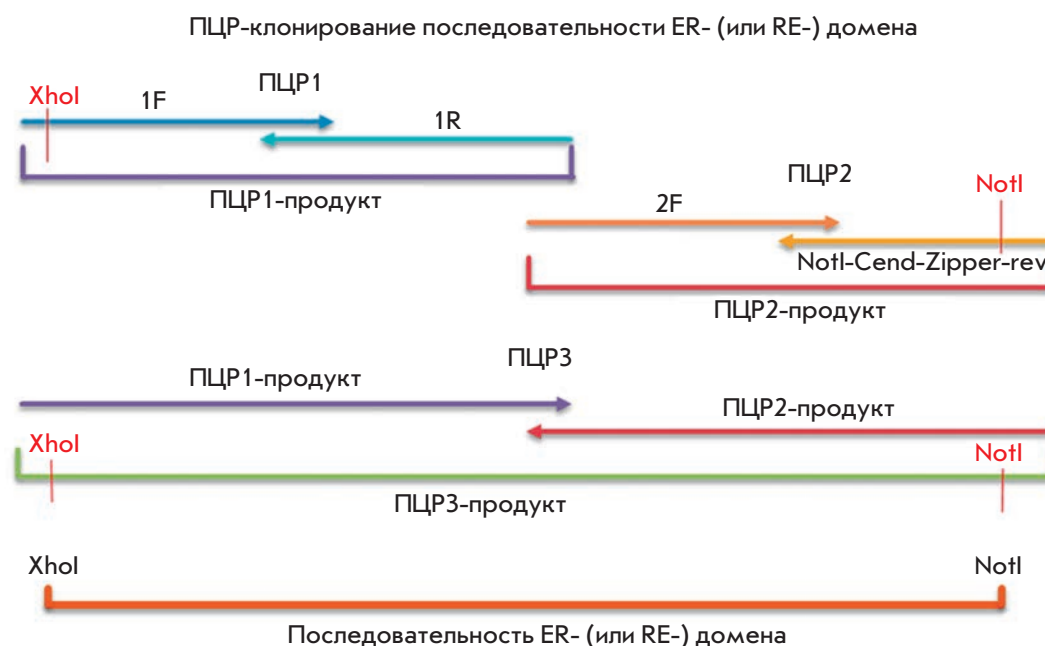


Рис. 1. Схема последовательных стадий клонирования (ПЦР1, ПЦР2 и ПЦР3). Для удобства клонирования (введения в 5'-конец последовательности XhoI-сайта) третий нуклеотидный остаток исходной последовательности заменяли с G на C, аминокислотная последовательность при этом полностью сохранялась

тор pBluescript II SK. В результате была получена плаزمида pBssk-pIX-mod, несущая ген *pIX* с сайтами для модификаций.

Нуклеотидную последовательность, кодирующую ER-домен, амплифицировали с помощью пары праймеров BamHI-zipp-forw (5'-gga-tcc-ctc-gag-atc-gag-gca-gct-ttc-c-3') и SwaI-zipp-rev (5'-att-taa-att-tac-aga-ggt-ccg-taa-cga-gtt-cg-3'), которые фланкировали 5'- и 3'-концевые участки лейциновой молнии и содержали сайты рестрикции BamHI и SwaI соответственно. В качестве матрицы использовали описанную выше плазмиду pER. ПЦР-продукт размером 146 п.н. клонировали в плазмидный вектор pGEM-T-Easy. Плазмиду pGEM-T-ER гидролизовали рестрик-

тазами BamHI и SwaI, последовательность, кодирующую лейциновую молнию, клонировали в плазмиду pBssk-pIX-mod по аналогичным сайтам рестрикции. Затем из плазмиды pBssk-pIX-ER по сайтам рестрикции AraI и HpaI вырезали фрагмент аденовирусного генома, содержащий модифицированный ген *pIX*, и клонировали в вектор pShCMV-EGFP по аналогичным сайтам. В результате был получен челночный вектор pShCMV-EGFP-pIX-ER, кодирующий модифицированную последовательность *pIX* с лейциновой молнией на C-конце и несущий кассету с репортерным геном *EGFP*. Данную плазмиду лиnearизовали по PmeI и котрансформировали вместе с плазмидой pAdEasy-1 в клетки *E. coli* BJ5183

как описано в AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene, США). В результате гомологичной рекомбинации была получена плаزمида pAd5-EGFP-pIX-ER, в состав которой вошли полноразмерный геном Ad5 с делецией E1-области, экспрессионная кассета с репортерным геном *EGFP* и фрагмент, кодирующий лейциновую молнию на C-конце pIX.

#### Получение, накопление и очистка pIX-модифицированных РПАН

РПАН были получены в результате трансфекции клеток линии HEK293 плазмидой pAd5-EGFP-pIX-ER, предварительно линейаризованной по сайту рестрикции PacI. Трансфекцию проводили с помощью реагента Metafectene Pro (Biontech, Германия). Ad5-EGFP-pIX-ER накапливали в культуре клеток линии HEK293. Препарат РПАН очищали и концентрировали ультрацентрифугированием лизатов зараженных клеток в градиенте плотности хлористого цезия. Количество РПАН в очищенном препарате определяли спектрофотометрически ( $\lambda = 260$  нм), используя коэффициент пересчета 1 о.е. =  $1.12 \times 10^{12}$  вирусных частиц/мл. Титр препарата Ad5-EGFP-pIX-ER определяли методом бляшкообразования на культуре клеток HEK293.

#### Антитела

В работе использовали коммерческие анти-CAR-поликлональные антитела (R&D systems, США, cat. #AF3336), мышинные сыворотки, содержащие анти-Ad-антитела, полученные в результате иммунизации мышей препаратом РПАН, вторичные лошадиные антитела (GE Healthcare, Великобритания), анти-НА-моноклональные антитела (CHGT-45P-Z, ICL, Inc., США).

#### Получение aCEA с дополнительным концевым RE-доменом

Получение однодоменных мини-антител (наноантител), узнающих раковый эмбриональный антиген (aCEA), проводили как описано ранее [24–28].

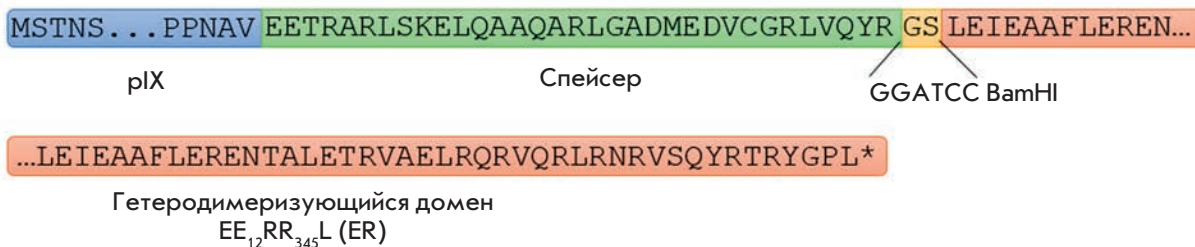
Двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* иммунизировали последовательно (5 раз) путем подкожного введения антигенного материала, смешанного с равным объемом полного (при первой инъекции) или неполного (при остальных инъекциях) адъюванта Фрейнда. В качестве антигена использовали белок РЭА человека (кат. номер R224) «Хема Медика» (Россия). Брали 0.26 мг белка для каждой инъекции. Вторую инъекцию (стадию иммунизации) проводили через 3 недели после первой, затем с интервалом в 2 недели проводили еще три иммунизации. Кровь (150 мл) забирали через 5 дней после последней инъекции. Далее из В-лимфоцитов вы-

деляли РНК, проводили синтез кДНК, двухступенчатую ПЦР и клонирование амплифицированных последовательностей, кодирующих наноантитела, в фагидном векторе pHEN4. Процедуру селекции проводили методом фагового дисплея [24–28], в котором в качестве фага-помощника использовали бактериофаг M13KO7 (New England BioLabs, США), а в качестве антигена, иммобилизованного на дне лунок 96-луночного ИФА-планшета, тот же препарат белка РЭА человека, что и для иммунизации. Отобранные методом фагового дисплея клоны кДНК, кодирующих наноантитела, клонировали в новый экспрессионный вектор, при этом к их 3'-концу добавляли дополнительные последовательности-метки (таги), кодирующие НА и (His)<sub>6</sub>, с целью повышения эффективности детекции и очистки экспрессируемых наноантител. Специфичность и относительную аффинность исходно отбираемых наноантител определяли с помощью иммуноферментного анализа по связыванию с иммобилизованным белком РЭА человека, а затем и с фиксированными культуральными клетками, на поверхности которых должен сверхэкспрессироваться РЭА. В результате тестирования из нескольких вариантов было отобрано одно наиболее эффективно работающее наноантитело, анти-РЭА/aCEA1. (Последовательность этого антитела, детали его получения и анализа описаны в недавно поданной заявке № 2012113421 на патент РФ: Тиллиб С.В. Однодоменное наноантитело aCEA1, специфически связывающее белок CEA.) Для того чтобы aCEA1 могло образовывать стабильный комплекс с модифицированным pIX Ad5 (pIX-ER), его модифицировали далее, как описано ранее [20], но вместо гомотримеризирующегося домена (ILZ) в данном случае добавляли домен RE, способный эффективно образовывать димер (лейциновую молнию) с ER-доменом. Схема аминокислотных доменов форматированного наноантитела aCEA-RE показана на рис. 2Б. Нарботанное в периплазме бактерий и очищенное, как описано ранее [20], наноантитело выявляется в виде индивидуальной полосы при электрофорезе в 14% SDS-полиакриламидном геле (рис. 3А).

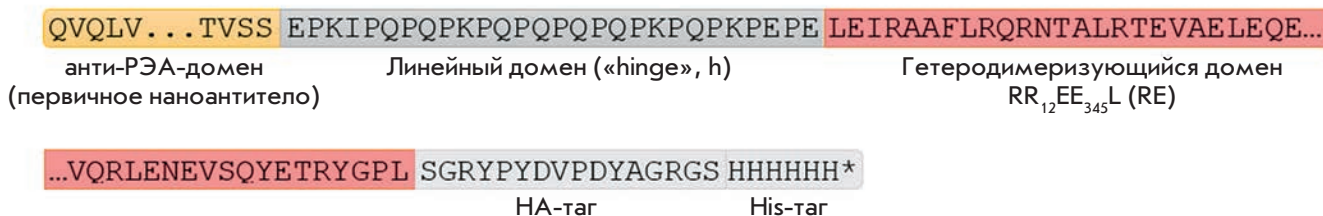
#### Имуноферментный анализ связывания лейциновых молний в составе pIX РПАН и в молекулах рекомбинантных наноантител

Поверхность лунок 96-луночного планшета сенсibilizировали раствором aCEA-RE в 40 мМ калий-карбонатном буфере (pH 9.6) из расчета 2 мкг антител на лунку. Сенсibilизацию проводили при +4°C в течение 12 ч. Затем планшет отмывали 3 раза 0.05% Твин-20 и 3 раза дистиллированной водой. Далее вносили раствор Ad5-EGFP-pIX-ER в концентрации 1 мкг/мл в рабочем буфере. В качестве контроля ис-

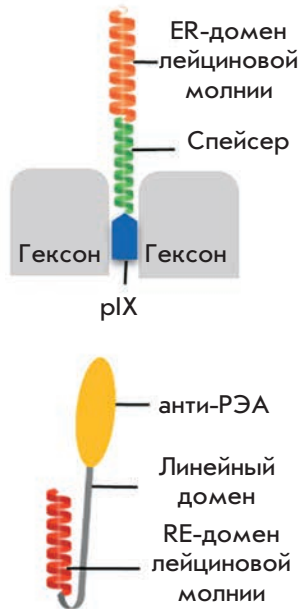
А



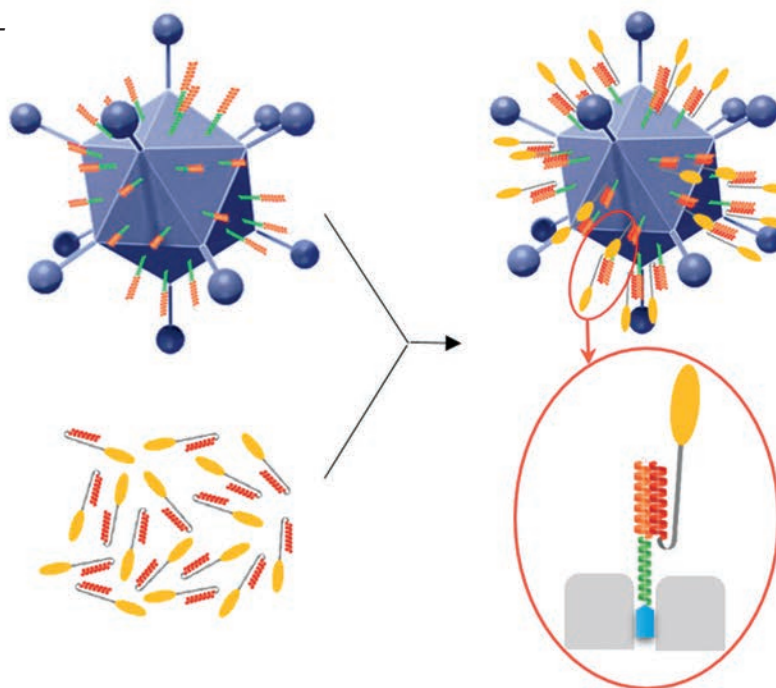
Б



В



Г

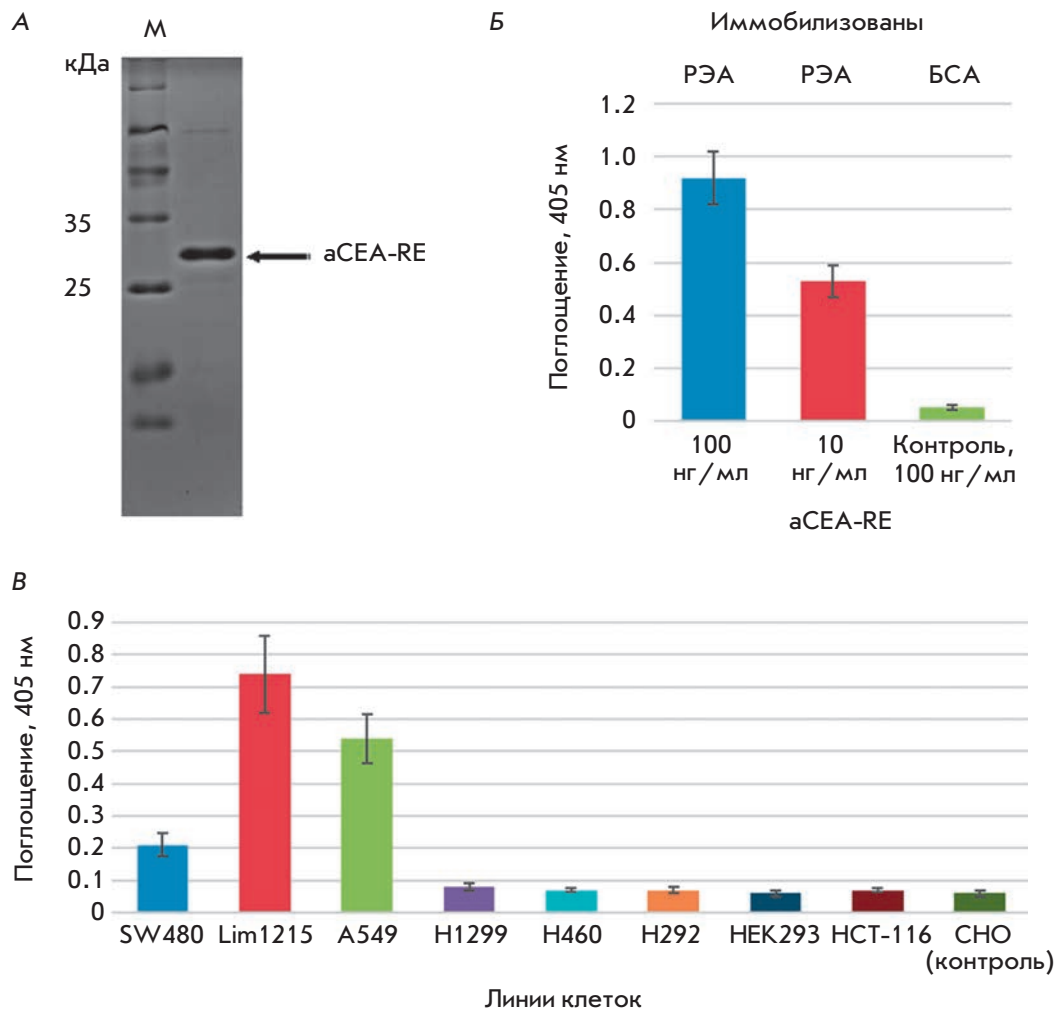


Комплекс Ad5-EGFP-pIX-ER/aCEA-RE

Рис. 2. Схематическое изображение строения рекомбинантных наноантител, структуры pIX со спейсером и ER-доменом лейциновой молнии и образование комплекса Ad5-EGFP-pIX-ER/aCEA-RE с измененным тропизмом. Схема аминокислотных доменов рекомбинантного pIX (А) и полученного химерного наноантитела аCEA-RE (Б). В – конфигурация комплементарных доменов лейциновой молнии, где один пришит к С-концу pIX Ad5 и экспонируется над поверхностью капсида за счет спейсера, а другой – к N-концу аCEA. Г – образование комплекса Ad5-EGFP-pIX-ER/aCEA-RE за счет гетеродимеризации ER- и RE-доменов лейциновых молний



**Рис. 3.** Иммуноферментный анализ связывания нанокантата аСЕА-РЕ с белком РЭА. **А** – электрофоретический анализ в 14% SDS-полиакриламидном геле очищенного аСЕА-РЕ. **Б** – иммуноферментный анализ связывания нанокантата аСЕА-РЕ с иммобилизованным белком РЭА человека. Нанокантата аСЕА-РЕ вносили в концентрации 100 и 10 нг/мл. В качестве контроля использовали лунки с иммобилизованным бычьим сывороточным альбумином. **В** – иммуноферментный анализ связывания нанокантата аСЕА-РЕ с РЭА на поверхности опухолевых клеток



пользовали Ad-EGFP. Планшет инкубировали в течение 1 ч при +37°C на шейкере, а затем отмывали. Вносили различные разведения мышинных сывороток в рабочем растворе (от 1 : 800 до 1 : 204800), содержащих анти-Ad-антитела. Смесь инкубировали (1 ч, +37°C) на шейкере, затем планшет отмывали и вносили антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, в рабочем разведении 1 : 10000 в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7.4 с 0.05% Твин-20. Реакцию проявляли ТМВ-индикаторной смесью. Для остановки реакции использовали 4 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность окрашенного продукта пероксидазной реакции определяли на приборе iEMS Reader MF (Thermo labsystems) при длине волны 450 нм.

**Иммуногистохимический анализ связывания нанокантата аСЕА-РЕ с антигеном (РЭА) как очищенным, так и на поверхности клеток**

Способность нанокантата аСЕА-РЕ связываться с иммобилизованным в лунках иммунологической

плашки белком РЭА человека проверяли с использованием стандартного протокола иммуноферментного анализа. Контролем служили лунки с иммобилизованным бычьим сывороточным альбумином (БСА). В качестве вторичных антител к НА-тагу на С-конце проверяемого нанокантата использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-НА-моноклональные антитела. Активность пероксидазы хрена определяли, используя в качестве хромогенного субстрата АВТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат). Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм с помощью планшетного флуориметра. Контрольные лунки (с иммобилизованным БСА) не содержали антиген, далее они были блокированы и процессированы параллельно с экспериментальными ячейками (с антигеном).

Возможность применения полученного нанокантата для детекции РЭА, экспрессирующегося на поверхности опухолевой клетки, проверяли с помощью иммуноферментного анализа на иммобилизованных/

фиксированных клетках. Использовали следующие линии клеток: A549, H1299, H460, H292, Lim1215, SW480, HCT-116. Негативным контролем служили клетки линии HEK293 (происходящей из клеток эмбриональной почки человека), в которых, согласно опубликованным данным, белок РЭА не детектируется. Другим отрицательным контролем были клетки яичников китайского хомячка (CHO). Клетки рассеивали на 96-луночный планшет по  $10^4$  клеток на лунку. На следующий день клетки 3 раза промывали раствором PBS и фиксировали в 3.7% растворе забуференного формальдегида в течение 10 мин. Фиксацию останавливали, добавляя раствор глицина до концентрации 125 мМ, фиксированные клетки промывали 3 раза раствором PBS, затем блокировали в растворе 1% БСА,  $1 \times$  PBS в течение 2 ч, после чего споласкивали  $1 \times$  PBS и добавляли раствор ( $1 \times$  PBS, 0.1% БСА) с наноантителом аСЕА-RE в концентрации 100 нг/мл. В качестве вторичных антител к HA-тагу на С-конце проверяемого наноантитела аСЕА-RE использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-HA-моноклональные антитела. Активность пероксидазы хрена определяли, используя в качестве хромогенного субстрата ABTS. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм с помощью планшетного флуориметра. Контрольные лунки (с иммобилизованными клетками линии HEK293 и CHO) были блокированы и процессированы параллельно с экспериментальными ячейками.

#### **Анализ термостабильности рIX-модифицированных РПАН**

Культуру клеток HEK293 рассеивали на 24-луночный планшет по  $10^5$  клеток на лунку. Через 24 ч монослой клеток инфицировали препаратом аденовируса ( $10^3$  вирусных частиц на клетку в 200 мкл среды). Предварительно образцы инкубировали при  $+37$  и  $+42^\circ\text{C}$  в течение 5, 15 и 30 мин. Через 24 ч определяли количество флуоресцирующих клеток с помощью проточной цитофлуориметрии (Becton Coulter Cytomix FC-500, США).

#### **Трансдукция препаратом РПАН эукариотических клеток с заблокированными CAR-рецепторами**

Культуру клеток A549 и Lim1215 рассеивали на 48-луночный планшет по  $2 \times 10^4$  клеток на лунку, затем добавляли анти-CAR-антитела в концентрации 10 мг/мл. Клетки инкубировали в течение 30 мин при  $+37^\circ\text{C}$ , раствор антител удаляли, клетки промывали и трансдуцировали препаратами РПАН из расчета 500 вирусных частиц на клетку. Эти препараты предварительно инкубировали при  $+4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин при постоянном перемешивании с аСЕА-RE в соотношении одна вирусная частица на 240 молекул

антител. Не связавшиеся РПАН удаляли, через 24 ч после трансдукции определяли относительное количество флуоресцирующих клеток с помощью проточной цитофлуориметрии (Becton Coulter Cytomix FC-500, США).

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **Получение рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц с модифицированным белком rIX**

В 2009 году J.N. Glasgow и соавт. провели исследование. К С-концу отростка пентона Ad5 они «привязали» лейциновую молнию, с помощью которой капсид Ad5 был способен специфически связываться с одноцепочечными антителами, несущими комплементарную лейциновую молнию, благодаря чему РПАН меняли свой тропизм и обеспечивали целевую доставку гена [18]. Целью нашей работы было получение РПАН на основе Ad5, несущих последовательность лейциновой молнии на С-конце rIX. Мы предположили, что аналогичная модификация rIX позволит получить более эффективный вектор для доставки целевых генов. Это связано с тем, что на поверхности одного капсида Ad5 располагается 240 мономеров rIX и 36 мономеров отростка пентона, поэтому с rIX-модифицированными РПАН будет связываться значительно больше антител, чем с аденовирусами с модификацией отростка пентона. Однако непосредственное присоединение какого-либо пептида может привести к созданию конформационных помех для сборки РПАН, так как С-конец rIX находится между расположенными рядом гексонами капсида [29]. Поэтому между С-концом rIX и лейциновой молнией в качестве спейсера мы ввели последовательность самой длинной  $\alpha$ -спирали аполипопротеина человека E4, которая, как показали J. Vellinga и соавт. [30], наиболее эффективна и при этом несущественно влияет на сборку Ad. Такой спейсер позволяет экспонировать лейциновую молнию над поверхностью капсида и таким образом повышать эффективность ее взаимодействия с рекомбинантными наноантителами (рис. 2) [30].

Рекомбинантный вектор Ad5-EGFP-rIX-ER, кодирующий rIX, содержащий на С-конце последовательность спейсера и ER-домен лейциновой молнии, получен с помощью гомологичной рекомбинации в *E. coli*.

#### **Характеристика препарата РПАН Ad5-EGFP-rIX-ER**

Полученный препарат РПАН Ad5-EGFP-rIX-ER был охарактеризован по следующим параметрам: концентрация вирусных частиц в препарате, кон-

центрация бляшкообразующих частиц в препарате, термостабильность.

Концентрация препарата Ad5-EGFP-pIX-ER составила  $6.5 \times 10^{12}$  вирусных частиц/мл и  $4.0 \times 10^{10}$  БОЕ/мл. Концентрация контрольного вектора Ad5-EGFP –  $6.3 \times 10^{12}$  вирусных частиц/мл и  $6.0 \times 10^{10}$  БОЕ/мл. Полученные данные свидетельствуют о том, что внесенная в капсид аденовируса модификация не повлияла на эффективность сборки вирионов и на качество препарата, определяемое соотношением вирусных частиц и бляшкообразующих единиц (162.5 и 105 для Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP соответственно).

Одна из проблем, связанная с модификацией капсидных белков Ad, – изменение стабильности получаемых РПАН. Основная функция pIX заключается в стабилизации взаимодействий между соседними гексонами [31], а внесение модификаций в pIX приводит к дестабилизации структуры капсида [32]. Поэтому мы проверили, влияет ли введение в структуру pIX ER-домена лейциновой молнии на целостность структуры вирионов, сравнивая термостабильность модифицированного Ad5-EGFP-pIX-ER вектора с немодифицированным Ad5-EGFP.

Препараты РПАН Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP инкубировали при 37 и 42°C в течение 5, 15 и 30 мин, затем определяли количество инфицированных клеток (рис. 4).

Инфекционность Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP сохраняется при нагревании до +37°C в течение 5, 15 и 30 мин. При этом при нагревании до +42°C через 5 мин эффективность трансдукции Ad5-EGFP-pIX-ER снижается на 32%, а через 15 мин и более приближается к 0%, в то время как инфекционность Ad5-EGFP при тех же условиях через 5 мин полностью сохранилась, а через 15 и 30 мин снизилась на 20 и 43% соответственно. Полученные нами данные показывают, что введение ER-домена лейциновой молнии в структуру pIX снижает термостабильность Ad5-EGFP-pIX-ER по сравнению с препаратом РПАН, содержащим pIX дикого типа, однако они согласуются с опубликованными данными [33, 34].

#### Эффективность связывания ER-домена лейциновой молнии в составе pIX РПАН с комплементарным RE-доменом лейциновой молнии на рекомбинантных наноантителах

Способность ER-лейциновой молнии в составе pIX связываться с комплементарной ей последовательностью RE-лейциновой молнии на рекомбинантных анти-РЭА определяли с помощью ИФА. Лунки 96-луночного планшета высокой сорбции сенсibilizировали aCEA-RE. После инкубации несвязавшиеся антитела отмывали и вносили Ad5-EGFP-pIX-ER.

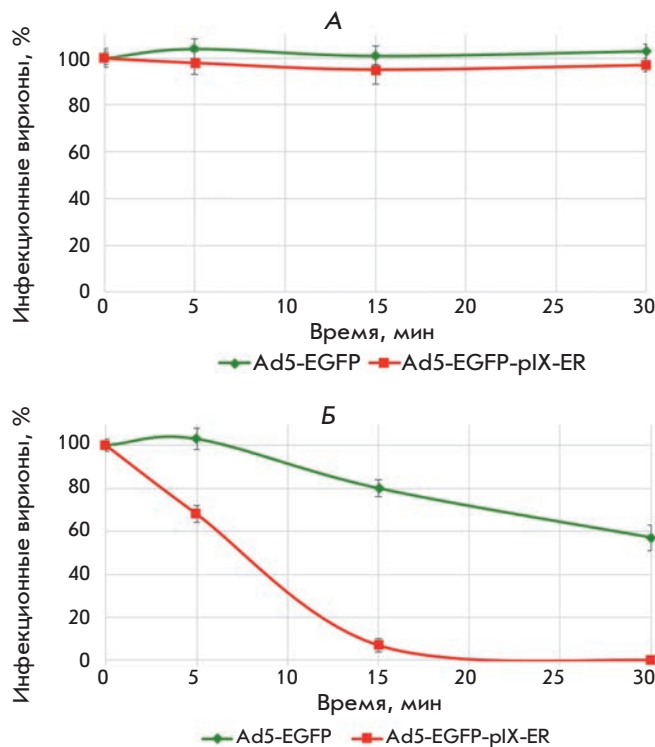


Рис. 4. Термостабильность Ad5-EGFP-pIX-ER. Препараты Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP инкубировали при 37°C (А) и при 42°C (Б) в течение 5, 15 и 30 мин. Затем клетки линии HEK293 инфицировали вирусами в количестве  $10^3$  вирусных частиц/клетку. Через 24 ч определяли количество флуоресцирующих клеток с помощью проточной цитофлуориметрии

Несвязавшиеся с наноантителами РПАН отмывали, образование комплекса Ad5-EGFP-pIX-ER/aCEA-RE определяли с помощью анти-Ad-антител (рис. 5).

Таким образом, мы показали, что присутствие лейциновых молний в составе Ad5-EGFP-pIX-ER и наноантител позволяет специфически адсорбировать рекомбинантные наноантитела на РПАН за счет взаимодействия гидрофобных сторон ER- и RE-доменов лейциновых молний.

#### Выбор линий клеток, на поверхности которых экспонирован РЭА, с которым может эффективно связываться полученное наноантитело aCEA-RE

На следующем этапе работы мы определили способность наноантител aCEA-RE специфически связываться с РЭА – не только с выделенным, но и с экспонированным на клеточной поверхности.

На рис. 3Б представлен результат иммуноферментного анализа, из которого следует, что наноантитело aCEA-RE специфически связывается с иммобилизованным белком РЭА человека в концентрации

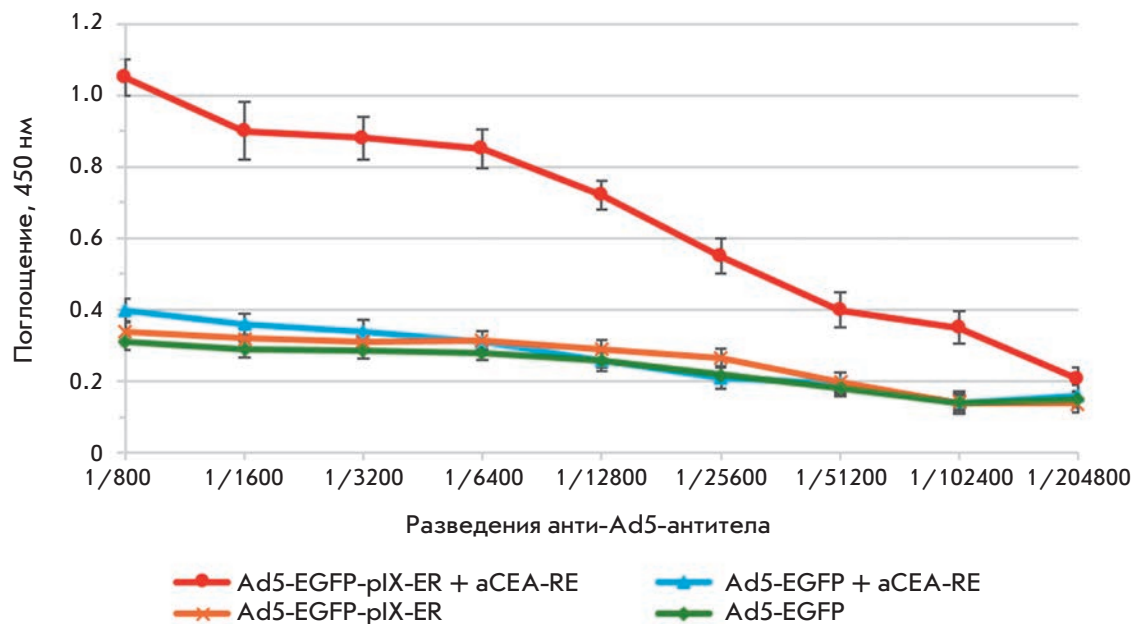


Рис. 5. Иммуноферментный анализ связывания Ad5-EGFP-pIX-ER с наноантителами aCEA-RE

100 и 10 нг/мл. В качестве контроля использовали лунки с иммобилизованным бычьим сывороточным альбумином. Интенсивность сигнала (величина поглощения  $\lambda = 405$  нм) отражает эффективность связывания наноантитела.

Узнавание наноантителами изолированного РЭА еще не означает, что узнаваемый эпитоп этого белка будет доступен, когда этот белок локализуется на поверхности клетки. Возможность использования полученного наноантитела для детекции РЭА, сверхэкспрессированного на поверхности опухолевой клетки, проверяли с помощью сравнительного иммуноферментного анализа на культурах клеток линий SW480, Lim1215, A549, H1299, H460, H292, HCT-116. В качестве негативного контроля использовали клетки линий НЕК293 и CHO. На рис. 3В представлены результаты иммуноферментного анализа.

Как и в случае изолированного белка РЭА, наноантитело aCEA-RE эффективно работает в концентрации 100 нг/мл. Специфическое узнавание клеток A549 и Lim1215 связано с повышенной экспрессией РЭА, который располагается на поверхности этих клеток. Напротив, в контрольных клетках НЕК293 белок РЭА практически не экспрессируется, и этому соответствует фоновое значение оптической плотности в соответствующих ячейках. Аналогично фоновый сигнал наблюдается и в случае контрольных клеток линии яичников китайского хомячка (CHO).

В результате анализа было показано, что рекомбинантное наноантитело aCEA-RE способно специфически взаимодействовать с двумя клеточными линиями – A549 и Lim1215. Эти линии клеток использовали

в дальнейших экспериментах по изучению эффективности трансдукции. На данный момент мы можем только предполагать, почему из семи проверенных клеточных линий только две специфически связывались с наноантителом. Это может быть обусловлено, например, с разной доступностью узнаваемого наноантителом эпитопа белка РЭА на поверхности клеток исследуемых линий, а также с потенциально возможной утратой РЭА на поверхности некоторых линий в результате бесконтрольного продолжительного культивирования.

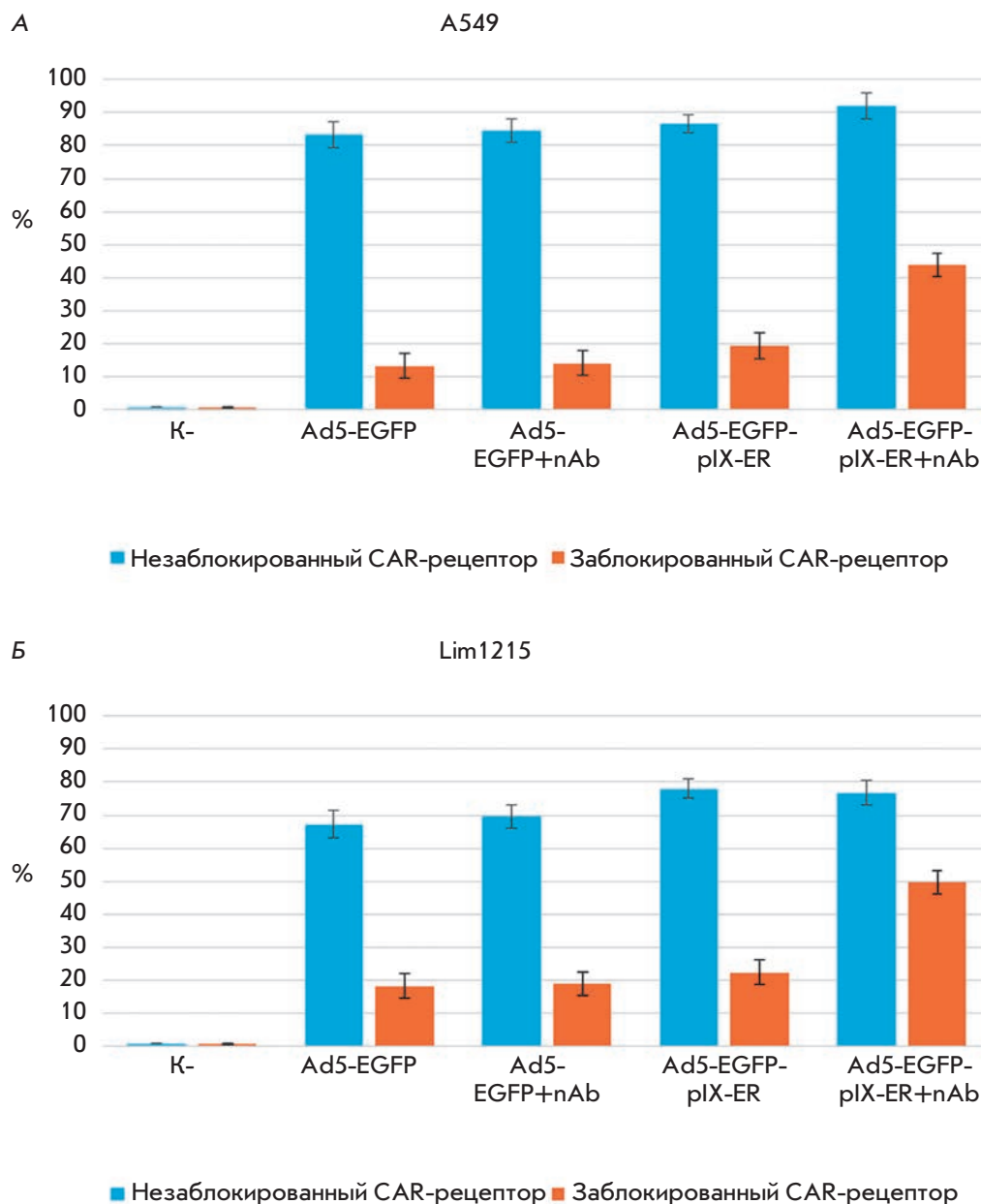
#### Ad5-EGFP-pIX-ER, связанный с aCEA-RE, способен к эффективной трансдукции опухолевых клеток CAR-независимым путем

На данном этапе работы мы оценили эффективность проникновения Ad5-EGFP-pIX-ER, связанного с aCEA-RE, в опухолевые клетки. В связи с тем, что на поверхности клеток A549 и Lim1215 содержится большое количество CAR-рецепторов [35], природных рецепторов Ad5, необходимо было их заблокировать. С этой целью клеточные линии A549 и Lim1215 инкубировали с анти-CAR-антителами в концентрации 10 мг/мл, а затем трансдуцировали Ad5-EGFP-pIX-ER, предварительно «нагруженным» анти-РЭА. В качестве контроля использовали Ad5-EGFP-pIX-ER (без анти-РЭА), Ad5-EGFP, а также Ad5-EGFP, «нагруженный» анти-РЭА (рис. 6).

Было показано, что Ad5-EGFP-pIX-ER, несущий на поверхности капсида aCEA-RE, в 3 раза более эффективно трансдуцирует клетки A549 и Lim1215 в условиях заблокированных CAR-рецепторов, чем



**Рис. 6.** Трансдукция опухолевых клеток Ad5-EGFP-pIX-ER. Клетки линий A549 (А) и Lim1215 (Б) инкубировали с анти-CAR-антителами в концентрации 10 мг/мл в течение 30 мин при +37°C. После инкубации клетки заражали Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP в дозе 500 вирусных частиц на клетку, предварительно инкубируемых в течение 30 мин при +4°C с aCEA-RE в соотношении одна вирусная частица на 240 молекул анти-тел. Количество трансдуцированных клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии



препараты РПАН, не несущие на своей поверхности наноантител. Стоит отметить, что в культуре A549 только 40–60% клеток экспрессируют РЭА [36], поэтому можно предположить, что эффективность проникновения модифицированных РПАН в опухолевые клетки будет существенно больше при использовании наноантител против других опухолеспецифичных рецепторов либо других линий опухолевых клеток.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Получены pIX-модифицированные РПАН на основе генома Ad5, несущие на поверхности капсида лейциновые молнии. Доказана способность такого Ad5

адсорбировать на своей поверхности наноантитела, несущие комплементарную последовательность лейциновой молнии. Показано, что РПАН с лейциновыми молниями, нагруженный aCEA-RE, в 3 раза более эффективно проникает в опухолевые клетки линий A549 и Lim1215 CAR-независимым путем, чем немодифицированный препарат Ad5-EGFP и Ad5-EGFP-pIX-ER без адсорбции наноантител на поверхности капсида.

Таким образом, опираясь на результаты нашей работы, можно полагать, что полученный нами вектор Ad5-EGFP-pIX-ER можно использовать в качестве универсальной платформы, которая посредством

специфического присоединения к поверхности РПАН молекул наноантител против определенного (опухолеспецифичного) поверхностного антигена может обеспечить доставку целевого гена в заданные (опухолевые) клетки. Вместо наноантител в принципе может быть использован любой другой соответственно адаптированный белок, обладающий свойством специфического узнавания интересующей исследователя мишени. ●

*Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 8779), а также частично поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН № 24 «Фундаментальные основы технологий наноструктур и наноматериалов» (грант С.В.Т.).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bonnekoh B., Greenhalgh D.A., Chen S.H., Block A., Rich S.S., Krieg T., Woo S.L., Roop D.R. // *J. Invest. Dermatol.* 1998. V. 110. № 6. P. 867–871.
- Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999. V. 10. № 5. P. 440–447.
- The Journal of Gene Medicine. Clinical Trials Database. <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>
- Zhang Y., Bergelson J.M. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 19. P. 12125–12131.
- Vindrieux D., Le Corre L., Hsieh T.J., Metivier R., Escobar P., Caicedo A., Brigitte M., Lazennec G. // *Endocr. Relat. Cancer.* 2011. V. 18. № 3. P. 311–321.
- Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T. // *Mol. Ther.* 2003. V. 8. № 5. P. 813–821.
- Breidenbach M., Rein D.T., Everts M., Glasgow J.N., Wang M., Passineau M.J. // *Gene Therapy.* 2005. V. 12. № 5. P. 187–193.
- Korokhov N., Mikheeva G., Krendelshchikov A., Belousova N., Simonenko V., Krendelshchikova V., Pereboev A., Kotov A., Kotova O., et al. // *J. Virol.* 2003. V. 77. № 24. P. 12931–12940.
- Terao S., Acharya B., Suzuki T., Aoi T., Naoe M., Hamada K., Mizuguchi H., Gotoh A. // *Anticancer Res.* 2009. V. 29. № 8. P. 2997–3001.
- Hiwasa K., Nagaya H., Terao S., Acharya B., Hamada K., Mizuguchi H., Gotoh A. // *Anticancer Res.* 2012. V. 32. № 8. P. 3137–3140.
- Hongju W., Han T., Belousova N., Krasnykh V., Kashentseva E., Dmitriev I., Kataram M., Mahasresheti P.J., Curiel D.T. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 6. P. 3382–3390.
- Vigne E., Mahfouz I., Dedieu J.F., Brie A., Perricaudet M., Yeh P. // *J. Virol.* 1999. V. 73. № 6. P. 5156–5161.
- Dmitriev I.P., Kashentseva E.A., Curiel D.T. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 14. P. 6893–6899.
- Vellinga J., van der Heijden S., Hoeben R.C. // *J. Gen. Virol.* 2005. V. 86. № 6. P. 1581–1588.
- Davison E., Diaz R.M., Hart I.R., Santis G., Marshall J.F. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 80. P. 6204–6207.
- Iyer S.V., Davis D.L., Seal S.N., Burch J.B. // *Mol. Cell. Biol.* 1991. V. 11. № 10. P. 4863–4875.
- Möll J.R., Ruvini S.B., Pastan I., Vinson C. // *Protein Sci.* 2001. V. 10. P. 649–655.
- Glasgow J.N., Mikheeva G., Krasnykh V., Curiel D.T. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 12. P. 8355.
- Тиллиб С.В. // *Молекуляр. биология.* 2011. Т. 45. № 1. С. 77–85.
- Tillib S., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Saakyan S.A., Gribova I.Y., Tutykhina I.L., Sedova E.S., Ly-senko A.A., Shmarov M.M., et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. P. 245–254.
- Грибова И.Ю., Тиллиб С.В., Тutykhina И.Л., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Верховская Л.В., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // *Acta Naturae.* 2011. Т. 3. № 3(10). С. 66–72.
- Tutykhina I., Sedova E., Gribova I., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A., Shmarov M., Logunov D., Naroditsky B., et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 3. P. 318–328.
- Shmarov M.M., Cherenova L.V., Shashkova E.V., Logunov D.U., Verkhovskaia L.V., Kapitonov A.V., Neugodova G.L., Dronin K.K., Naroditskiĭ B.S. // *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2002. V. 2. P. 30–35.
- Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. // *Nature.* 1993. V. 363. P. 446–448.
- Nguyen V.K., Desmyter A., Muyldermans S. // *Adv. Immunol.* 2001. V. 79. P. 261–296.
- Saerens D., Kinne J., Bosmans E., Wernery U., Muyldermans S., Conrath K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 51965–51972.
- Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyldermans S., Cardoso M.C., et al. // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. № 11. P. 887–889.
- Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А. Фингерпринтный анализ селекции «наноантител» методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников. // *Acta Naturae.* 2010. Т. 2. № 3(6). С. 100–108.
- Ghosh-Choudhury G., Haj-Ahmad Y., Graham F.L. // *EMBO J.* 1987. V. 6. № 6. P. 1733–1739.
- Vellinga J., Rabelink M.J., Cramer S.J., van den Wollenberg D.J., van der Meulen H., Leppard K.N., Fallaux F.J., Hoeben R.C. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 7. P. 3470–3479.
- Boulanger P., Lemay P., Blair G.E., Russell W.C. // *J. Gen. Virol.* 1979. V. 44. № 3. P. 783–800.
- Mathis J.M., Bhatia S., Khandelwal A., Kovesdi I., Lokitz S.J., Odaka Y., Takalkar A.M., Terry T., Curiel D.T. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 2. P. 16792.
- Campos S.K., Parrott M.B., Barry M.A. // *Mol. Ther.* 2004. V. 9. № 6. P. 942–954.
- Tang Y., Le L.P., Matthews Q.L., Han T., Wu H., Curiel D.T. // *Virology.* 2008. V. 377. № 2. P. 391–400.
- Davison E., Kirby I., Whitehouse J., Hart I., Marshall J.F., Santis G. // *J. Gene Med.* 2001. V. 3. № 6. P. 550–559.
- Simpson H.D., Barras F. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 15. P. 4611–4616.

УДК 616.981.48:575

# Оптимизация схемы выделения и рефолдинга внеклеточного домена HER2, экспрессированного в клетках *Escherichia coli*

В. В. Долгих, И. В. Сендерский, Г. В. Тец, В. В. Тец\*

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

\*E-mail: vtetzv@yahoo.com

Поступила в редакцию 07.06.2013

После доработки 10.02.2014

**РЕФЕРАТ** Рецептор-2 эпидермального ростового фактора человека (HER2/neu, c-erbB2) является протоонкогенным белком размером 185 кДа, характеризующимся гиперэкспрессией при ряде онкологических заболеваний, включающих 30% случаев рака молочной железы. Иммунодиагностика HER2-статуса опухоли имеет большое значение для успешной борьбы с заболеванием, в связи с чем получение значительных количеств экстраклеточного домена (ECD) HER2 остается весьма актуальной задачей. Нарботка ECD HER2 в *Escherichia coli* имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием эукариотических систем экспрессии, однако большая часть рекомбинантного продукта накапливается в бактериях в виде нерастворимых белковых включений. В данной работе мы осуществили эффективную наработку ECD HER2 в *E. coli* в виде нерастворимых белковых включений и предложили простую, эффективную и быстроисполнимую схему солиubilизации, рефолдинга и выделения белка в растворимой форме.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** бактериальная экспрессия, рефолдинг, рецептор эпидермального фактора роста, экстраклеточный домен.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ECD HER2 – экстраклеточный домен рецептора-2 эпидермального ростового фактора человека; ДСН-ПААГЭ – электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия.

## ВВЕДЕНИЕ

Рецептор-2 эпидермального ростового фактора человека (HER2/neu, c-erbB2) представляет собой протоонкогенный белок размером 185 кДа, состоящий из трех основных доменов – экстраклеточного, трансмембранного и внутриклеточного, обладающего тирозин-киназной активностью [1]. В нормальных клетках белок образует гетеродимеры с другими представителями семейства эпидермальных ростовых факторов человека и участвует в регуляции процессов клеточной пролиферации и дифференцировки [2]. Значительная часть онкологических заболеваний, включающих 30% случаев рака молочной железы, а также некоторые злокачественные опухоли яичника, желудка и других органов, сопровождается гиперэкспрессией белка HER2. При этом высокий уровень экспрессии белка характерен для рецидивных форм рака с плохим прогнозом [2]. Для лечения HER2-позитивных заболеваний достаточно эффективной является терапия на основе таргетного пре-

парата герцептин (Трастузумаб). В последнее время были разработаны новые таргетные препараты: пертузумаб, ингибирующий процесс димеризации HER2 с другими рецепторами, а также иммунотоксин трастузумаб-эмантин, представляющий собой конъюгат герцептина и цитотоксичного агента мертанзина. Таким образом, иммунодиагностика HER2-статуса опухоли имеет большое значение для успешной борьбы с заболеванием. Наряду с иммунохимическими и иммуногистохимическими методами анализа материала, полученного с помощью биопсии, в последнее время все больше внимания уделяется выявлению в сыворотке больных пациентов белка HER2. В крови циркулирует N-концевая часть молекулы, представленная экстраклеточным доменом (ECD) белка [3], к которой у изученных пациентов вырабатываются специфичные антитела [4]. В ряде работ была показана корреляция между тяжестью заболевания и уровнем ECD HER2 в сыворотке пациентов [5]. Однако позднее были получены результаты, свиде-

тельствующие о том, что эта зависимость не столь очевидна и ее подтверждение требует дальнейшего анализа [6, 7].

Приведенные выше данные свидетельствуют об актуальности получения значительных количеств ECD HER2 в очищенном виде, который необходим для наработки диагностических антител и анализа титра антител в сыворотке пациентов, а также для создания таргетных препаратов нового поколения [8].

Наработка ECD HER2 в бактериях *Escherichia coli* имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием эукариотических систем экспрессии. В первую очередь это более значительный выход рекомбинантного продукта и его более низкая стоимость [9]. Другой вариант получения сравнительно недорогого белка связан с экспрессией ECD HER2 в дрожжевых грибах *Pichia pastoris* и сопровождается высокой степенью маннозилирования белка, что нехарактерно для нативных молекул, синтезируемых в организме человека [10]. Следует признать, что ECD HER2 имеет семь сайтов N-гликозилирования и экспрессия белка в *E. coli* не позволяет получить белок с соответствующими посттрансляционными модификациями. Однако нарабатываемый в бактериях продукт представляет несомненный интерес для разработки тест-систем и отбора соответствующих антител. Существенным недостатком при экспрессии ECD HER2 в клетках *E. coli* является также накопление рекомбинантного продукта в виде нерастворимых белковых включений.

В частности, гетерологичная экспрессия последовательности, кодирующей ECD HER2 (вместе с сигнальным пептидом) в векторах pGEX-6P-1 и pQE30, позволила получить рекомбинантные белки, слитые соответственно с N-концевыми глутатион-S-трансферазой (GST-ECD HER2) и последовательностью, состоящей из шести остатков гистидина [9]. В обоих случаях почти весь продукт экспрессии накапливался в бактериальных клетках в виде нерастворимых включений. При этом использование авторами разнообразных схем рефолдинга, связанных с изменением pH, температуры, времени инкубации, концентрации мочевины, EDTA (этилендиаминтетрауксусной кислоты), L-аргинина, окисленного и восстановленного глутатиона, незначительно влияло на эффективность рефолдинга GST-ECD HER2. Для различных использованных схем она составила 63–92% от максимально достигнутого значения. Сами авторы отмечают, что из семи проанализированных факторов только pH и время инкубации оказывали влияние на эффективность рефолдинга белка. Это позволило предположить, что накапливающийся в бактериях в виде белковых включений рекомби-

нантный ECD HER2 может быть переведен в растворимое состояние с использованием несложных процедур разведения, концентрирования и диализа.

В предыдущем исследовании мы повторили экспрессию ECD HER2 в бактериях *E. coli* с использованием вектора pRSET (Life Technologies) под контролем высокоактивного промотора бактериофага T7 [11]. В использованной конструкции был удален N-концевой сигнальный пептид, ответственный за секрецию HER2 и отрезаемый в ходе его транслокации в просвет эндоплазматического ретикула. При этом конструкция вектора подразумевает добавление к рекомбинантному белку N-концевого пептида с полигистидиновой последовательностью. В данном исследовании полученный в виде нерастворимых белковых включений рекомбинантный белок был использован для демонстрации возможности его солюбилизации и рефолдинга с использованием максимально простой, быстровыполнимой схемы, не требующей наличия сложного набора реактивов. В работе также показано важное значение SH-реагентов для эффективного растворения белковых включений, образуемых ECD HER2.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

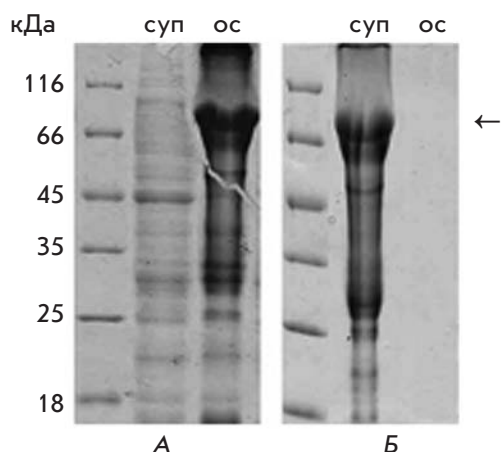
Процедуры клонирования последовательности, кодирующей ECD HER2 человека в векторе pRSET, эффективной наработки рекомбинантного белка в штамме C41 *E. coli*, выделения, отмывки и хранения белковых включений подробно описаны ранее [11].

Подходы, использованные для солюбилизации и восстановления нативной конформации рекомбинантного белка, приведены при описании результатов исследования.

Очистку белка методом металлохелатной хроматографии осуществляли на колонке со смолой HIS-Select® (Sigma-Aldrich), уравновешенной раствором, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 0.3 М NaCl и 10 мМ имидазол. Для этого раствор белка, дополнительно содержащего те же компоненты, пропускали через колонку, связавшийся материал промывали уравновешивающим буфером и элюировали в присутствии 0.3 М имидазола. Полученные фракции объединяли, концентрировали с использованием центрифужных концентраторов Centricon (Millipore), пропускающих молекулы размером до 30 кДа, и хранили при –20°C в присутствии 50% глицерина. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Брэдфорд [12].

Электрофорез белков в 12% полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГЭ) осуществляли с использованием камеры Mini-PROTEAN® (Bio-Rad). Для проведения иммуноблотинга белки





**Рис. 1.** Анализ осадков (ос) и супернатантов (суп) после экстракции рекомбинантного ECD HER2 из белковых включений. Использовали следующие растворы: А – 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 8 М мочевины; Б – 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 8 М мочевины, 1% 2-меркаптоэтанол. Белки разделяли методом ДСН-ПААГЭ в 12% геле и окрашивали красителем Кумасси R-250. Полосы, соответствующие изучаемому белку, указаны стрелкой

после ДСН-ПААГЭ переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot® согласно инструкции того же производителя. Мембраны блокировали 1 ч в присутствии ТТБС (50 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 150 мМ NaCl, 0.05% Твин-20), 1% БСА и инкубировали с разбавленным тем же раствором 1 : 3000 анти-polyHis-антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich) в течение ночи при 4°C. После отмывки в ТТБС и затем в ТБС (ТТБС без добавления Твин-20) мембрану инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции, содержащем ТБС, 15% метанол, 0.05% 4-хлоро-1-нафтол (Sigma-Aldrich), 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

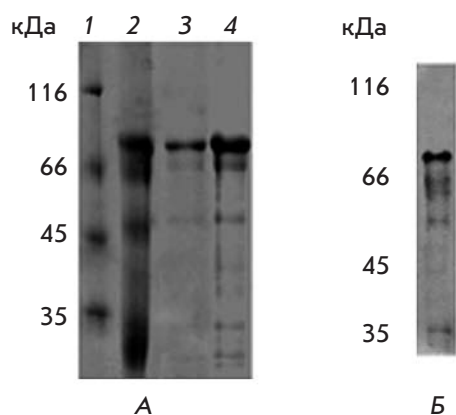
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования мы наработали в бактериях и выделили рекомбинантный ECD HER2 в виде нерастворимых белковых включений по ранее описанному методу [11]. Далее для растворения белковых включений была повторена схема, использованная для GST-ECD HER2 [9], с точным соблюдением описанной процедуры. Белковые включения ресуспендировали в растворе, содержащем 10 мМ Трис-НСl, 0.1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 М мочевины, 5 мМ дитиотреитол (рН 8.0), и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После центрифугиро-

вания растворимого материала при 14000 g в течение 10 мин осадки ресуспендировали в том же растворе до объема супернатанта и в полученных пробах сравнивали содержание рекомбинантного белка с помощью ДСН-ПААГЭ. Эксперимент показал, что после использования данной схемы растворения примерно половина рекомбинантного белка остается в нерастворимом состоянии (не показано). Более того, данный результат наблюдался только при использовании свежеприготовленного раствора. После его хранения около 2 месяцев при 4°C эффективность растворения белка значительно снижалась. Мы предположили, что основная причина снижения растворения может быть связана с окислением дитиотреитола – относительно нестабильного реагента, содержащего восстановленные SH-группы.

Для подтверждения важной роли SH-реагентов в процессе растворения белка было проанализировано, насколько хорошо рекомбинантный продукт растворяется в присутствии 8 М мочевины без добавления SH-содержащих агентов или в присутствии 8 М мочевины с добавлением 1% 2-меркаптоэтанол. С этой целью белковые включения растворяли в растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), а также указанные компоненты, и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Как и в предыдущем эксперименте, растворимый материал отделяли центрифугированием, и осадки ресуспендировали в тех же растворах до объема супернатанта для сравнения содержания рекомбинантного белка в полученных пробах. Как показал проведенный эксперимент, не растворимый в присутствии 8 М мочевины без добавления 2-меркаптоэтанол (рис. 1А). При добавлении в раствор 2-меркаптоэтанол наблюдался полный переход рекомбинантного белка в растворимое состояние (рис. 1Б). Полученный результат свидетельствовал о важной роли SH-содержащих соединений в растворении экспрессированного в бактериях ECD HER2 и позволил заключить, что увеличение содержания дитиотреитола или 2-меркаптоэтанол в растворе для растворения белковых включений может повысить выход растворимой формы ECD HER2. Количественное определение содержания белка в супернатанте показало, что использованный подход позволяет получить около 70 мг белка, экстрагированного из белковых включений, выделенных из 1 л бактериальной культуры.

Экстрагированный в присутствии 8 М мочевины и 1% 2-меркаптоэтанол материал был использован для оценки возможности использования макси-



**Рис. 2.** Анализ растворимой формы ECD HER2 с помощью ДСН-ПААГЭ и иммуноблотинга. А – белок, экстрагированный в присутствии 8 М мочевины и 1% 2-меркаптоэтанола (дорожка 2), был разведен в 250 раз в буфере для уравнивания смолы HIS-Select® и очищен с помощью металлохелатной хроматографии (на дорожки 3 и 4 нанесено разное количество белка). Белки разделяли методом ДСН-ПААГЭ в 12% геле и окрашивали Кумасси R-250. На дорожку 1 нанесены маркеры молекулярного веса. Б – анализ с помощью иммуноблотинга белка, экстрагированного из белковых включений, показал присутствие в препарате ECD HER2 минорных полос меньшего размера, узнаваемых антителами к полигистидиновой последовательности. Это свидетельствует о незначительном гидролизе рекомбинантного белка

мально простой схемы рефолдинга при получении рекомбинантного ECD HER2 в растворимой форме. Для этого полученный в предыдущем эксперименте супернатант, содержащий солюбилизованный белок в концентрации 18 мг/мл, разводили при интенсивном перемешивании в 250 раз в растворе, используемом для уравнивания Ni-содержащей смолы HIS-Select® (Sigma-Aldrich) при проведении металлохелатной хроматографии (50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 0.3 М NaCl и 10 мМ имидазол). Разведенный в объеме 50 мл белок сразу пропускали через колонку с 400 мкл смолы, колонку тщательно промывали уравнивающим буфером, и рекомбинантный ECD HER2 элюировали в присутствии 0.3 М имидазола. Измерение содержания белка в исходном экстракте и полученных фракциях показало, что со смолой связалось и было элюировано 15% белка, пропущенного через колонку (0.54 из 3.6 мг).

Как показал анализ полученных фракций с помощью ДСН-ПААГЭ, использованная схема по-

зволяет получить растворимый рекомбинантный белок в достаточно чистом состоянии (рис. 2А, дорожки 3 и 4). Балластные белки с молекулярным весом большим, чем вес ECD HER2, практически отсутствовали в полученных фракциях, а несколько минорных компонентов с меньшей массой могли оказаться результатом незначительного гидролиза рекомбинантного белка в ходе выделения, так как некоторые из них реагировали с антителами к полигистидиновой последовательности (рис. 2Б). Поскольку белок, очищенный с помощью металлохелатной хроматографии, чаще всего содержит дополнительные примеси, оптимизация условий хроматографии, а также использование дополнительных методов очистки в будущем могут быть полезными для получения препаратов полностью свободных от примесей. ●

Работа поддержана РФФИ  
(грант № 12-08-01086-а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coussens L., Yang-Feng T.L., Liao Y.C., Chen E., Gray A., McGrath J., Seeburg P.H., Libermann T.A., Schlessinger J., Francke U., et al. // *Science*. 1985. V. 230. P. 1132–1139.
2. Polanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. V. 77. P. 227–245.
3. Sandri M.T., Johansson H., Colleoni M., Zorzino L., Passerini R., Orlando L., Viale G. // *Anticancer Res*. 2004. V. 24. P. 1261–1266.
4. Disis M.L., Schiffman K., Guthrie K., Salazar L.G., Knutson K.L., Goodell V., dela Rosa C., Cheever M.A. // *J. Clin. Oncol*. 2004. V. 22. № 10. P. 1916–1925.
5. Pichon M.F., Hacene K., Guepratte S., Neumann R. // *Clin. Lab*. 2004. V. 50. № 3–4. P. 163–170.
6. Leary A.F., Hanna W.M., van de Vijver M.J., Penault-Llorca F., Rüschoff J., Osamura R.Y., Bilous M., Dowsett M. // *J. Clin. Oncol*. 2009. V. 27. № 10. P. 1694–1705.
7. Lennon S., Barton C., Banken L., Gianni L., Marty M., Baselga J., Leyland-Jones B. // *J. Clin. Oncol*. 2009. V. 27. № 10. P. 1685–1693.
8. Belimezi M.M., Papanastassiou D., Merkouri E., Baxevanis C.N., Mamalaki A. // *Cancer Immunol. Immunother*. 2006. V. 55. № 9. P. 1091–1099.
9. Liu X., He Z., Zhou M., Yang F., Lv H., Yu Y., Chen Z. // *Protein Expr. Purif*. 2007. V. 53. № 2. P. 247–254.
10. Dimitriadis A., Gontinou C., Baxevanis C.N., Mamalaki A. // *BMC Cancer*. 2009. V. 9. P. 386.
11. Долгих В.В., Сендерский И.В., Тец Г.В., Тец В.В. // *Уч. зап. ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*. 2013. Т. 20. № 4. С. 70–73.
12. Bradford M. // *Anal. Biochem*. 1976. V. 72. P. 248–254.

УДК 577.171.55

# Воздействие мелаксена на активность каспаз и глутатионовой антиоксидантной системы при токсическом поражении печени

С. С. Попов<sup>1\*</sup>, К. К. Шульгин<sup>2</sup>, А. Н. Пашков<sup>1</sup>, А. А. Агарков<sup>2</sup><sup>1</sup>Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения РФ, 394036, Воронеж, ул. Студенческая, 10<sup>2</sup>Воронежский государственный университет Минобрнауки РФ, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1

\*E-mail: biomed-popova@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.06.2013

После доработки 10.02.2014

**РЕФЕРАТ** Проведено сравнительное изучение активности каспаз-1 и -3, глутатионовой антиоксидантной системы и NADPH-генерирующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы, а также степени фрагментации ДНК в крови пациентов с хроническим алкогольным гепатитом при применении базового лечения и комбинированной терапии, включающей мелаксен. Установлено, что содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови больных, снижающееся при патологии, при приеме мелаксена возрастало в большей степени, чем у больных, получающих стандартное лечение. При проведении комбинированной терапии происходило более значительное изменение активностей каспаз-1 и -3, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, а также глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы в сторону контрольных значений. Фрагментация ДНК, выделенной из лейкоцитов крови, после проведения лечения уменьшалась, причем в большей степени после приема мелаксена на фоне базисной терапии. Вместе с тем включение мелаксена в терапию способствовало более значительному восстановлению активности маркерных ферментов повреждения гепатоцитов:  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы. По-видимому, коррекция уровня мелатонина под действием мелаксена оказывала позитивное воздействие на свободнорадикальный гомеостаз организма больных, что приводило к более выраженному изменению исследуемых параметров по сравнению с базисным лечением.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** восстановленный глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза, каспазы, мелаксен, фрагментация ДНК, хронический алкогольный гепатит.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АОС – антиоксидантная система; АФК – активные формы кислорода; GSH – восстановленный глутатион; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СО – свободнорадикальное окисление; ТНФА – тионитрофенильный анион; ХАГ – хронический алкогольный гепатит; GR/GP-система – глутатионредуктазная/глутатионпероксидазная система; GP – глутатионпероксидаза; GR – глутатионредуктаза;  $\gamma$ -GTP –  $\gamma$ -глутамилтранспептидаза; GST – глутатион-S-трансфераза; G6PDG – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; NADP-IDG – NADP-изоцитратдегидрогеназа.

## ВВЕДЕНИЕ

Токсическое поражение печени обычно развивается после 5–10 лет злоупотребления алкоголем и характеризуется появлением некроза с воспалительной реакцией. Характерной чертой повреждения печени у больных является преобладание стеатоза и других нарушений в периваскулярной (центролобулярной) зоне ацинуса. Механизм этой зональной селективности связан с относительным дефицитом кислоро-

да. Низкое напряжение кислорода увеличивает сдвиг редокс-потенциала, вызванный этанолом. Этанол повышает соотношение лактат/пируват и снижает уровень пирувата в большей степени в венозной крови печени, чем во всем органе. Гипоксия обуславливает повышение уровня NADH, нарушение функционирования ряда ферментов, ведет к образованию кислородных радикалов и активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1]. Известно, что индуцируемая

алкоголем цитохром-Р450-монооксигеназа (СУР2Е1) катализирует окисление этанола, что способствует росту толерантности к алкоголю, а также превращению его в высокотоксичные метаболиты, к которым относятся активные формы кислорода (АФК). Происходящее при этом истощение уровня восстановленного глутатиона (GSH) приводит к индукции окислительного стресса и повреждению клеток печени. Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза при токсическом поражении печени может быть причиной активации процессов запрограммированной клеточной гибели – апоптоза, для которого характерна активация каскада внутриклеточных цистеиновых протеаз, известных как каспазы [2]. Считается, что активация каспаз является ключевым этапом в промежуточных и терминальных стадиях данного процесса [3]. Так, каспаза-3, относящаяся к семейству *ced-3*, непосредственно участвует в апоптозе и способна активировать другие каспазы, после чего процесс запрограммированной клеточной гибели становится необратимым. Нельзя исключить участия в апоптотической гибели клеток и каспазы-1 из ICE-семейства, которая участвует в процессинге цитокинов [3]. Так при хроническом панкреатите экспрессия каспазы-1 обнаружена в атрофических ацинарных клетках поджелудочной железы. Этот факт говорит об их гибели. Кроме того, каспаза-1 способствует активации каспазы-3 [3].

Известно, что GSH и связанные с его превращениями ферменты выполняют важную роль в защите организма как от АФК, так и от токсических веществ. GSH относится к наиболее важным антиоксидантным агентам, он способен реагировать со свободными радикалами, в частности, обезвреживать синглетный кислород и гидроксил-радикалы, ингибировать процессы ПОЛ [4]. Глутатионредуктазная/глутатионпероксидазная (GR [КФ 1.6.4.2.]; GP [КФ 1.11.1.9.]) система обеспечивает детоксикацию  $H_2O_2$  и гидропероксидов с помощью GSH за счет действия глутатионпероксидазы. Скорость образования GSH в сопряженной реакции, катализируемой глутатионредуктазой, зависит в основном от уровня NADPH [5]. Одним из основных поставщиков NADPH для GR/GP-системы служит пентозофосфатный путь, ключевой фермент которого – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G6PDG [КФ 1.1.1.49.]), катализирует превращение глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон [6]. Альтернативным источником NADPH может быть реакция, катализируемая NADP-изоцитратдегидрогеназой (NADP-IDG [КФ 1.1.1.42.]), в ходе которой происходит окислительное декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата [7]. В состав глутатионовой антиоксидантной системы (АОС) входят также глутатион-S-трансферазы (GST) – мультифункциональные

белки, использующие GSH для метаболизма многих гидрофобных веществ и обеспечивающие детоксикацию ксенобиотиков [8]. GST предохраняет ДНК, митохондрии и другие жизненно важные компоненты клетки от токсических веществ и таким образом значительно повышает устойчивость клетки и организма в целом [9].

К соединениям, обладающим антиоксидантными свойствами, относится мелатонин, гормон диффузной нейроэндокринной системы, играющий роль регулятора ряда физиологических функций. Мелатонин участвует в формировании суточных биоритмов, торможении некоторых функций гипофиза, регуляции иммунных реакций. По химической структуре мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) представляет собой производное серотонина – биогенного амина, который, в свою очередь, синтезируется из аминокислоты триптофана [10, 11]. Имеются данные, что мелатонин может выступать как перехватчик гидроксильного радикала, синглетного кислорода, оксида азота [12]. Кроме того, мелатонин усиливает экспрессию генов, ответственных за синтез Cu-Zn-зависимой супероксиддисмутазы [13]. Считают, что в первую очередь мелатонин защищает ДНК от действия свободных радикалов, хотя он способен оказывать значительное протективное действие и на другие макромолекулы. В связи с тем, что мелатонин обладает липофильными свойствами, он может беспрепятственно проникать во все органы и ткани, где и может проявляться его антиоксидантная активность [14]. Ранее нами были получены данные, что экзогенный мелатонин тормозит развитие оксидативного стресса у крыс с токсическим гепатитом [15], сахарным диабетом 2 типа [16], гипертиреозом [17]. В настоящей работе мы использовали при лечении пациентов с токсическим поражением печени, вызванным чрезмерным употреблением алкоголя, мелаксен – синтетическое лекарственное средство, имеющее в своем составе мелатонин.

Цель работы состояла в сравнительной оценке активностей каспаз-1 и -3, GR, GP, GST, NADPH-генерирующих ферментов: G6PDG и NADP-IDG, содержания GSH и степени фрагментации ДНК в крови пациентов с хроническим алкогольным гепатитом (ХАГ) в стадии обострения при проведении базисного лечения и комбинированной терапии, включающей мелаксен.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В клиническое исследование было включено 52 человека с токсическим поражением печени, вызванным хроническим употреблением алкоголя. Все пациенты были мужского пола, в возрасте 22–69 лет, средний возраст –  $41.4 \pm 7.2$  года. Все были больны



синдромом алкогольной зависимости. Средняя продолжительность заболевания составляла  $2.2 \pm 0.5$  месяца. Диагноз алкогольного гепатита был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового исследования печени. Из сопутствующих заболеваний чаще всего регистрировались следующие: хронический гастрит – у 32 больных (50%), гипертоническая болезнь – у 24 (30.5%).

Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц с нормальными показателями общего, биохимического анализов крови.

Критериями исключения из исследования были вирусные гепатиты, злокачественные новообразования, сахарный диабет, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения.

Больные были разделены на две группы. Первая группа (28 человек) получала базисное лечение: полный отказ от приема алкоголя, стол № 5, раствор NaCl 0.9% и раствор витамина B1 (10 мл) внутривенно, раствор рибоксина (10 мл) внутривенно, раствор витамина B6 (4 мл) внутримышечно, раствор реланиума (4 мл) внутривенно. Гепатопротекторы: карсил (эквивалент силимарина 35 мг) по две таблетки 3 раза в день во время еды, эссливер форте (эссенциальные фосфолипиды 300 мг) по две таблетки 3 раза в день в течение 10 дней. Вторая группа (24 человека) дополнительно к базисной терапии получала мелаксен (Unifarm, Inc., США) по одной таблетке, содержащей 3 мг мелатонина, 1 раз в день за 30–40 мин перед сном в течение 10 дней.

Активность каспаз-1 и -3 определяли с помощью набора реактивов Caspase 1 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric фирмы Sigma. В среду измерения добавляли коктейль ингибиторов протеаз (0.08 мМ апротинин, 1.5 мМ пепстатин А, 2 мМ лейпептин) в соотношении 100 : 1 (все реактивы фирмы Sigma, США). Колориметрический анализ активности каспаз основан на гидролизе пептидного субстрата ацетил-Тур-Val-Ala-Asp-*n*-нитроанилида (Ac-YVAD-pNA) (в случае каспазы-1) и ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-*n*-нитроанилида (Ac-DEVD-pNA) (в случае каспазы-3) с образованием остатка *n*-нитроанилида, имеющего максимум поглощения при 405 нм (молярный коэффициент поглощения =  $10.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Активность каспаз выражали в пмоль продукта, образующегося за 1 мин, в расчете на 1 мг белка.

ДНК выделяли из лейкоцитов крови фенольно-хлороформным методом [18]. Фрагментацию ДНК выявляли с помощью электрофореза в агарозном геле в ТАЕ (Трис-ацетат-EDTA)-буфере, содержащем бромистый этидий [19]. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор MassRuler, вклю-

чающий маркеры от 1500 до 10000 п.н., производства Fermentas, Литва.

Активность ферментов глутатионовой АОС и NADPH-генерирующих ферментов определяли спектрофотометрически при 340 нм на спектрофотометре Hitachi U-1900 (Япония). За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25°C. Активность пересчитывали на 1 мл сыворотки крови. Активность GR определяли в среде, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.4), 1 мМ EDTA, 0.16 мМ NADPH и 0.8 мМ окисленного глутатиона. Активность GP определяли в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.4), содержащем 1 мМ EDTA, 0.12 мМ NADPH, 0.85 мМ GSH, 0.37 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 ед./мл GR. Активность GST определяли с помощью метода, основанного на оценке скорости образования глутатион-S-2,4-динитробензола в реакции GSH с 1-хлор-2,4-динитробензолом. Активности GST измеряли в среде следующего состава: 0.1 М калий-фосфатный буфер (pH 7.4), 1 мМ EDTA, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH. Активность G6PDG определяли спектрофотометрически в среде следующего состава (мМ): 0.05 Трис-НСl-буфер (pH 7.8), 3.2 глюкозо-6-фосфат, 0.25 NADP. Активность NADP-IDG определяли в 50 мМ Трис-НСl-буфере (pH 7.8), содержащем 1.5 мМ изоцитрат, 0.25 мМ NADP, 1.5 мМ MnCl<sub>2</sub>. Концентрацию GSH определяли с помощью реакции с 5,5-дигиобис(2-нитробензойной) кислотой, в результате которой образуется тионитрофенильный анион (ТНФА) с максимумом поглощения при 412 нм [20]. Общий белок определяли унифицированным биуретовым методом [21]. Активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы ( $\gamma$ -GTP) оценивали по скорости реакции переноса глутамилового остатка с  $\gamma$ -L-(+)-глутамил-4-нитроанилида на глицилглицин (Биотест, PLIVA – Lachema Diagnostika). Активности маркерных ферментов поражения гепатоцитов (ALT, AST) определяли наряду со стандартными параметрами биохимического анализа крови на биохимическом анализаторе Klima 15MC (Испания).

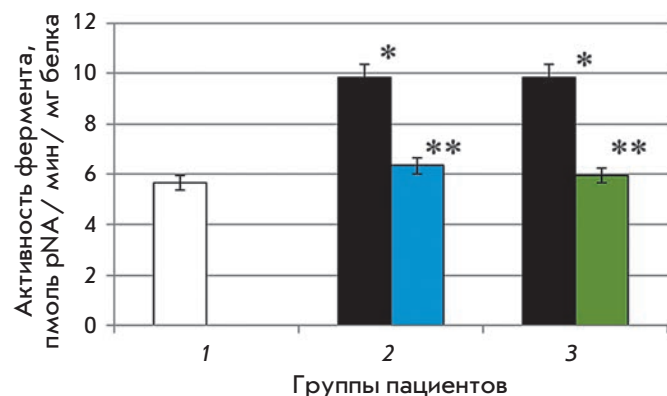
В ходе работы использовали наборы реактивов Caspase 1 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric, изоцитрат, препарат GP, Трис-ацетат-EDTA, бромистый этидий (Sigma, США), NADP, NADPH, Трис-НСl-буфер, EDTA (Reanal, Венгрия), глутатион окисленный и восстановленный, глюкозо-6-фосфат (ICN, США), остальные реактивы отечественного производства марки «х.ч.» или «ч.д.а.».

Статистическая обработка материала включала использование стандартных методов вариационной статистики (расчет средних значений (*M*), ошибка средних значений (*m*), *t*-критерия Стьюдента) и не-

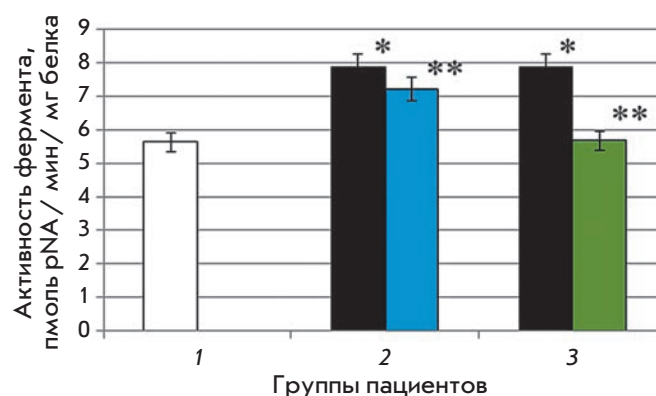
Влияние базисного лечения и комбинированной терапии с мелаксеном на показатели функций печени у больных хроническим алкогольным гепатитом в стадии обострения

Группа		Показатели функций печени		
		$\gamma$ -GTP, мккат/л	ALT, нмоль/(с·л)	AST, нмоль/(с·л)
Контрольная группа, норма (n = 65)		0.88 ± 0.04	95.9 ± 13.7	52.5 ± 7.3
Группа 1, базисное лечение (n = 28)	до лечения	3.34 ± 0.14*	241.6 ± 19.3*	151.6 ± 10.8*
	после лечения	1.63 ± 0.06**	161.8 ± 16.2**	108.9 ± 11.1**
Группа 2, комбинированное лечение с мелаксеном (n = 24)	до лечения	3.33 ± 0.12*	256.1 ± 14.6*	152.2 ± 10.4*
	после лечения	1.19 ± 0.04**	145.1 ± 11.3**	96.3 ± 13.7**

**Примечание.** Отличие параметра от соответствующего контрольного значения (\*) или от значения в группе больных после лечения (\*\*) статистически значимо при  $p < 0.05$ . Референсные величины ферментативных активностей у мужчин:  $\gamma$ -GTP – (0.25–1.77) мккат/л; ALT – норма (28–189) нмоль/(с·л); AST – (28–127) нмоль/(с·л).



**Рис. 1.** Активность каспазы-1 в сыворотке крови в норме (1), у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (\*) и при патологии до лечения (\*\*) статистически значимо при  $p \leq 0.05$



**Рис. 2.** Активность каспазы-3 в сыворотке крови в норме (1), у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (\*) и при патологии до лечения (\*\*) статистически значимо при  $p \leq 0.05$

параметрического теста Вилкоксона с применением прикладных программ STATISTICA 6.0. Статистически значимыми считали различия при  $p \leq 0.05$ .

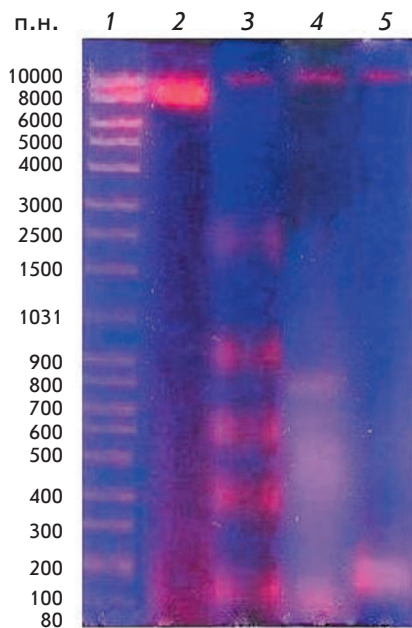
### РЕЗУЛЬТАТЫ

У больных первой и второй групп до лечения активность  $\gamma$ -GTP была повышена в среднем в 3.8 раза ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольной группой (таблица). Активность ALT и AST в обеих группах также возрастала в среднем в 2.5 и 2.9 раза ( $p < 0.05$ ) соответственно. После стандартного лечения происходило уменьшение активности  $\gamma$ -GTP в 2.1 раза

( $p < 0.05$ ), активности ALT и AST снижались в 1.5 и 1.4 раза соответственно. Во второй группе пациентов, получавших комбинированную терапию с мелаксеном, активность ферментов, маркеров повреждения гепатоцитов изменялась более существенно. Так, активность  $\gamma$ -GTP снижалась в 2.8 ( $p < 0.05$ ), ALT – в 1.8 ( $p < 0.05$ ), AST – в 1.6 раза ( $p < 0.05$ ).

В ходе работы было установлено, что развитие ХАГ у больных сопровождалось возрастанием активности каспазы-1 и каспазы-3 в 1.7 и 1.4 раза ( $p < 0.05$ ) соответственно (рис. 1, 2), что свидетельствовало об интенсификации процессов, сопряженных с разви-

Рис. 3. Электрофореграмма ДНК из лейкоцитов крови пациентов: контрольная группа (2), больные ХАГ до лечения (3), после стандартного лечения (4), после комбинированной терапии с мелаксеном (5). На треке 1 – маркерная ДНК



тием апоптоза. Применение базисной терапии приводило к изменению активности каспаз в сторону нормы. Так, активность каспазы-1 снижалась в 1.6 раза, каспазы-3 – в 1.1 раза ( $p < 0.05$ ) по сравнению с результатами, полученными до лечения (рис. 1, 2). В группе пациентов, кроме традиционного лечения, получавших мелаксен, отмечено более выраженное снижение активностей как каспазы-1 (в 1.7 раза), так и каспазы-3 (в 1.4 раза) ( $p < 0.05$ ) (рис. 1, 2), что, по-видимому, было связано с коррекцией уровня мелатонина под действием данного препарата.

Данные об изменении активности каспаз при ХАГ согласуются с результатами оценки степени фрагментации ДНК лейкоцитов крови больных. Согласно данным электрофоретического анализа, в образцах крови доноров контрольной группы ДНК была представлена одним фрагментом в начале трека (рис. 3). ДНК, выделенная из лейкоцитов больных ХАГ, была фрагментирована по сравнению с ДНК контрольных проб. После проведения стандартного лечения степень фрагментации ДНК снижалась. В образцах крови больных, принимавших мелаксен на фоне базисной терапии, фрагментация ДНК в большинстве проб практически не визуализировалась.

В первой группе больных ХАГ до назначения гепатопротекторов содержание GSH в сыворотке крови уменьшалось в среднем в 2.1 раза ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольным уровнем (рис. 4). Известно, что алкоголь индуцирует развитие окислительного стресса и повреждает клетки печени [22]. Очевидно, происходящая при этом активация процессов свободнорадикального окисления приводит к снижению

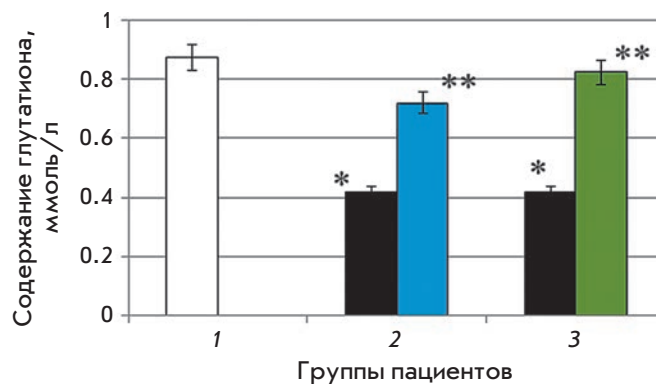


Рис. 4. Содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1), у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (\*) и при патологии до лечения (\*\*) статистически значимо при  $p \leq 0.05$

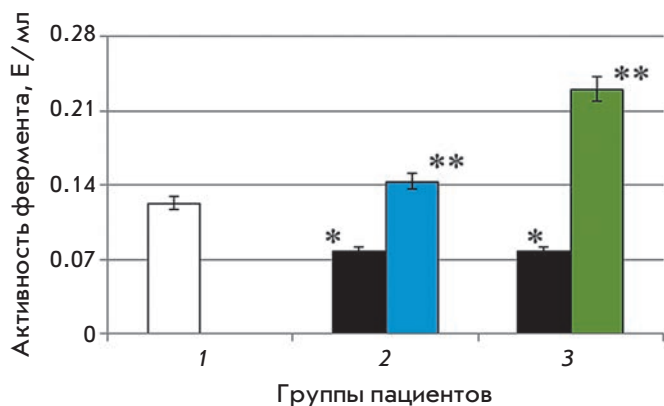
уровня GSH. После проведения базисного лечения наблюдалось увеличение концентрации GSH в 1.7 раза ( $p < 0.05$ ) по сравнению со значениями, полученными до назначения лечения.

Во второй группе больных уровень GSH также был в 2.1 раза ( $p < 0.05$ ) ниже, чем в контрольной группе. После проведения комбинированной терапии с мелаксеном содержание данного метаболита увеличивалось и становилось таким же, как в контроле (в 2.1 раза) (рис. 4).

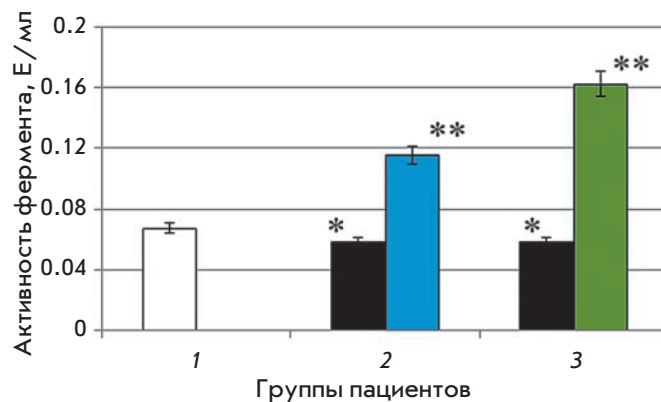
В ходе проведенных нами исследований установлено, что активности GP и GR в сыворотке крови больных ХАГ первой группы до назначения базисной терапии снижались в среднем в 1.6 ( $p < 0.05$ ) и 1.2 ( $p < 0.05$ ) раза соответственно по сравнению с контрольным уровнем (рис. 5, 6). По-видимому, снижение активности GR при ХАГ может вносить определенный вклад в уменьшение содержания GSH. После стандартного лечения активности GP и GR возрастали в среднем в 1.8 ( $p < 0.05$ ) и 2.0 ( $p < 0.05$ ) раза соответственно по сравнению со значениями, определенными до назначения базисной терапии.

Во второй группе больных ХАГ до проведения терапии активности GP и GR уменьшались в тех же пределах, что и в первой группе. После комбинированной терапии, включающей прием мелаксена, активности GP и GR повышались в 2.9 и 2.8 раза соответственно. Таким образом, повышение активности GP/GR-системы у больных данной группы было наибольшим (рис. 5, 6).

До назначения гепатопротекторов активность GST в первой группе больных ХАГ уменьшалась в 1.6 раза



**Рис. 5.** Активность глутатионпероксидазы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (\*) и при патологии до лечения (\*\*) статистически значимо при  $p \leq 0.05$

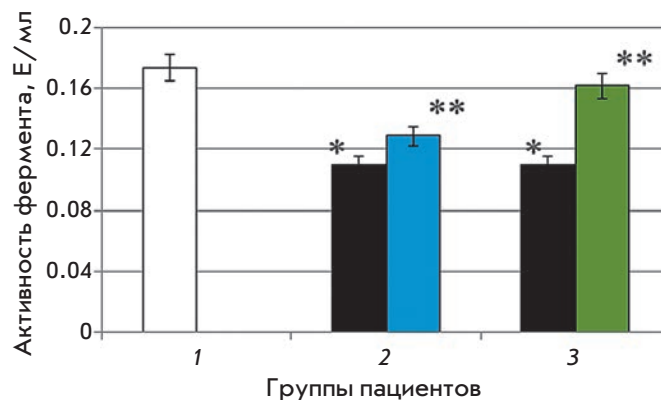


**Рис. 6.** Активность глутатионредуктазы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (\*) и при патологии до лечения (\*\*) статистически значимо при  $p \leq 0.05$

( $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольным уровнем. Очевидно, что снижение активности GST определялось значительными затратами восстановленного глутатиона в ответ на избыточное образование АФК при развитии окислительного стресса, индуцированного ХАГ. Это предположение согласуется с данными о повышении активности GST на фоне возрастания уровня GSH после проведения лечения. Так, после базисной терапии, включающей прием гепатопротекторов, активность фермента увеличивалась в 1.5 раза ( $p < 0.05$ ).

Во второй группе больных ХАГ до проведения терапии активность GST изменялась в тех же пределах, что и в первой группе. После комбинированного лечения, включающего прием гепатопротекторов и мелаксена, активность GST увеличивалась в 1.8 раза ( $p < 0.05$ ) по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, прием мелаксена способствовал повышению активности GST в большей степени, чем у больных первой группы (рис. 7).

Выявлены также изменения активностей NADPH-генерирующих ферментов при ХАГ и после проведения лечения. Установлено, что в сыворотке крови всех групп больных ХАГ активность NADP-IDG уменьшилась в среднем в 1.7 раза по сравнению с контрольной группой. После базисной терапии активность NADP-IDG возрастала в среднем в 1.4 раза по сравнению с величинами, определенными до лечения. В случае комбинированной терапии с мелаксеном повышение ферментативной активности было более существенным и в 1.8 раза превысило активность до лечения (рис. 8).

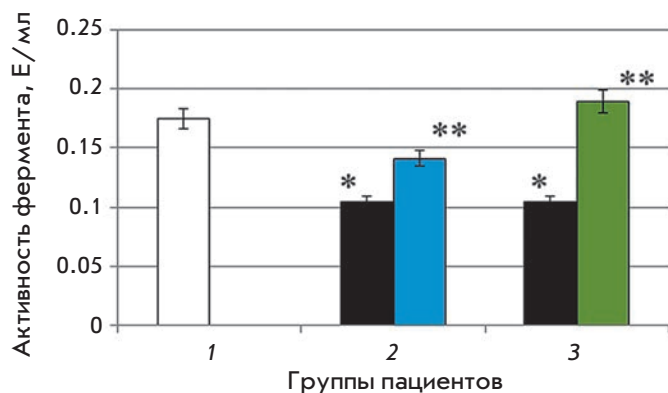


**Рис. 7.** Активность глутатионтрансферазы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (\*) и при патологии до лечения (\*\*) статистически значимо при  $p \leq 0.05$

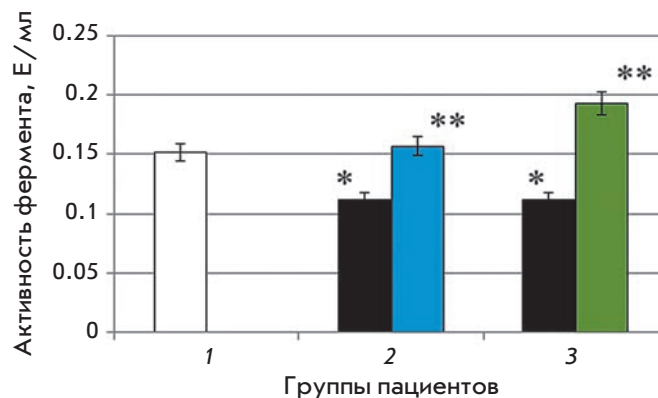
Активность G6PDG при ХАГ снижалась в среднем в 1.4 раза ( $p < 0.05$ ). После проведения стандартной терапии активность возрастала в 1.4 раза по сравнению с данными до лечения (рис. 9). Во второй группе пациентов с ХАГ в стадии обострения проведение комбинированной терапии с мелаксеном привело к повышению активности G6PDG в среднем в 1.7 раза (рис. 9).

По-видимому, снижение активности NADPH-генерирующих ферментов могло быть одной из причин снижения активности GR при ХАГ.





**Рис. 8.** Активность NADP-изоцитратдегидрогеназы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (\*) и при патологии до лечения (\*\*) статистически значимо при  $p \leq 0.05$



**Рис. 9.** Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в контроле (1) и у больных с хроническим алкогольным гепатитом после стандартного лечения (2), при комбинированной терапии с мелаксеном (3): до лечения (синий), после лечения (зеленый). Отличие параметра от соответствующего значения в норме (\*) и при патологии до лечения (\*\*) статистически значимо при  $p \leq 0.05$

Следует отметить, что в ряде работ, выполненных на животных моделях, уровень активности антиоксидантных ферментов, включая глутатионовую АОС, NADPH-генерирующие ферменты, а также параметры, отражающие интенсивность свободнорадикальных процессов (показатели биохемилюминесценции, содержание ДК), коррелируют с этими показателями в печени, а также со статусом поражения печени, оцениваемым по активности маркерных ферментов (ALT, AST) [23–27].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биохимические показатели функций печени (таблица) подтверждают, что при ХАГ нарушается метаболизм гепатоцитов и возникают их повреждения, что сопровождается цитолизом клеток и выходом в кровь ALT, AST и  $\gamma$ -GTP. Снижение исследуемых параметров подтверждает гепатопротекторное действие базисного лечения. Более выраженные изменения показателей у пациентов второй группы свидетельствуют о том, что включение в базисную терапию мелаксена, корректирующего уровень мелатонина в организме, усиливало гепатопротекторное действие, по-видимому, за счет антиоксидантного и иммуностимулирующего эффекта данного гормона.

Повышение активности каспаз в сыворотке крови больных ХАГ (рис. 1, 2) было, по-видимому, сопряжено с чрезмерной генерацией АФК при данной патологии. Так, развитие апоптоза гепатоцитов наблюдали на экспериментальных моделях алкого-

льноиндуцированных болезней печени [28]. Кроме того, при экспериментальном гепатите, индуцированном конканавалином-А, повышалась активность каспазы-3, что было связано, в частности, с инфильтрирующими печень лимфоцитами, которые подвергаются активационно-индуцированному апоптозу [29]. Снижение активности обеих каспаз после базисной терапии, по-видимому, было связано с тем, что проводимое лечение способствовало снижению скорости генерации АФК и торможению апоптотических процессов. Более значительное изменение активности каспаз-1 и -3 в группе пациентов, находившихся на комбинированной терапии с мелаксеном, было, вероятно, связано с коррекцией уровня мелатонина при применении данного препарата. Известно, что мелатонин снижает уровень окислительного повреждения липидов, ДНК и митохондрий [30], увеличивает экспрессию антиапоптотических генов группы *Bcl-2*, защищая липиды от перекисного окисления, а клетки от последующего апоптоза [31].

Результаты определения фрагментации ДНК лейкоцитов крови больных ХАГ соответствуют данным по изменению активности каспаз при ХАГ, проведении стандартного лечения и приеме мелаксена на фоне базисной терапии. ДНК, выделенная из образцов крови больных ХАГ, была значительно фрагментирована. По мнению ряда исследователей, подобные фрагменты возникают под действием апоптоспецифичных нуклеаз в терминальной фазе апоптоза [32]. В ходе деградации ДНК сначала обра-

зуются крупные фрагменты, длиной примерно 300 т.п.н., несколько позже – 30–50 т.п.н. На следующем этапе в ходе межнуклеосомной деградации ДНК под действием кальцийчувствительной эндонуклеазы CAD (caspase-activated DNase) формируются фрагменты длиной 180 п.н. или кратные им. Именно эти фрагменты электрофоретически выявляются в виде «апоптозной лестницы». Как известно, подобная фрагментация ДНК может быть связана с протеолитическим расщеплением под действием каспаз и ДНК-топоизомеразы II, участвующей в формировании супервитков ДНК. Кроме того, субстратом каспаз при апоптозе является гистон H1, защищающий ДНК от действия эндонуклеаз на межнуклеосомном уровне [33]. Электрофоретический анализ ДНК, выделенной из крови больных ХАГ, выявил полосу в области молекулярных масс, соответствующую деградированной ДНК, характерной для процесса некроза [34]. После проведения традиционной терапии наблюдалось снижение степени фрагментации ДНК, свидетельствующее о положительном эффекте лечения. Включение мелаксена в базисную терапию приводило к значительному уменьшению степени фрагментации ДНК, что может быть свидетельством антиапоптотического действия данного препарата.

Падение уровня GSH в сыворотке крови больных ХАГ более чем в 2 раза относительно контроля (рис. 4) обусловлено, по всей видимости, возникновением дисбаланса между скоростью свободнорадикальных процессов и активностью антиоксидантной системы. Как известно, восстановленному глутатиону принадлежит ключевая роль в системе низкомолекулярных тиоловых антиоксидантов, он эффективно инактивирует АФК и является наиболее чувствительным компонентом в общей схеме неспецифической резистентности организма в условиях окислительного стресса [35]. Вместе с тем глутатион участвует в превращении таких антиоксидантов, как аскорбиновая кислота,  $\alpha$ -токоферол, тиоктовая кислота, убихинон, в сохранении оптимального структурно-функционального состояния биомембран, регуляции синтеза белков теплового шока [36]. Как отмечено выше, микросомальные ферменты монооксигеназной системы, в частности СУР2Е1, не только окисляют алкоголь, но обладают способностью превращать ксенобиотики в высокотоксичные метаболиты. Происходящая при этом активация процессов свободнорадикального окисления приводит, по-видимому, к истощению уровня GSH, что свидетельствует о снижении способности печени обезвреживать токсические соединения.

После проведения базисной терапии концентрация GSH в 1.7 раза превысила концентрацию до лечения, что, по-видимому, связано со снижением интенсив-

ности процессов СО и, как следствие, с уменьшением расходования этого метаболита в результате положительного эффекта терапии. Комбинированное лечение с мелаксеном способствовало восстановлению концентрации глутатиона до нормального уровня, что, очевидно, сопряжено с мощным антиоксидантным эффектом мелатонина и его позитивным действием на глутатионовую систему (рис. 4).

Исследование функционирования ферментов глутатионовой антиоксидантной системы показало, что при хронической алкогольной интоксикации снижается активность селеновой GP и GR в сыворотке крови, что также свидетельствует о снижении антиоксидантного статуса больных. Падение активности GP обусловлено, вероятно, снижением содержания селена при хронической алкогольной интоксикации. Как известно, активность селеносодержащей GP напрямую зависит от уровня селена в организме, при недостаточности которого происходит торможение ферментативной активности. Снижение активности фермента при дефиците селена связано с уменьшением количества мРНК GP [37]. Селен необходим для синтеза селеноцистеина, входящего в активный центр фермента и играющего важную роль в катализе [38]. Функционирование GP тесно сопряжено с работой GR. Поскольку при реакции, катализируемой GR, образуется быстро мобилизуемый источник GSH, то, вероятно, снижение активности GR может вносить существенный вклад в уменьшение содержания данного тиола при ХАГ.

По-видимому, возрастание активности GP/GR-системы после стандартного лечения больных ХАГ было сопряжено с положительным действием базисной терапии на антиоксидантный статус больных. После проведения комбинированной терапии, включающей прием мелаксена, активности GP и GR повышались более значительно (рис. 5, 6). По-видимому, антиоксидантная активность мелатонина может быть связана с активацией антиоксидантных ферментов и/или стимуляцией их синтеза [39].

Выявленное существенное снижение активности GST в сыворотке крови больных ХАГ по сравнению с нормой было, очевидно, связано со значительными затратами восстановленного глутатиона в ответ на избыточное образование АФК при развитии окислительного стресса, индуцированного патологическим состоянием. Как известно, GST использует восстановленный глутатион для конъюгации с гидрофобными веществами, их восстановления или изомеризации. GSH является необходимым компонентом реакций обезвреживания токсических продуктов перекисного окисления липидов, восстановления гидроперекисей липидов, биотрансформации ксенобиотиков, катализируемых мультифункциональной

GST [14]. В этой связи падение уровня GSH при ХАГ, по-видимому, могло приводить к снижению активности GST. Это предположение согласуется с данными о повышении активности GST на фоне роста уровня GSH после лечения. Вероятно, возрастание активности GST было сопряжено с положительным действием проводимого лечения на антиоксидантный статус больных и снижением расходования GSH, причем прием мелаксена способствовал повышению активности GST в большей степени, чем в первой группе больных (рис. 7).

Обнаружено, что при ХАГ изменяется также активность NADPH-генерирующих ферментов: NADP-IDG и G6PDG. Активность NADP-IDG снижалась в большей степени, чем G6PDG. Менее значительное уменьшение активности G6PDG связано, возможно, с ролью пентозофосфатного пути как поставщика восстановительных эквивалентов для биосинтеза жирных кислот, который активируется в клетках печени в условиях ее жирового перерождения при хронической алкогольной интоксикации. Известно, что именно G6PDG как ключевой фермент пентозофосфатного пути ответственна за основную долю NADPH, необходимого для синтеза жирных кислот [40]. Снижение активности NADPH-генерирующих ферментов могло быть следствием негативного воздействия АФК, генерация которых чрезмерна в патологическом состоянии. Имеются данные об ингибировании активности некоторых ферментов гликолиза при хронической алкогольной интоксикации, что сопровождается увеличением в печени уровня глюкозы и лактата [41]. По-видимому, в этих условиях может происходить и снижение активности ферментов, функционирование которых сопряжено с превращениями трикарбоновых кислот, и, в частности NADP-IDG (рис. 8).

Более значительное возрастание активности NADP-IDG и G6PDG в крови больных при приеме препарата, способного осуществлять коррекцию уровня мелатонина, по сравнению с пациентами, получавшими стандартное лечение, может быть обусловлено индукцией синтеза ферментов под действием данного гормона. Известно, что мелатонин может повышать экспрессию некоторых ферментов антиоксидантной защиты организма [42].

Следует отметить, что снижение активности NADPH-генерирующих ферментов могло быть одной

из причин снижения активности GR при ХАГ. При этом существенное возрастание активности GR после базисного лечения и еще более значительный подъем активности фермента при приеме мелаксена были сопряжены с увеличением активностей G6PDG и NADP-IDG в данных условиях. Наблюдаемое при этом превышение контрольного уровня активностей GR и NADPH-генерирующих ферментов могло быть связано с мощным эффектом антиоксидантной терапии, способствующей мобилизации АОС в условиях окислительного стресса, приобретающего системный характер при хронической алкогольной интоксикации. Вероятно, мелатонин, коррекция содержания которого происходит под влиянием мелаксена, может выступать в роли адаптогена, регулирующего активность глутатионовой системы, а также ферментов, способных генерировать NADPH, в соответствии с воздействием патогенных факторов на организм.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, включение мелаксена в терапию ХАГ усиливает гепатопротекторное, мембраностабилизирующее действие, что подтверждается результатами определения показателей, характеризующих функционирование печени, в частности аминотрансфераз и  $\gamma$ -ГТФ. По-видимому, это связано с антиоксидантными свойствами мелатонина, входящего в состав мелаксена. Комплексное лечение с использованием мелаксена приводило к более существенному снижению развития апоптотических процессов у больных ХАГ, что выражалось в более значительном снижении активности каспаз-1 и -3, а также степени фрагментации ДНК, чем у больных, получавших традиционную терапию. Коррекция уровня мелатонина в организме приводит к более существенному восстановлению содержания GSH, активности ферментов глутатионового звена АОС: GR, GP, GST, а также NADPH-генерирующих ферментов G6PDG и NADP-IDG по сравнению с этими показателями при проведении базисного лечения. Полученные результаты свидетельствуют об эффективном протективном действии мелаксена при токсическом поражении печени, благоприятно влияющем на состояние свободнорадикального гомеостаза организма и обеспечивающем значительное снижение степени выраженности цитолитического повреждения гепатоцитов. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boyer J.L., Blum H.E., Maier K.P., Sauerbruch T., Stalder G.A. Liver cirrhosis and its development. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. and Falk Foundation, 2001. 357 p.
2. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. // Межвузовский сборник. Биохимия и биофизика микроорганизмов. Горький, 1983. С. 179–183.
3. Суханова Г.А., Акбашева О.Е. Апоптоз. Томск: Изд-во ТПУ, 2009. 172 с.
4. Зенков Н.К., Лапкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М.: Наука/Интерпериодика, 2001. 343 с.
5. Su F., Hu X., Jia W., Gong C., Song E., Hama P. // J. Surg. Res. 2003. V. 113. № 1. P. 102–108.

6. Gupte R.S., Ata H., Rawat D., Abe M., Taylor M.S., Ochi R., Gupte S.A. // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. № 4. P. 543–558.
7. Ufer C., Wang C.C. // *Front. Mol. Neurosci.* 2011. V. 4. A. 12. Doi: 10.3389/fnmol.2011.00012.
8. Wang Z., Jin L., Węgrzyn G., Węgrzyn A. // *BMC Biochem.* 2009. V. 10. A. 6. Doi: 10.1186/1471-2091-10-6.
9. Sun H.-D., Ru Y.-W., Zhang D.-J., Yin S.-Y., Yin L., Xie Y.-Y., Guan Y.-F., Liu S.-Q. // *World J. Gastroenterol.* 2012. V. 18. № 26. P. 3435–3442.
10. Анисимов В.Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике. СПб.: Система, 2007. 40 с.
11. Reiter R.J., Tan D.X., Leon J., Kilic U., Kilic E. // *Exp. Biol. Med.* 2005. V. 230. P. 104–117.
12. Барбой В.А. // *Украинский биохим. журн.* 2000. Т. 73. № 3. С. 5–11.
13. Анисимов В.Н., Кветной И.М., Комаров Ф.И., Малиновская Н.К., Рапопорт С.И. Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта. М.: Советский спорт, 2000. 184 с.
14. Попова Т.Н., Пашков А.Н., Семенихина А.В., Попов С.С., Рахманова Т.И. Свободнорадикальные процессы в биосистемах. М.: Кириллица, 2008. 192 с.
15. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Семенихина А.В., Рахманова Т.И. // *Эксп. клин. фармакол.* 2007. Т. 70. № 1. С. 48–51.
16. Агарков А.А., Попова Т.Н., Матасова Л.В. // *Биомед. химия.* 2013. Т. 59. № 4. С. 434–442.
17. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Рахманова Т.И. // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2007. Т. 144. № 8. С. 170–173.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 478 с.
19. Калинина Т.С., Баннова А.В., Дыгало Н.Н. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2002. Т. 134. С. 641–644.
20. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. Т. 2. 792 с.
21. Матасова Л.В., Рахманова Т.И., Сафонова О.А., Попова Т.Н. Лабораторные работы и задачи по биохимии. Воронеж: ВГУ, 2006. 79 с.
22. Ивашкин В.Т., Маевская М.В. Алкогольно-вирусные заболевания печени. М.: Литтерра, 2007. 160 с.
23. Агарков А.А., Попова Т.Н., Матасова Л.В. // *Химико-фармацевтический журн.* 2011. Т. 45. № 7. С. 7–10.
24. Сафонова О.А., Попова Т.Н., Саиди Л. // *Биомед. химия.* 2010. Т. 56. № 4. С. 490–498.
25. Попова Т.Н., Панченко Л.Ф., Семенихина А.В., Рахманова Т.И., Аллекрад Х. // *Вопросы биол. мед. фарм. химии.* 2010. № 2. С. 66–69.
26. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Семенихина А.В., Рахманова Т.И. // *Биомед. химия.* 2008. Т. 54. № 1. С. 114–121.
27. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Рахманова Т.И., Семенихина А.В. // *Проблемы эндокринологии.* 2008. Т. 54. № 3. С. 47–50.
28. Natori S., Rust C., Stadheim L.M., Srinivasan A., Burgart L.J., Gores G.J. // *J. Hepatol.* 2001. V. 34. № 2. P. 248–253.
29. Biburger M., Tiegs G. // *J. Immun.* 2005. V. 175. P. 1540–1550.
30. Watanabe K., Wakatsuki A., Shinohara K., Ikenoue N., Yokota K., Fukaya T. // *J. Pineal Res.* 2004. V. 37. № 4. P. 276–280.
31. Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M., Etem E., Nedzvetsky V.S. // *J. Pineal Res.* 2007. V. 43. № 3. P. 225–231.
32. Muller K. // *Eur. J. Pharmacol.* 1992. V. 226. № 6. P. 209–214.
33. Earnshaw W.C. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995. V. 7. № 3. P. 337–343.
34. Ярилин А.А. // *Патол. физиол. эксп. терап.* 1998. Т. 2. С. 38–48.
35. Exner R., Wessner B., Manhart N., Roth E. // *Wien Klin Wochenschr.* 2000. V. 112. № 14. P. 610–616.
36. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. // *Endocrine Rev.* 2002. V. 23. № 5. P. 599–622.
37. Sunde R.A., Evenson J.K., Thompson K.M., Sachdev S.W. // *J. Nutr.* 2005. V. 135. № 9. P. 2144–2150.
38. Зубкова Л.Л. // *Казанская наука.* 2010. № 3. С. 241–244.
39. Beni S.M., Kohen R., Reiter R.J., Tan D. X., Shohami E. // *FASEB J.* 2004. V. 18. P. 149–151.
40. Stover N.A., Dixon T.A., Cavalcanti A.R.O. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. e22269.
41. Лелевич С.В. // *Биомед. химия.* 2009. Т. 55. № 6. С. 727–733.
42. El-Abhar H.S., Shaalan M., Barakat M., El-Denshary E.S. // *J. Pineal Res.* 2002. V. 33. P. 87–94.



## 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](http://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 сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах:  $T_{пл}$  – 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  $\mu$ 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 (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. 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 отзыва.

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.**

# Уважаемые коллеги! Приглашаем вас принять участие в симпозиуме «Новейшие методы клеточных технологий в медицине», который будет проходить со 2 по 6 сентября 2014 г. в Новосибирском Академгородке.



## ОРГАНИЗАТОРЫ СИМПОЗИУМА:

- Министерство здравоохранения Российской Федерации
- Национальное общество регенеративной медицины
- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина»
- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

В работе примут участие ведущие специалисты в области здравоохранения, медицины, молекулярных и клеточных технологий.

## ПОВЕСТКА СИМПОЗИУМА:

- индуцированные плюрипотентные стволовые клетки как основа для создания Биобанка клеточных моделей заболеваний человека;
- применение новых методов геномной инженерии для создания клеточных моделей наследственных заболеваний человека;
- редактирование геномов;
- клеточные препараты нового поколения;
- клеточные технологии в неврологии;
- клеточные технологии в кардиологии;
- клеточные технологии в онкологии.

Научная программа симпозиума будет включать пленарные и секционные доклады, круглые столы, а также постерную сессию.

## ТЕМЫ КРУГЛЫХ СТОЛОВ:

- клеточные модели в трансляционных медицинских исследованиях и доклинических испытаниях лекарств;
- необходимые качества клеточных моделей и критерии их пригодности для биомедицинских исследований;
- создание, инфраструктура и перспективы биомедицинских исследований на базе Биобанка клеточных моделей заболеваний человека;
- пациент-специфичные и искусственные изогенные модели наследственных заболеваний человека;
- создание трехмерных клеточных структур для заместительной терапии.

Модераторами круглых столов выступят известные специалисты в области обсуждаемых проблем. Обращаем ваше внимание, что все участники симпозиума могут присылать в адрес оргкомитета темы и вопросы, которые следует затронуть на заседаниях круглого стола. По завершении работы симпозиума участниками будет принят меморандум о развитии клеточных технологий в Российской Федерации.

## С ПЛЕНАРНЫМИ ДОКЛАДАМИ ВЫСТУПАЮТ:

Аверьянов Александр Вячеславович, д.м.н.  
Александрова Мария Анатольевна, д.б.н., проф.  
Готье Сергей Владимирович, акад. РАН, д.м.н., проф.

Деев Роман Вадимович, к.м.н.  
Карпова Галина Георгиевна, д.б.н., проф.  
Колесников Николай Николаевич, д.б.н., проф.  
Медведев Сергей Петрович, к.б.н.  
Мулдашев Эрнест Рифгатович, д.м.н., проф.  
Салахутдинов Нариман Фаридович, д.х.н., проф.  
Свердлов Евгений Давидович, акад. РАН, д.х.н., проф.  
Северинов Константин Викторович, д.б.н., проф.  
Сухих Геннадий Тихонович, акад. РАН, д.м.н., проф.  
Ткачук Всеволод Арсеньевич, акад. РАН, д.м.н., проф.  
Чернявский Александр Михайлович, д.м.н., проф.

**Регистрация участников и прием тезисов устных и постерных докладов производится с 1 марта по 31 июля 2014 г.** на информационном сайте симпозиума <http://celltech2014.niboch.nsc.ru>

**Организационные взносы:** для студентов и аспирантов – бесплатное участие, остальные участники – 3500 руб. до 30 апреля 2014 г. (включительно), с 1 мая 2014 г. – 4000 руб.

## ОРГКОМИТЕТ

### Председатели:

Сухих Геннадий Тихонович, акад. РАН, д.м.н., проф.  
Караськов Александр Михайлович, акад. РАН, д.м.н., проф.  
Власов Валентин Викторович, акад. РАН, д.х.н., проф.  
Козлов Владимир Александрович, акад. РАН, д.м.н., проф.  
Афтанас Любомир Иванович, акад. РАН, д.м.н., проф.

### Сопредседатели:

Закиян Сурен Минасович, д.б.н., проф.  
Покушалов Евгений Анатольевич, д.м.н., проф.  
Рихтер Владимир Александрович, к.б.н.

### Члены оргкомитета:

Иванова Людмила Николаевна, акад. РАН, д.м.н., проф.  
Дыгало Николай Николаевич, чл.-корр. РАН, д.б.н., проф.  
Маркель Аркадий Львович, д.б.н., проф.  
Васильева Любовь Антоновна, д.б.н., проф.  
Рубцов Николай Борисович, д.б.н., проф.  
Морозов Виталий Валерьевич, д.м.н., проф.

Кабиллов Марсель Расимович, к.б.н.  
Шевченко Александр Игоревич, к.б.н.

Медведев Сергей Петрович, к.б.н.  
Шилов Александр Геннадьевич  
Сандер Анастасия Сергеевна  
Белеванцева Анна Владимировна

### Секретариат:

Захарова Ирина Сергеевна, к.б.н.  
Дементьева Елена Вячеславовна, к.б.н.  
Васькова Евгения Андреевна, к.б.н.

Более подробная информация представлена на информационном сайте симпозиума <http://celltech2014.niboch.nsc.ru>

По всем вопросам обращайтесь в оргкомитет: эл. почта: [celltec2014@gmail.com](mailto:celltec2014@gmail.com), тел.: +7913-370-34-66.



# 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*



ДЛЯ СТУДЕНТОВ, МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И ИННОВАТОРОВ

# INNOSTAR

## КОНКУРС ПРОЕКТОВ

- 1 ПРИШЛИ ЗАЯВКУ НА СЪЕМКУ ДО 25 ОКТЯБРЯ 2013 Г. ИЛИ ПРИШЛИ РОЛИК ДО 8 НОЯБРЯ 2013 Г.
- 2 ПРЕДОСТАВЬ ОПИСАНИЕ ПРОЕКТА
- 3 ДОЖДИСЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

## КЛУБ INNOSTAR

- > SCIENCE CHALLENGE
- > ON-LINE ЛЕКЦИИ
- > ТРЕНИНГИ
- > КАРТА НАУЧНОЙ СВЯЗИ МОСКВЫ

ПРИСОЕДИНЯЙСЯ! СТАНЬ ЗВЕЗДОЙ НАУКИ И ИННОВАЦИЙ!



ОРГАНИЗАТОРЫ:



ДЕПАРТАМЕНТ НАУКИ,  
ПРОМЫШЛЕННОЙ ПОЛИТИКИ  
И ПРЕДПРИНИМАТЕЛЬСТВА  
ГОРОДА МОСКВЫ



[WWW.INNOSTAR.RU](http://WWW.INNOSTAR.RU)