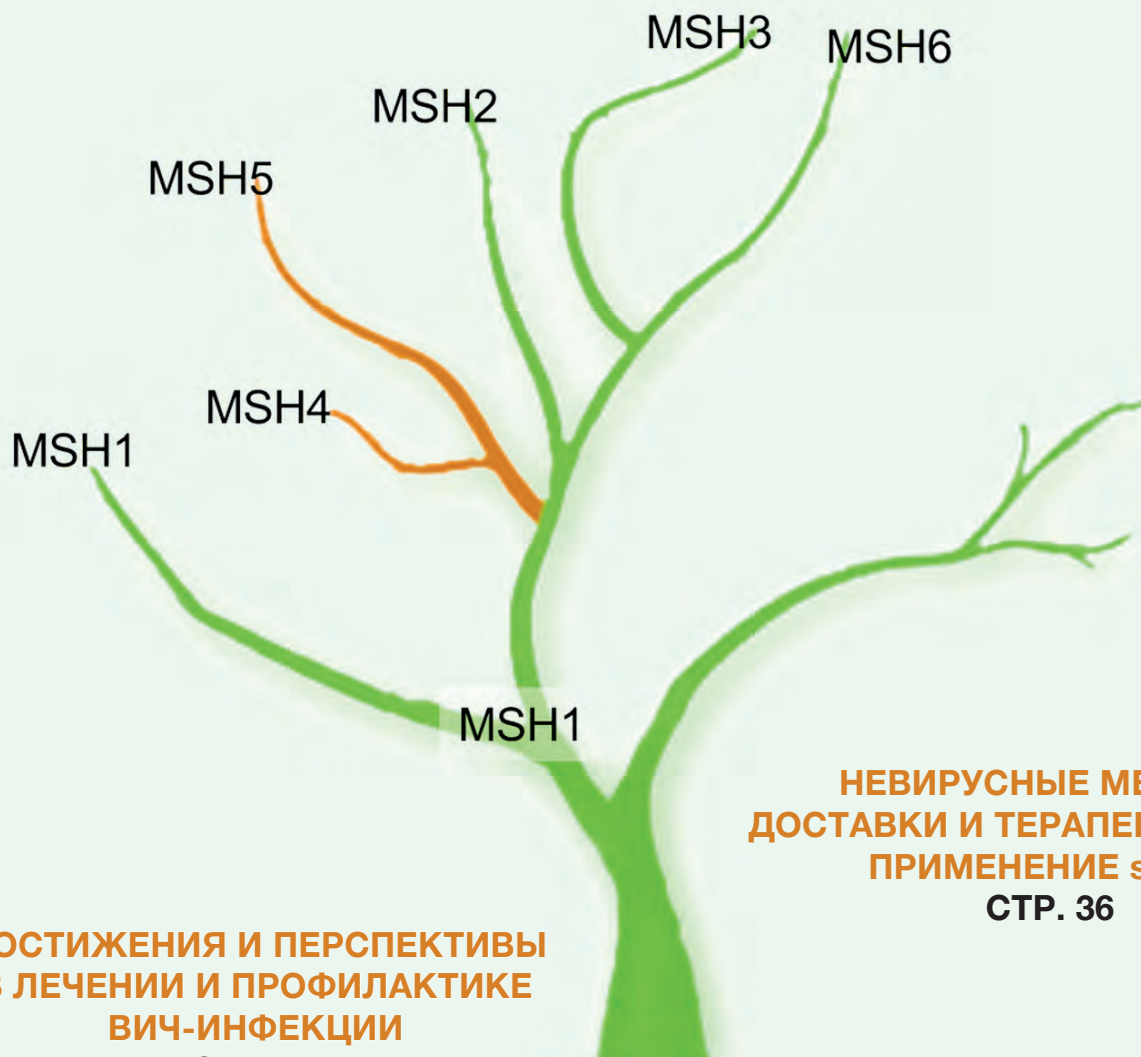


Acta Naturae

Структурно-функциональная организация системы репарации неканонических пар нуклеотидов



**ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ
В ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ
ВИЧ-ИНФЕКЦИИ**
СТР. 57

**НЕВИРУСНЫЕ МЕТОДЫ
ДОСТАВКИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ
ПРИМЕНЕНИЕ siРНК**
СТР. 36

**АКАДЕЗИН ВЫЗЫВАЕТ
НЕАПОПТОТИЧЕСКУЮ ГИБЕЛЬ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**
СТР. 78

Письмо редакторов

Дорогие читатели 18-го номера! Мы рады очередной встрече с вами! Номер, как всегда, открывается рубрикой «Форум», в которой представлены две публикации. Первая продолжает дискуссию о значении наукометрии и о количественных показателях эффективности научной работы. Тема эта важная и весьма неоднозначная, и данная публикация, по нашему мнению, будет интересна читателям. Вторая публикация – рассказ о международном семинаре, прошедшем в Москве и посвященном методам извлечения информации из больших массивов данных. Для биологов такие методы чрезвычайно важны, учитывая нарастающий вал информации, которому не видно конца. Прочтите этот материал – вы узнаете много интересного.

Научная часть номера. В нем четыре обзора, посвященных последним достижениям и проблемам нашей науки. Два обзора (Перевозчикова и др., Попова и др.) посвящены фундаменталь-

ным проблемам молекулярной биологии, а два других (Никитенко и др., Хандажинская и др.) больше связаны с практическим применением результатов фундаментальных исследований. Диапазон поднимаемых в них вопросов достаточно широк. Номер включает также семь полноразмерных статей и одно краткое сообщение (кстати, краткие сообщения, содержащие приоритетные данные, требующие срочной публикации, приветствуются редакцией).

Сейчас в портфеле редакции материала на три номера вперед, и количество присылаемых статей все увеличивается. Поэтому мы будем проводить более жесткую политику отбора публикаций.

На такой оптимистической ноте заканчиваем введение.

До встречи в следующем номере! ●

Редакционная коллегия

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

Работает при финансовой
поддержке Министерства
образования и науки РФ

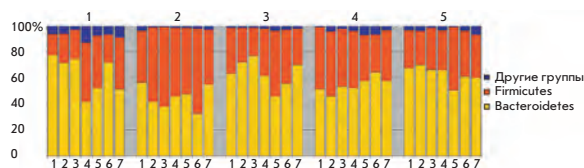


Лучшее российское интернет-СМИ
о науке, образовании, инновациях

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

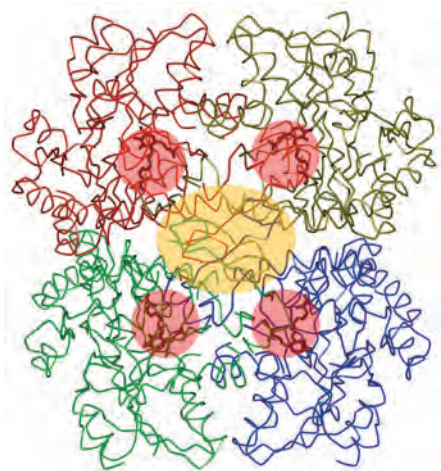
Метагеномный анализ динамики изменений состава микробиома кишечника участников эксперимента «МАРС-500», имитирующего длительный космический полет

А. В. Марданов, М. М. Бабыкин, А. В. Белецкий,
А. И. Григорьев, В. В. Зинченко, В. В. Кадников,
М. П. Кирпичников, А. М. Мазур, А. В. Недолужко,
Н. Д. Новикова, Е. Б. Прохорчук, Н. В. Равин,
К. Г. Скрябин, С. В. Шестаков



Динамика изменения микробиоты кишечника участников эксперимента «МАРС-500»

Проведен метагеномный анализ динамики изменений состава микробиоты кишечника пяти участников эксперимента «МАРС-500». В экосистеме кишечника каждого из участников происходила адаптивная перестройка таксономического состава микробиоты, отражающая индивидуальный ответ на воздействия условий эксперимента. При этом формировался новый сбалансированный таксономический состав микробиоты с функциональной компенсацией на уровне поддержания устойчивого генного состава в целостном сообществе без негативных последствий для состояния здоровья участников эксперимента.



Тетрамер метионин- γ -лиазы из *C. freundii*

Кинетические характеристики и цитотоксическая активность рекомбинантных препаратов метионин- γ -лиазы *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* и *Citrobacter freundii*

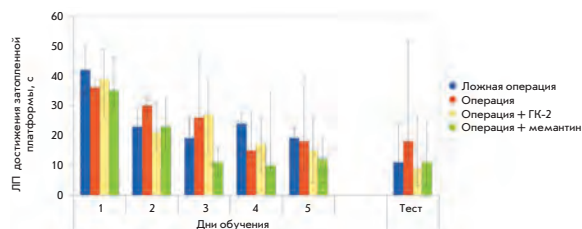
Е. А. Морозова, В. В. Куликова, Д. В. Яшин, Н. В. Ануфриева,
Н. Ю. Анисимова, С. В. Ревтович, М. И. Котлов, Ю. Ф. Белый,
В. С. Покровский, Т. В. Демидкина

Определены параметры стационарной кинетики пиридоксаль-5'-фосфат-зависимой рекомбинантной метионин- γ -лиазы из трех патогенных бактерий – *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* и *Porphyromonas gingivalis* в реакциях γ - и β -элиминирования. На культурах опухолевых клеток K562, PC-3, LnCap, MCF7, SKOV-3, L5178y оценена цитотоксичность метионин- γ -лиазы.

Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции в крысиных моделях болезни Альцгеймера

П. Ю. Поварнина, О. Н. Воронцова, Т. А. Гудашева,
Р. У. Островская, С. Б. Середин

На моделях болезни Альцгеймера (БА) у крыс изучены мнемнотропные эффекты дипептидного миметика четвертой петли фактора роста нервов ГК-2. Установлено, что ГК-2 значительно препятствует нарушению негативного обучения (habituation), вызванному септо-гиппокампальной перерезкой. На стрептозотоциновой модели БА показано, что ГК-2 выражено противодействует дефициту пространственной памяти в водном лабиринте Морриса.



Пространственное обучение и тест на сохранение навыка в водном лабиринте Морриса

Acta Naturae

ТОМ 5, № 3 (18), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 2013

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, 2013

Номер подписан в печать 11 сентября 2013 г.
Тираж 300 экз. Цена свободная.
Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

Включен в базу
данных PubMed

Входит в базу данных
Web of Science

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

Смотрите страницу на сайте ВАК:
http://vak.ed.gov.ru/ru/help_desk/list/

Публикация в журнале бесплатная
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 0.477

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов..... 1

ФОРУМ

А. Н. Либкинд, В. А. Маркусова, Л. Э. Миндели
Библиометрические характеристики рос-
сийских научных журналов по естественным
и техническим наукам по БД JCR-Science
Edition, 1995–2010 гг. 6

О. П. Трифонова, В. А. Ильин, Е. В. Колкер,
А. В. Лисица

«Большие данные» в биологии и медицине . . 14

ОБЗОРЫ

С. А. Перевозчикова, Е. А. Романова,
Т. С. Орецкая, П. Фридрихсхофф, Е. А. Кубарева
Современные представления о структурно-
функциональной организации системы
репарации неканонических пар нуклеотидов
в ДНК..... 18

Н. А. Никитенко, В. С. Прасолов
Невирусные методы доставки и терапевтиче-
ское применение малых интерферирующих
РНК..... 36

СОДЕРЖАНИЕ

А. Л. Хандажинская, Е. А. Широкова
**5'-Фосфонаты AZT: достижения
и перспективы в лечении и профилактике
ВИЧ-инфекции** 57

Н. В. Попова, И. Е. Деев, А. Г. Петренко
**Клатрин-зависимый эндоцитоз
и белки-адаптеры** 66

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

В. А. Глазунова, К. В. Лобанов, Р. С. Шакулов,
А. С. Миронов, А. А. Штиль
**Акадезин вызывает неапоптотическую гибель
опухолевых клеток** 78

К. Н. Кашкин, И. П. Чернов, Е. А. Стукачева,
Е. П. Копанцев, Г. С. Монастырская,
Н. Я. Успенская, Е. Д. Свердлов
**Опухолевая специфичность промоторов
генов, участвующих в контроле клеточной
пролиферации** 83

П. Ю. Поварнина, О. Н. Воронцова,
Т. А. Гудашева, Р. У. Островская, С. Б. Середенин
**Оригинальный дипептидный миметик фактора
роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные
когнитивные функции в крысиных моделях
болезни Альцгеймера** 88

Е. А. Морозова, В. В. Куликова,
Д. В. Яшин, Н. В. Ануфриева, Н. Ю. Анисимова,
С. В. Ревтович, М. И. Котлов, Ю. Ф. Белый,
В. С. Покровский, Т. В. Демидкина
**Кинетические характеристики и цитоток-
сическая активность рекомбинантных пре-
паратов метионин- γ -лиазы *Clostridium tetani*,
Clostridium sporogenes, *Porphyromonas
gingivalis* и *Citrobacter freundii*** 96

С. А. Боринская, А. А. Ким, А. В. Рубанович,
Н. К. Янковский
**Влияние аллелей гена *ADH1B* и уровня обра-
зования на характер потребления алкоголя
у российских мужчин** 103

Е. А. Мельник, Ю. П. Бузулуков, В. Ф. Демин,
И. В. Гмошинский, Н. В. Тышко, В. А. Тутельян
**Перенос наночастиц серебра через
плаценту и молоко матери в эксперименте
на крысах *in vivo*** 111

А. В. Марданов, М. М. Бабыкин, А. В. Белецкий,
А. И. Григорьев, В. В. Зинченко, В. В. Кадников,
М. П. Кирпичников, А. М. Мазур, А. В. Недолужко,
Н. Д. Новикова, Е. Б. Прохорчук, Н. В. Равин,
К. Г. Скрябин, С. В. Шестаков

**Метагеномный анализ динамики изменений
состава микробиома кишечника участников
эксперимента «МАРС-500», имитирующего
длительный космический полет** 120

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Д. В. Щепкин, А. М. Матюшенко, Г. В. Копылова,
Н. В. Артемова, С. Ю. Бершицкий, А. К. Цатурян,
Д. И. Левицкий

**Стабилизация центральной части тропомиозина
изменяет чувствительность актин-миозинового
взаимодействия к ионам кальция** 130

Правила для авторов 134

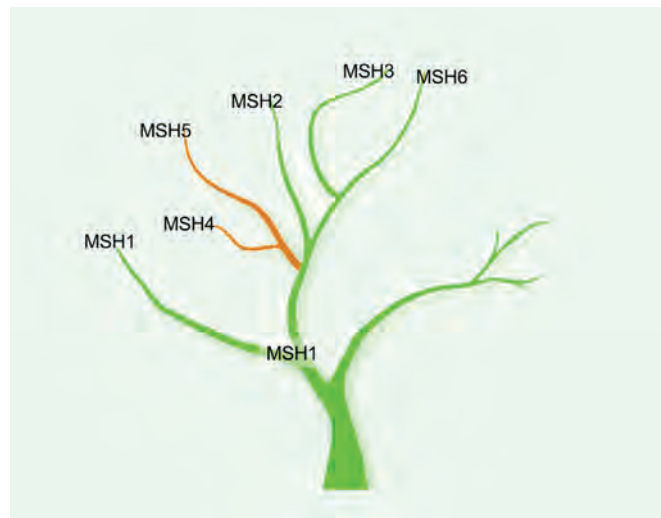


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

См. статью Перевозчиковой и др.

Библиометрические характеристики российских научных журналов по естественным и техническим наукам по БД JCR-Science Edition, 1995–2010 гг.

А. Н. Либкинд^{1,3}, В. А. Маркусова¹, Л. Э. Миндели²

¹Всероссийский институт научной и технической информации РАН, 125190, Москва, ул. Усиевича, 20

²Институт проблем развития науки РАН, 117485, г. Москва, ул. Бутлерова, 12, а/я 6

³Финансовый университет при Правительстве РФ, 125993, Москва, Ленинградский просп., 49
E-mail: libkind@viniti.ru, markusova@viniti.ru, L.Mindeli@issras.ru

Поступила в редакцию 26.03.2013

РЕФЕРАТ Впервые на макроуровне, то есть без учета предметных категорий, проведен представительный эмпирический библиометрический анализ отечественных журналов, входящих в аналитическую БД Journal Citation Reports-Science Edition (JCR-SE) за период с 1995 по 2010 г. Установлено, что рост суммарного числа статей в зарубежных и отечественных журналах (в 1.8 раза по сравнению с потоком 1995 г.) существенно опережает темпы роста этого показателя для отечественных журналов (в 1.2 раза). Доля отечественных статей в мировом потоке публикаций, включенном в JCR-SE, снизилась с 2.5% в 1995 г. до 1.7% в 2010 г. Установлено снижение количества статей (на 20%), опубликованных в среднем отечественном журнале, по сравнению с мировым потоком. Эти обстоятельства приводят к тому, что наблюдается стагнация отечественного потока научных статей (около 30 000 статей ежегодно), хотя спектр российских журналов расширился до 150 наименований. За последние 15 лет в 2 раза увеличилось значение импакт-фактора отечественного журнала, т.е. темпы роста среднего значения импакт-фактора выше, чем темпы увеличения этого показателя в мировом потоке (рост в 1.4 раза). Предлагаются меры повышения качества отечественных журналов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА импакт-фактор, отечественный журнал, мировой поток, библиометрические показатели, ожидаемая цитируемость, JCR.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что импульсом к развитию наукометрии послужило создание и выпуск в 1963 г. д-ром Ю. Гарфилдом Указателя цитированной литературы – Science Citation Index (SCI) в Институте научной информации США (Institute for Scientific Information (ISI))¹. Это событие стало революционным фактором не только в создании нового уникального информационного ресурса, но и привело к развитию новой научной дисциплины – наукометрии, или, как теперь чаще говорят, библиометрии. Как отмечал д-р Ю. Гарфилд, «мы являемся свидетелями

превращения библиометрических исследований в новую отрасль индустрии – оценку результативности научных исследований, выполняемых в университетских и научных коллективах» [1]. И хотя в научном сообществе растет недовольство увлечением бюрократов из различных фондов и министерств всевозможными рейтингами и оценками, влияние этих показателей на финансирование фундаментальной науки становится все более заметным.

По мере накопления колоссальных массивов библиографической информации в ISI и одновременного интенсивного развития вычислительной техники в США появилась возможность создания в 1975 г. нового информаци-

онного продукта, основанного на взаимосвязях научных журналов – Указателя цитируемости научных журналов – Journal Citation Reports (JCR) – по естественным и техническим наукам, выпускаемого ежегодно. С 1978 г. публикуется специальная версия этого Указателя по общественным наукам – JCR-Social Sciences. Начиная с 2009 г. обе версии JCR доступны в режиме он-лайн как составная часть информационной платформы Web of Knowledge (WoK). Указатель JCR содержит статистические таблицы о взаимосвязях научных журналов, основанных на их взаимной цитируемости, и сведения об их импакт-факторе (ИФ). Первые понятие импакт-фактор было

¹ С 2001 г. этот институт принадлежит компании Thomson Reuters (TR).

предложено д-ром Ю. Гарфилдом совместно с д-ром И. Шером (Irving Sher) в 1955 г. [2]. Введение этого термина способствовало более качественному отбору научных журналов, осуществляемому библиотеками и информационными службами. Однако ИФ быстро стал популярен как символ научного престижа журнала, хотя его значения сильно различаются в зависимости от области знания и его релевантности предметной области. «Сейчас, – сказал д-р Ю. Гарфилд, – многие ученые и редакторы делают ужасную ошибку, когда думают, что SCI был создан только для того, чтобы производить его побочный продукт JCR. Основная цель этих ресурсов – информационное обеспечение исследователей, хотя массивы библиографических записей являются неоценимым источником наукометрической информации» [1].

Можно много говорить о достоинствах и недостатках ИФ, но получить исследовательский грант в зарубежных университетах практически невозможно, если заявитель гранта не имеет публикаций в журналах с высоким ИФ. Невозможно перечислить количество библиометрических исследований, основанных на использовании статистики Указателя JCR и посвященных различным аспектам применения ИФ, в том числе анализу темпов роста научной литературы по определенной предметной категории, факторам, влияющим на значение ИФ внутри определенных тематических категорий, а также использованию ИФ финансирующими организациями как показателя оценки научной деятельности на уровне факультетов университетов и исследовательских коллективов.

В отдельных областях знания чрезмерное увлечение ИФ в качестве индикатора оценки эффективности научной деятельности и при-

нятия решений о продвижении по служебной лестнице (получения «пожизненной» позиции – *tenure position*), а также при оценке жизнеспособности факультетов и колледжей приводит к негативным последствиям. Так, например, отмечается [3], что «стремление научного персонала медицинских колледжей во многих странах мира публиковаться только в журналах с высоким ИФ ставит под угрозу само существование медицинских журналов по проблемам ухода за больными (*nursing journals*) и приводит к прекращению публикации книг и глав в книгах, для которых не вычисляются ИФ». В Нидерландах погоня за публикацией статей только в журналах, входящих в JCR, привела к прекращению выпуска национальных журналов по общественным наукам [4]. Большой вклад в развитие библиометрических исследований, связанных с нормализацией ИФ в различных областях знаний, внесен Т. Брауном (Braun T.) [5], В. Гланцелом (Glanzel W.) [6], Л. Лейдесдорфом (Leydesdorff L.) [7].

Рост объемов научной литературы и превращение индустриального общества в экономику знаний привели к расширению спектра научной периодики, используемой для подготовки JCR. Если первый выпуск этого Указателя содержал статистику о 3000 научных журналов, то в 2010 г. в JCR-Science Edition таких журналов было 8700. По мнению немецких специалистов [8], расширение спектра журналов, обрабатываемых в компании Thomson Reuters, связано с конкурентной борьбой за пользователя с голландской компанией Elsevier, выпускающей с 2005 г. БД Scopus. Эта БД является в значительной степени аналогом SCI. Для подготовки БД Scopus используются свыше 18000 научных журналов. Критерии отбора журналов для включения в ин-

формационные ресурсы Thomson подробно обсуждены в работе [9]. Значения ИФ зависят от языка публикации, области исследования и социокультурных традиций национальной науки. Первый анализ совокупности советских журналов был выполнен д-ром Ю. Гарфилдом [10]. Среди работ, анализирующих ИФ российских научных журналов, следует отметить работу И. Маршаковой, посвященную сопоставительному анализу ИФ отечественных и польских журналов по математике [11].

Представительный глубокий (*in depth*) анализ библиометрических характеристик отечественных научных журналов не проводился за последние 20 лет. Цель нашего эмпирического исследования, выполненного на макроуровне (вне зависимости от предметной категории журнала), состояла в выявлении тенденций библиометрических характеристик отечественных научных журналов и сопоставлении их с мировыми тенденциями при помощи анализа годовых комплектов Указателя JCR-Science Edition (JCR-SE) за 1995–2010 гг. Поскольку в Указатель JCR-Social Sciences за последнее десятилетие были включены только четыре отечественных журнала, то данные сопоставительного анализа этих журналов с тенденциями мирового потока не были бы статистически значимыми.

Выбор тематики нашего исследования непосредственно связан с проходящей в стране реформой науки и высшей школы. Эта реформа сопровождается усилением внимания Президента страны и Правительства РФ к библиометрическим показателям оценки науки. 7 мая 2012 г. Президент России Владимир Путин подписал указ «О мерах по реализации государственной политики в области образования и науки».

В этом указе, в частности, идет речь о повышении конкурентоспособности отечественных вузов и «вхождении к 2020 году не менее пяти российских университетов в первую сотню ведущих мировых университетов согласно мировому рейтингу университетов» [12]. Выполнение этой задачи в значительной степени связано с ИФ научных журналов, в которых будут опубликованы работы сотрудников высшей школы. Выполненные нами ранее исследования показали, что около 60% отечественных статей, входящих в Web of Science (WoS), были опубликованы в отечественных научных журналах [13]. При этом, несмотря на расширение спектра наименований отечественных журналов в информационной системе Web of Science, поток публикаций России за последние годы остается стабильным и не превышает 30 000 статей. Огромные финансовые инвестиции Правительства России в университеты привели к тому, что университеты платят авторам значительные суммы за опубликование статей в журналах, входящих в информационную систему WoS, причем сумма вознаграждения зависит от величины ИФ [14].

МЕТОДИКА

Источником сбора библиометрической статистики послужили выпуски Указателя JCR-Science Edition за 1995–2010 гг. За период с 1995 по 2008 г. этот Указатель выпускался на оптических дисках, а с 2009 г. он размещается на платформе Web of Knowledge, доступной по подписке через Интернет. К сожалению, у нас отсутствовал диск за 2001 г., поэтому статистика была собрана только за 15-летний промежуток времени: 1995–2000 и 2002–2010 гг.

Библиометрическая статистика была собрана из JCR за каждый год по следующим показателям:

- количество журналов как оте-

чественных, так и в мировом потоке;

- доля отечественных журналов в мировом потоке;
- количество статей в мировом и российском потоке;
- среднее количество статей, опубликованных в российском журнале и в журнале мирового потока;
- среднее значение ИФ отечественного научного журнала и журнала мирового потока;
- ожидаемый отклик отечественного журнала и журнала мирового потока.

Для расчета этого показателя, характеризующего степень влияния журнала на мировые научные исследования, был рассчитан ожидаемый отклик (expected response – ER) на статьи, опубликованные в заданном журнале (отечественном или из мирового потока), в течение заданного года. Ожидаемый отклик – это произведение числа статей, опубликованных в журнале в данном году t , на значение ИФ этого журнала в этом же году t :

$$ER_j^t = f_j^t IF_j^t,$$

где f_j^t – число статей, опубликованных журналом j в году t ; IF_j^t – ИФ журнала j в году t ; ER_j^t – ожидаемый отклик на статьи, опубликованные в журнале j в году t .

L_t – список журналов (отечественных или мировых) в данном году t . Суммарный ожидаемый отклик S_{ER}^t на статьи, опубликованные во всех журналах из списка L_t в году t , определяли по формуле:

$$S_{ER}^t = \sum_{j=1}^{N_{L_t}} ER_j^t,$$

где N_{L_t} – общее число журналов в списке L_t .

Исходная информация, содержащаяся в каждом годовом комплекте JCR-SE, была загружена в специальную базу данных, реа-

лизованную на платформе MS SQL Server 5. В итоге была собрана статистика по каждому из указанных выше индикаторов в каждом из 15 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования свидетельствуют о неуклонном росте количества журналов, используемых для подготовки WoS¹, и, как следствие, JCR, а именно: в 1995 г. в JCR-SE было включено 4655 наименований, а в 2010 г. их число составило 8073, т.е. наблюдался рост в 1.75 раза. В 1995 г. в эту БД входило 108 отечественных журналов, а в 2010 г. их количество расширилось до 148, т.е. наблюдался рост в 1.37 раза (см. рис. 1). Разница в темпах роста отечественной и мировой периодики, включенной в эту БД, оказывает негативное влияние на величину научной продуктивности России. На рис. 1 представлены графики, характеризующие темпы роста отечественного и мирового потока научных журналов, причем за единицу отсчета приняты 1995 г.

Значительное падение наблюдалось в 1997 г. (до 96 наименований), затем в 1998 г. количество журналов выросло до 112. Относительно стабильное число наименований между 2004–2008 гг. выросло до 130 в 2009 г. и до 148 в 2010 г. Изменения в количестве российских журналов за рассматриваемый период частично были связаны с технологией перехода компании TR с обработки русскоязычных версий на англоязычные. Рост охвата отечественной периодики связан как с повышением качества отечественных журналов, так и с конкуренцией с системой Scopus, в которую включено 230 наименований.

¹ В JCR-SE попадает только 93–95% российских публикаций из 100% научных журналов, включенных в информационную систему WoS (Science Citation Index-Expanded).

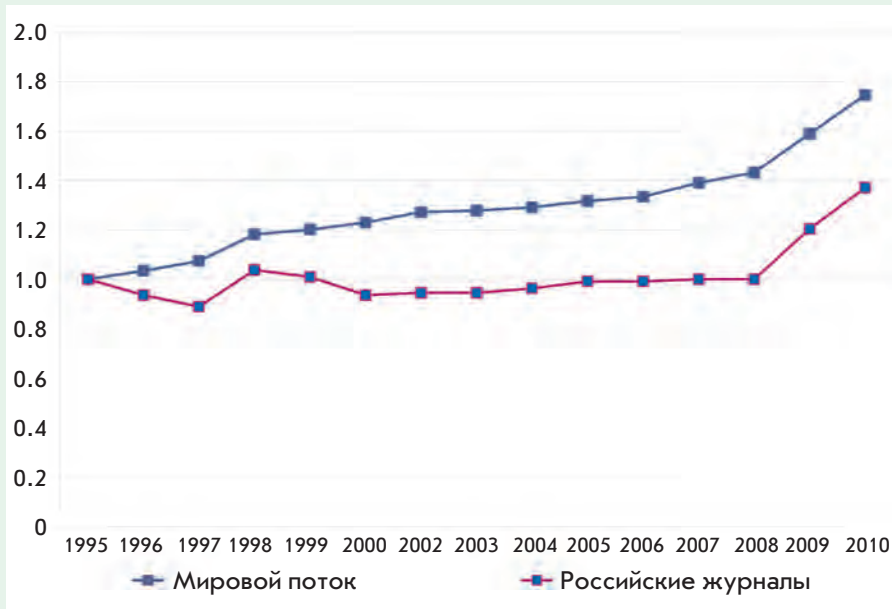


Рис. 1. Темпы роста числа отечественных научных журналов и мирового потока по отношению к 1995 г., включенных в БД JCR-SE

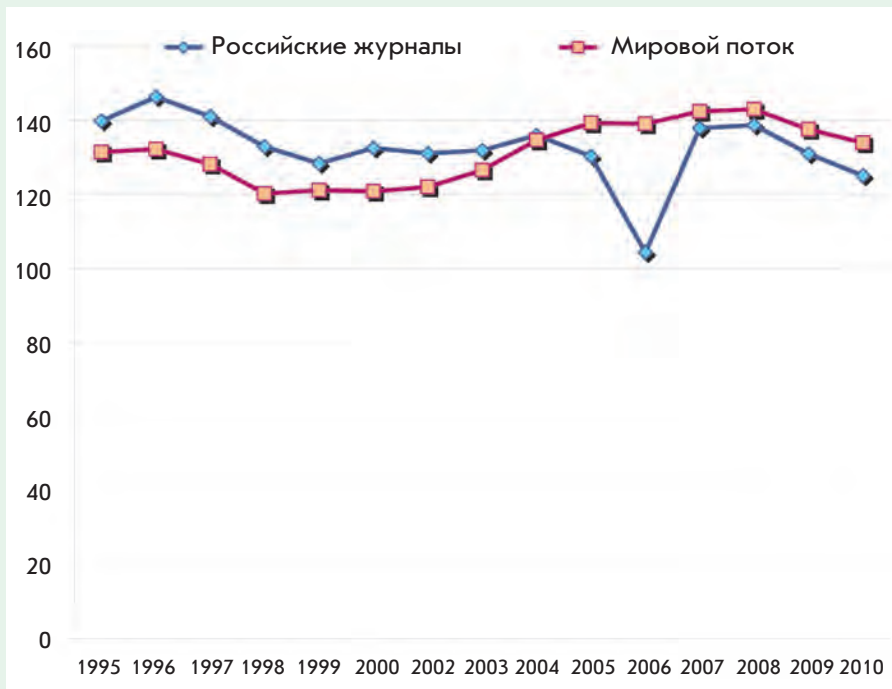


Рис. 2. Изменения в количестве статей в одном среднем российском журнале и в журнале мирового потока по БД JCR-SE

Наши данные по росту мирового потока практически совпадают с данными обследования [7], выполненного на основе статистики WoS (обе версии SCI-Expanded SSCI-Expanded), за 2000–2008 гг. Согласно этой публикации количество журналов выросло на 29% со средним темпом роста 3.3%. Наибольший рост отмечен в 2007–2008 гг. Известно, что журнал должен входить в WoS не менее двух лет, прежде чем появится его ИФ, поэтому ИФ журналов за 2008 г. публикуются в JCR только в 2010 г.

Рост мирового потока обусловлен рядом причин, в том числе развитием и глобализацией науки, появлением новых научных направлений и новых научных журналов, а также и политикой компании Thomson по расширению спектра наименований журналов, представленных в информационной системе WoS.

Как отмечается в работе [11], рост объемов публикаций в информационной системе WoS характеризуется высокими темпами. Нами показано, что в 1995 г. в БД JCR-SE содержалась информация о 607049 статей, а в 2010 г. количество статей достигло 1080209 единиц, т.е. наблюдался рост в 1.78 раза. Количество российских статей, охватываемых этой БД, также выросло, но всего в 1.22 раза. При этом доля отечественных статей в мировом потоке публикаций, включенном в JCR-SE, снизилась с 2.48% в 1995 г. до 1.7% в 2010 г.

Нас интересовал вопрос, в какой степени рост общего количества отечественных статей связан с расширением спектра наименований наших журналов, включенных в JCR-SE, или этот рост обусловлен увеличением количества статей в одном среднем журнале. С этой целью выполнен анализ тенденций развития одного среднего отечественного журнала и журнала мирового потока. На рис. 2 пред-

Таблица 1. Доля статей, опубликованных в отечественных журналах

Год	Доля статей в отеч. журналах, %
2006	44.6
2007	46.3
2008	43.7
2009	45.8
2010	53.6

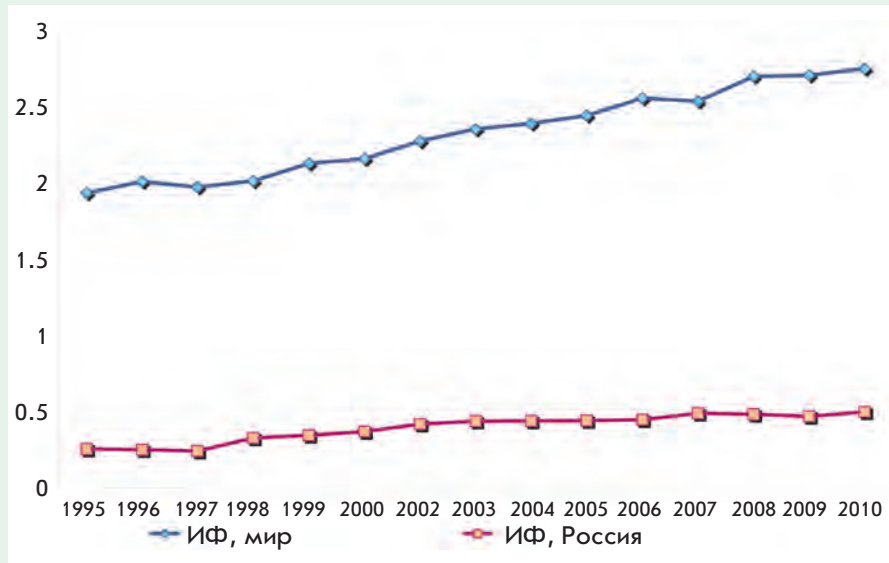


Рис. 3. Тенденции значений ИФ научных журналов за 1995–2010 гг. по БД JCR-SE

ставлены два графика, характеризующие тенденции обоих видов научных журналов.

Данные, представленные на рис. 2, показывают «взлеты» и «падения» в среднем количестве статей в одном российском журнале. Резкий провал на графике в 2006 г. связан, очевидно, с изменениями, происходящими в то время в издательстве «Наука» и в компании, отвечающей за переводы отечественных журналов. В целом количество статей в одном среднем российском журнале снизилось по сравнению с 1996 г. на 18.3% (или на 20 статей!). В мировом потоке тенденция была противоположной – наблю-

дался рост на 1.9%. Можно констатировать, что именно значительное снижение количества статей (почти на 20% с учетом скорости роста мирового потока) в одном российском журнале, произошедшее за последние 15 лет, – одна из основных причин отсутствия роста научной продуктивности России, несмотря на значительное расширение спектра отечественных журналов, включенных в WoS.

Чтобы судить о всех причинах стагнации отечественного потока, нужно собрать статистику по всем статьям отечественных ученых, опубликованных в иностранных научных журналах. Мы сопоста-

вили количество отечественных публикаций, включенных в WoS, и количество отечественных статей, включенных в JCR-SE за 2006–2010 гг. Эти данные представлены в табл. 1.

Как видно из таблицы, в 2009–2010 гг. значительно выросло число статей, опубликованных в отечественных журналах. При этом доля публикаций российских ученых в зарубежных научных журналах остается очень высокой, это показывает, что наша наука является частью мировой науки.

Величина ИФ научного журнала играет важную роль при оценке научной эффективности исследователя, заметим, что зачастую слишком большую. В 2005 г. среднее арифметическое значение ИФ одного отечественного журнала составляло 0.27, а журнала мирового потока – 1.3, т.е. различия составили 4.8 раза. За обследуемый период у журналов обеих групп отмечена тенденция к росту значений ИФ. Эти сведения представлены на рис. 3.

Среднее арифметическое значение ИФ отечественного журнала за обследуемый период увеличилось в 1.75 раза, хотя и остается относительно низким. Однако, несмотря на явное различие в величине ИФ между средним отечественным журналом и журналом мирового потока, в 2010 г. эта разница незначительно уменьшилась: в 1995 г. разрыв в величинах ИФ составлял 4.8 раза, а в 2010 г. – 4.1 раза. Временной интервал от представления рукописи статьи в отечественный научный журнал до ее опубликования составляет не менее года, а возможность этой публикации быть процитированной в том же году практически равна нулю. Это только одна из причин, почему ИФ отечественных журналов значительно ниже, чем у зарубежных. В мировом потоке научных журналов доля изданий по наукам о жизни и клиниче-

Таблица 2. Отечественные научные журналы, вошедшие в первые 25 и 50% соответствующей предметной категории

Журнал	Импакт-фактор	Ранг среди российских журналов по ИФ	Ранг в предметной категории JCR	Предметная категория	Количество журналов в предметной категории	Величина доли в предметной категории JCR, %
Лазерная физика	1.362	5	34	Оптика	79	50
Успехи физических наук	2.245	2	18	Междисциплинарные науки, физика	80	25
Успехи химии	2.346	1	43	Междисциплинарные науки, химия	154	50
Письма в ЖЭТФ	1.557	3	32	Междисциплинарные науки, физика	80	50
Функциональный анализ и его применение	0.688	25	103	Математика	279	50
Московский математический журнал	0.721	21	93	Математика	279	30
Математическая физика	1.131	6	28	Междисциплинарные науки, физика	55	50
Журнал «Экспериментальной и теоретической физики»	0.946	12	41	Междисциплинарные науки, физика	80	50

ской медицине превышает 70%. Как известно, эти области знания характеризуются высокой цитируемостью и самыми высокими значениями ИФ. Картина распределения отечественных научных журналов по областям знания совершенно иная: около 80% составляют науки, называемые «hard science», т.е. физика, химия, математика, материаловедение, науки о Земле, у которых показатели цитируемости значительно ниже. Этот факт также значительно влияет на относительно невысокое значение среднего ИФ.

Как мы отмечали выше, величина ИФ журнала, в котором публикуются российские исследователи, приобретает все более важное значение, поскольку университеты вводят дополнительное финансовое вознаграждение авторам в зависимости от величины ИФ журнала [13]. Некоторые университеты разрабатывают поправочные коэффициенты в зависимости от национальной принадлежности журнала: отечественный или иностранный <http://urfu/fileadmin/>

user_upload/docs/science/Prikaz_122_2013.pdf.

Традиционно среди российских журналов наиболее высокие значения ИФ имеют обзорные журналы «Успехи физических наук» и «Успехи химических наук»¹. При оценке научной эффективности определенное значение имеет не только величина ИФ, но и то, в какую процентную группу входит журнал в соответствующей предметной категории. Исследование на эту тему выполнено д-ром Ю. Гарфилдом и А. Пудовкиным (Институт биология моря, ДВО РАН) [15].

Наиболее значимыми считаются журналы, принадлежащие к определенной предметной категории и ранжированные по величине ИФ, которые составляют первые 25%. Это исследование привело к широкому использованию при-

¹ В 2011 г. на первое место по значению ИФ вышел журнал «Лазерная физика» (3.065). Однако имеются серьезные опасения, что из-за чрезвычайно высокой самоцитируемости этого журнала он может быть исключен в следующем году из JCR.

надлежности научного журнала к 25% категории как за рубежом, так и в России. Например, в МГУ преподавателям ежемесячно начисляют дополнительное «финансовое вознаграждение за опубликование статей в международных научных журналах, входящих в 25% научных журналов, ранжированных по величине ИФ в соответствующей предметной категории по классификации Web of Science» <http://istina.imec.msu/statistics/journals/top>.

Выше мы отмечали, что значение ИФ сильно зависит от предметной категории, поскольку цитируемость между иммунологией и математикой различается почти на порядок. В списке отечественных журналов в JCR-SE за 2010 г. всего девять имеют значения ИФ выше единицы. Однако только несколько из них попали в 25 или 50% наиболее престижных научных журналов соответствующей предметной категории. В табл. 2 приведены сведения об этих журналах. Примечательно, что среди восьми таких журналов оказалось

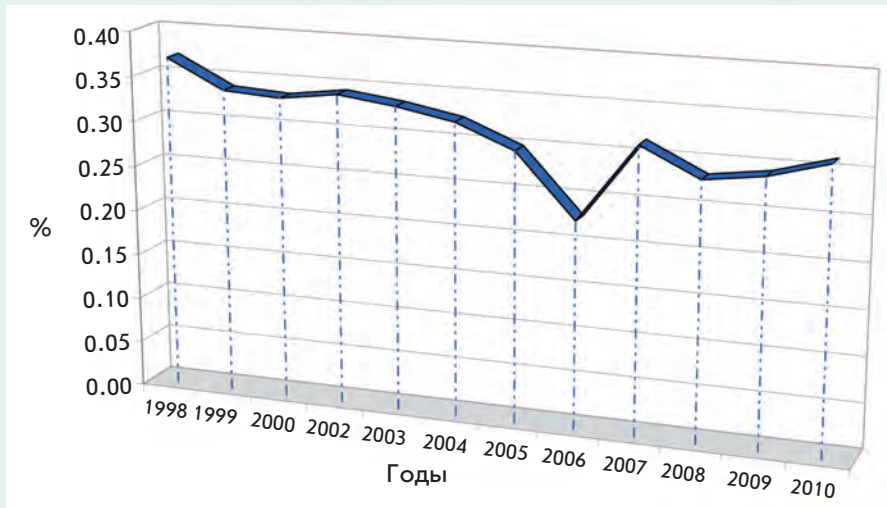


Рис. 4. Доля ожидаемого отклика на публикации в отечественных журналах

три математических, значения ИФ которых значительно ниже единицы.

Ряд журналов, которые имеют относительно высокое значение ИФ среди отечественных журналов, не попали даже в группу 75%. Это произошло с журналом «Биохимия», имеющим 4-й ранг среди отечественных журналов с ИФ 1.402. Этот журнал принадлежит предметной категории «Biochemistry and molecular biology», которая состоит из 286 научных журналов. Ранг «Биохимии» в этой предметной категории 234, и он не входит даже в 75%. Или, например, журнал «Письма в Астрономический журнал» с ИФ 1.091, который имеет 8-й ранг среди отечественных журналов по величине ИФ и 36-й ранг среди 55 научных журналов в предметной категории «Astronomy and astrophysics». Это журнал попадает в группу 75% журналов. Остальные отечественные журналы имеют относительно низкие ранги в соответствующих предметных категориях. На наш взгляд, нужно повысить авторитетность отечественных научных журналов

в международных научных кругах. Было бы целесообразно пригласить иностранных коллег в состав редколлегий, снабжать каждый выпуск журнала аннотацией содержания на английском языке. Авторы должны предоставлять реферат и список ключевых слов на русском и английском языках. Статьи должны сопровождаться списком процитированной литературы. Актуальным представляется создание языковых консультационных бюро для помощи в редактировании статей, написанных российскими авторами на английском языке. Публикации ведущих ученых в отечественных журналах способствуют развитию отечественной науки и служат ориентиром для молодежи в их научной деятельности. Поскольку Министерство образования и науки РФ придает большое значение библиометрическим показателям отечественной науки, то оно могло бы заимствовать опыт зарубежных университетов и колледжей, в которых есть специальные курсы по обучению подготовки научных статей и отчетов, технических статей и заявок на гранты.

Ожидаемый отклик (expected response – *ER*) на статьи журнала – это произведение числа статей на ИФ этого журнала в рассматриваемом году. Для определения ожидаемого отклика совокупности отечественных журналов (или мирового потока) берется сумма этих произведений по всему заданному (отечественные журналы или мировой поток) множеству за данный год. Видно, что пик ожидаемого отклика приходится на отечественные журналы 12-летней давности. Провалы, отмеченные на кривой, связаны с технологическими изменениями в обработке журналов, о чем мы говорили выше. Доли (%) ожидаемого отклика множества отечественных журналов от суммарного ожидаемого отклика мирового потока за 1995–2010 гг. представлены на рис. 4.

Следует отметить, что это данные отклика только на отечественные статьи, опубликованные в отечественных журналах. Поскольку свыше 45% отечественных статей публикуются в иностранных журналах, то суммарный отклик на отечественные статьи будет значительно выше.

ВЫВОДЫ

Впервые на макроуровне (без учета предметных категорий) выполнен представительный эмпирический библиометрический анализ отечественных журналов, входящих в аналитическую БД Journal Citation Reports-Science Edition (JCR-SE) за период с 1995–2010 г.

Рост мирового потока статей (в 1.8 раза) по сравнению с потоком в 1995 г. опережает темпы роста отечественных публикаций (1.2 раза). Как следствие, доля отечественных статей в мировом потоке публикаций, включенном в JCR-SE, снизилась с 2.49% в 1995 г. до 1.71% в 2010 г.

Установлено, что за рассмотренный период количество наименований журналов мирового

потока выросло в 1.75 раза, а отечественных – в 1.37 раза.

За 15-летний период количество статей, содержащихся в одном среднем отечественном журнале, снизилось на 17.9% по сравнению с 1995 г. В мировом потоке наблюдался рост на 1.9%. Это снижение является причиной стагнации величины научной продуктивности России в период 2008–2010 гг., несмотря на расширение числа отечественных журналов, включенных в Web of Science. Другая причина – снижение доли отечественных журналов в мировом потоке журналов, используемых

для подготовки Web of Science с 2.34% в 1995 г. до 1.83% в 2010 г.

Несмотря на то что величина средневзвешенного ИФ отечественных журналов остается значительно более низкой, чем у журналов мирового потока, его значение выросло в 1.96 раза по сравнению с 1995 г. В то же время рост значений средневзвешенного ИФ мирового потока составил 1.42 раза.

Наши данные представляют надежную статистику для лиц, отвечающих за научную и издательскую политику. Для повышения библиометрических показателей отечественной науки необходи-

мо повысить качество переводов отечественных журналов на английский язык и одновременно ввести программы для аспирантов и студентов на тему «Как готовить научную статью». Решающая роль в такой подготовке принадлежит Министерству образования и науки. ●

Авторы выражают признательность РНГФ за финансовую поддержку этого исследования (грант № 12-70000) и компании Thomson Reuters за возможность использовать данные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garfield E. // 12th COLLNET Meeting. September 20–23, 2011. Istanbul Bilgi University, 2011.
2. Garfield E. // J. Am. Med. Ass. 2006. V. 295. № 1. P. 90–93.
3. Johnstone M.J. // Intern. Nursing Rev. 2007. V. 54. № 1. P. 35–40.
4. Leydesdorff L., Wagner C. // Macro-level Indicators of the Relations between Research Funding and Research Output <http://www.leydesdorff.net/roadmap/roadmap.pdf>
5. Braun T., Glanzel W., Schubert A. // Scientometrics. 2006. V. 69. № 1. P. 169–173.
6. Glanzel W. // Scientometrics. 2006. V. 67. № 2. P. 121–129.
7. Halfman W., Leydesdorff L. Is inequality among universities increasing? Gini coefficients and the elusive rise of elite universities. www.loet@leydesdorff.net
8. Michels C., Schmoch U. // Scientometrics. 2012. V. 93. № 3. P. 831–846. DOI 10.1007/s11192-012-0732-7 DEC 2012
9. Маркусова В.А. // Acta Naturae. 2012. T. 4. № 2 (13). С. 6–13.
10. Garfield E. Citation Indexing. N. Y.: John Wiley & Sons, 1981. 274 p.
11. Маршак-Шайкевич И. // Социология науки и техники. 2012. Т. 3. № 2. С. 79–100.
12. Указ Президента РФ от 7 мая 2012 г. № 599 «О мерах по реализации государственной политики в области образования и науки» / Официальный сайт Президента России. М., 2012. URL: <http://graph.document.kremlin.ru/page.aspx?1;1610850>.
13. Маркусова В.А., Иванов В.В., Варшавский А.Е. // Вест. АН. 2009. № 7. С. 483–491.
14. Либкинд А.Н., Маркусова В.А. // Поиск. 2013. № 18 (3 мая). С. 10.
15. Garfield E., Pudovkin A. // 6th Intern. Conf. on Webometrics, Informetrics and Scientometrics & 11th COLLNET Meeting from 19–22 October 2010 in Mysore, South India, 2010.

«Большие данные» в биологии и медицине

По материалам совместного семинара с представителями международной организации Data-Enabled Life Science Alliance, 4 июля 2013 года, Москва, Россия

О. П. Трифонова^{1*}, В. А. Ильин^{2,3}, Е. В. Колкер^{4,5}, А. В. Лисица¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

²Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

³Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 58

⁴ DELSA Global, США

⁵ Seattle Children's Research Institute, 1900 9th Ave Seattle, WA 98101, США

*E-mail: oxana.trifonova@gmail.com

Задача извлечения новых знаний из больших массивов данных обозначается понятием «большие данные» (Big Data). Говоря проще, Big Data – это когда результаты экспериментов не загружаются в таблицу Excel. Например, переписка в Twitter за год на порядки превосходит объем памяти человека, накопленной за всю жизнь. На фоне Twitter все данные о геномах людей представляются пренебрежимо малой величиной [1]. Вопрос о преобразовании массивов данных в знание, обозначенный в 2013 году системой Национальных институтов здоровья США, является приоритетом международного альянса DELSA (Data-Enabled Life Science Alliance, www.delsaglobal.org) [2].

Почему компьютерные вопросы сбора больших данных стимулировали образование сообщества DELSA, куда вошло более 80 ведущих ученых мира, работающих в области медицины, здравоохранения и прикладной информатики? Это новое течение обсуждали участники семинара «Конвергент-

ные технологии: Big Data в биологии и медицине».

В работе семинара приняли участие 35 человек, среди которых были представители научно-исследовательских институтов, занимающиеся анализом больших объемов экспериментально полученных данных, и коммерческие компании, которые осуществляют разработку информационных систем. На семинаре было представлено 16 коротких докладов, целью которых была не столько демонстрация полученных результатов, сколько обсуждение, почему манипулирование большими массивами данных должно иметь отношение к вопросам медицины и здравоохранения.

От имени альянса DELSA Global (Data-Enabled Life Science Alliance, www.delsaglobal.org) открыл семинар проф. Евгений Колкер докладом о миссии данной организации. Альянс выступает за глобализацию биоинформационных подходов в естественных науках и создание научных сообществ в области «омных» наук. Главная идея – ускорить процесс трансляции результатов

медико-биологических исследований для удовлетворения потребностей общества.

И без участия биологов во многих науках накапливаются большие массивы данных, которые надо хранить, обрабатывать и анализировать, и в этом нет ничего удивительного. Если говорить о больших объемах данных в области физики высоких энергий, то речь идет о десятках петабайтах, а если о медицине и биологии – то на порядок меньше, но тоже приближается к петабайту. В ходе семинара обсуждался вопрос, за что «зацепиться» российским ученым в мире Big Data – либо за молекулярную биологию в формате «омик», либо за интегративную биологию при моделировании мозга, либо вообще за социальные науки.

Задачи работы с большими объемами данных делятся на две группы: (1) когда данные поступают в режиме реального времени и требуют немедленной обработки и (2) когда есть много накопленных данных, требующих разносторонней интерпретации. Первый тип данных относится к коммерческим



От проблемы к решению: на вызов NIH готовы ответить специалисты в области обработки данных Data-Enabled Life Science Alliance – DELSA

системам, таким, как Google, Twitter и Facebook. Примером второго типа данных являются геномные и протеомные репозитории.

В Институте системного программирования РАН занимаются разработкой систем для работы с большими массивами слабоструктурированных и противоречивых данных, характерных для медико-биологических наук. Для реализации интеллектуальных методов поиска, хранения и анализа данных применяются наборы утилит, библиотек, а также распределенные программные каркасы (фреймворки), работающие на кластерах из сотен и тысяч узлов. Такие проекты, как Hadoop (<http://hadoop.apache.org/>), Data-Intensive Computing, NoSQL, используются для реализации интеллектуального поиска при работе высоконагруженных веб-сайтов.

Работа с массивами данных путем интеграции информации, полученной на различных организационных уровнях, составляет сущность принципиально новой дисциплины – коннектомики, о которой участникам семинара рассказал чл.-корр. РАН и РАМН

Константин Анохин (НИЦ «Курчатовский институт»). Большие объемы данных будут накапливаться в области нейронаук из-за слияния двух основополагающих факторов. Во-первых, в области нейронаук накоплено огромное количество результатов, полученных с использованием аналитических методов с высоким разрешением. Во-вторых, основной интерес ученых вызывает не работа отдельных синапсов, а как работает целый мозг и как эта работа проецируется на систему – сознание, мысль, действие. Получение информации о работе мозга как системы включает в себя методы визуализации – томографию высокого разрешения, световую микроскопию, электронную микроскопию. Мегапроекты по моделированию мозга уже стартовали (например, Human Brain Project в Европе). Со временем вложения в процесс получения новых экспериментальных данных будут девальвироваться, а вот анализ полученных данных станет приоритетной задачей.

Экстракция и интерпретация информации из существующих баз данных за счет новых алго-

ритмов анализа играет определяющую роль в будущей науке. Наличие большого количества открытых источников информации, включая различные базы данных и поисковые системы, часто затрудняет поиск необходимой информации. По словам чл.-корр. РАМН Андрея Лисицы (Институт биомедицинской химии РАМН), существующие базы данных по интерактоме совпадают друг с другом максимум на 55% [3]. Задачей при работе с большими массивами становится получение непротиворечивой картины при сведении данных из разных источников воедино.

В Медико-генетическом научном центре РАМН интегрированный подход используют для поиска панелей биомаркеров по существующим геномным, транскриптомным и протеомным данным. Для описания нормальной ткани человека (условно-статистическое понятие нормы) требуется несколько тысяч показателей, которые будут различны для здоровых людей, и понятие усредненного показателя нормы некорректно отражает ситуацию. Проф. Анча Баранова (Медико-

генетический научный центр РАМН) предлагает использовать понятие многомерного пространства нормальной ткани и с помощью коэффициентов корреляции определять расстояние каждого анализируемого образца от условного центра – «идеального состояния». Больные ткани будут находиться дальше от центра, чем здоровые. Предложенный подход позволяет перейти от вероятностной диагностики (например, болен с вероятностью 30%) к измерению расстояния конкретного пациента от нормы.

В докладе д. ф.-м. н. Всеволода Макеева (Институт общей генетики РАН) утверждалось, что в ближайшем будущем мы будем все больше работать с большими массивами постгеномных данных. Эти данные будут двух типов – данные типа индивидуального генома (проект «1000 геномов»), которые получают один раз и хранят в базах данных, чтобы при необходимости скачать. Второй тип – это, например, результаты транскриптомного или протеомного анализа, который проводится регулярно для получения интегрированного «омикс»-профиля индивидуума [4]. В случае геномов существует несколько провайдеров данных; и российские лаборатории, пользуясь этими хранилищами и применяя свои биоинформатические подходы, могут получать новые результаты [5].

По мере внедрения современных методов анализа в клиническую практику будет расти поток динамических данных от индивидуума (результаты мониторинга параметров организма). Встанет необходимость быстрой обработки непрерывно получаемых данных и передачи информации в хранилища для последующего аннотирования и автоматической выработки решений. Это вызовет модификацию технологий хранения и передачи данных для более

быстрого обмена информацией. Подобные сервисы для хранения и передачи больших объемов данных активно развиваются, например AmazonS3.

Большую роль в данном процессе играет, конечно, разработка более быстрых методов математического анализа. В докладе д. ф.-м. н. Ивана Оселедца (Институт вычислительной математики РАН) был рассмотрен математический аппарат компактного представления многомерных массивов на основе тензорных поездов (tensor train, ТТ-формат). В медико-биологических приложениях многомерные задачи возникают постоянно, а ТТ-формат позволяет выявить основные переменные, достаточные для описания исследуемой системы или процесса.

Медицинские данные требуют обработки в реальном времени, чтобы можно было поставить предварительный диагноз максимум через несколько минут. Компанией «Прогресс» разрабатывается система удаленного мониторинга медицинских показателей с использованием мобильных устройств и сотовой сети передачи данных (Telehealth, доклад Олега Гашникова). Данный метод позволяет круглосуточно наблюдать за пациентом за пределами стационара, что в будущем должно сократить расходы на медицинское обслуживание. На данном этапе требуется разработка методик формирования паттернов тревог на основе накопленных данных и адаптация алгоритмов под конкретного пациента.

На первый взгляд в стороне от темы семинара прозвучал доклад о проблеме сбора и обработки данных геопозиционирования, которые накапливаются операторами сотовой связи, а также собираются агрегаторами типа Google, Facebook и AlterGeo с использованием современных приложений для смартфонов. Докладчик

Артем Вольфтруб (ведущий разработчик ООО «Грамант») сообщил, что с 2009 года появилась серия публикаций группы Alex Pentland и David Laser из Массачусетского технологического института, в которых обосновывается, что анализ геоданных может быть ничуть не менее информативен для прогноза социально значимых заболеваний, чем геном. В патогенезе мультигенного заболевания значительную роль играют факторы внешней среды, так называемый экспозом. Получить информацию об экспозоме с достаточной степенью детализации можно анализируя перемещения человека, сравнивая общие закономерности перемещений для популяций и выявляя паттерны, коррелирующие с рисками для здоровья, например с развитием сердечно-сосудистых заболеваний или ожирения [6].

В дискуссиях участников семинара в разных контекстах упоминался суперкомпьютер «Ватсон», созданный компанией ИВМ для ответа на вопросы (теоретически на любые!), сформулированные на естественном языке. Это один из первых примеров экспертных систем, функционирующих по принципу Big Data. В 2011 году было объявлено о применении этого суперкомпьютера для обработки слабоструктурированных массивов данных для решения задач медицины и здравоохранения [7].

Анализируя проблему больших данных в области биологии и медицины, следует отметить, что для этих наук еще со времен натурфилософии характерно накопление больших массивов информации, фиксирующей результаты наблюдений. В геномную эру накопление информации осуществляли, как казалось, с понятной целью. Однако, когда технический аспект был решен и геном расшифровали, оказалось, что собственно к вопросам сохранения

здоровья эти данные имеют слабое отношение [8].

В постгеномный период мировая биомедицинская наука вернулась на уровень феноменологического описания, которое направлено на сбор данных без однозначной перспективы их дальнейшей интерпретации. Таков проект «Протеом человека» – описательный атлас, где количественные данные собираются по каждому белку, однако неясно, как применять эти результаты к прикладным за-

дачам лабораторной диагностики. Аналогичен и проект «Коннектом», целью которого является накопление данных о передаче сигналов между нейронами в ожидании, что скопившись до какого-то критического уровня эти данные позволят симитировать в компьютере работу человеческого мозга.

Подводя итоги семинара, участники отметили, что феномен Big Data связан с открывшейся возможностью современной технологичной сферы генерировать и хранить

данные, при этом четкое понимание для чего собирать и хранить эти данные отсутствует. Российским ученым следует в первую очередь сосредоточиться на анализе Big Data, чтобы превратить массив данных в гипотезы, пригодные для проверки точечным биохимическим экспериментом. В качестве основного направления развития российского отделения DELSA следует наметить задачу ознакомления с данными проекта «Коннектом». ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hesla L. Particle physics tames big data // *Symmetry*. August 01, 2012. (<http://www.symmetrymagazine.org/article/august-2012/particle-physics-tames-big-data>)
2. Kolker E., Stewart E., Ozdemir V. // *OMICS*. 2012. V. 3. № 16. P. 138–147.
3. Lehne B., Schlitt T. // *Human Genomics*. 2009. № 3. P. 291–297.
4. Li-Pook-Tham J., Snyder M. // *Chemistry & Biology*. 2013. № 20. P. 660–666.
5. Tsoy O.V., Pyatnitskiy M.A., Kazanov M.D., Gelfand M.S. // *BMC Evolutionary Biology*. 2012. № 12. (doi: 10.1186/1471-2148-12-200)
6. Pentland A., Lazer D., Brewer D., Heibeck T. // *Studies in Health Technology and Informatics*. 2009. № 149. P. 93–102.
7. Wakeman N. IBM's Watson heads to medical school. *Washington Technology*. February 17, 2011. (<http://washingtontechnology.com/articles/2011/02/17/ibm-watson-next-steps.aspx>)
8. Bentley D.R. // *Nature*. 2004. V. 429. № 6990. P. 440–445.

УДК 577.213.6

Современные представления о структурно-функциональной организации системы репарации неканонических пар нуклеотидов в ДНК

С. А. Перевозчикова¹, Е. А. Романова¹, Т. С. Орецкая^{1,2}, П. Фридрихс³, Е. А. Кубарева^{1*}¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3³Институт биохимии, FB 08, Университет Ю. Либиха, D-35392 Гиссен, Германия, Heinrich-Buff-Ring, 58

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

Поступила в редакцию 21.05.2013

РЕФЕРАТ В обзоре приведены общие представления о репарации неканонических пар нуклеотидов («мисматчей») в ДНК (MMR). На сегодняшний день определены основные структурные и функциональные характеристики ключевых белков этой системы: MutS и MutL. Тем не менее взгляды на начальные этапы MMR с участием этих белков все еще противоречивы. Обобщены данные о взаимосвязи двух основных функций MutS – АТФ-азной и ДНК-связывающей, систематизированы модели координации между участком узнавания и участком гидролиза ДНК в системе MMR. Для проверки существующих моделей необходимо развитие методов фиксации короткоживущих комплексов, возникающих на различных этапах MMR.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА система репарации неканонических пар нуклеотидов в ДНК (MMR), MutS, MutL, MutH, структура белков, ДНК-белковые взаимодействия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HNPCC – наследственный неполипозный рак толстой кишки (синдром Линча); НТН – спираль-поворот-спираль; IDL – инсерционно-делеционная петля; IRC – «начальный» узнающий комплекс; m⁶A – N⁶-метил-2'-дезоксаденозин; MMR – система репарации неканонических пар нуклеотидов («мисматчей») в ДНК; PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток; SSB-белок – белок, связывающий одноцепочечную ДНК; URC – «окончательный» узнающий комплекс; а.о. – аминокислотный остаток; п.н. – пара нуклеотидов.

ВВЕДЕНИЕ

Геном является основным хранителем информации, необходимой для жизни любого организма. Воспроизведение генетического материала в неизменном виде при соматическом и генеративном делении клеток – важнейшее условие существования и поддержания жизнеспособности организмов. Одна нуклеотидная замена в единственном гене может привести к нарушениям развития и даже к летальному эффекту при возникновении в репродуктивных клетках [1] или к канцерогенезу при мутациях в соматических клетках [2]. В ходе репликации, несмотря на корректирующую активность ДНК-полимераз, возникают ошибки. По существующим оценкам при репликации бактериальной полимеразой ДНК длиной 10⁸–10¹⁰ нуклеотидов

возникает в среднем одна нуклеотидная замена [3]. Эукариотические ДНК-полимеразы не обладают 3' → 5'-экзонуклеазной активностью, что обуславливает большую частоту ошибок [4], поэтому очевидна необходимость существования систем репарации неправильно встроенных нуклеотидов, позволяющих предотвратить возникновение мутаций. В настоящее время можно выделить от пяти до девяти систем исправления повреждений, среди которых активно изучаются механизмы прямой репарации, эксцизионной, пострепликативной и SOS-репарации [5, 6]. В поддержании стабильности генома важную роль выполняет также система репарации неканонических пар нуклеотидов («мисматчей») в ДНК (MMR, от англ. mismatch repair).

Актуальность исследования проблем поддержания генетической стабильности подтверждает и большое количество экспериментальных и обзорных статей. Ежегодно в предпоследнем номере журнала *Science* обсуждается важнейшее достижение года. В 1994 году это были работы по репарации ДНК [7]. Первый номер журнала «Биохимия» за 2011 год [8] посвящен механизмам систем репарации повреждений в ДНК. В представленном обзоре рассмотрена система репарации неканонических пар нуклеотидов в ДНК. За последние полтора десятилетия репарации «мисматчей» посвящено значительное количество обзорных работ [9–17]. Нами рассмотрены экспериментальные данные, полученные в том числе за последние 5–6 лет, и сделана попытка систематизировать представления о механизмах функционирования системы MMR.

РОЛЬ СИСТЕМЫ MMR В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Неканоническими парами нуклеотидов, или «мисматчами», считаются все пары нуклеотидов, кроме G/C и A/T. К их появлению приводят ошибочное встраивание нуклеотидов ДНК-полимеразой при копировании матричной цепи, а также воздействие мутагенных факторов (в том числе свободных радикалов и ионизирующей радиации). Возможно встраивание модифицированных нуклеотидов ДНК-полимеразой или немодифицированного нуклеотида напротив поврежденного основания в матричной цепи [5, 18]. Другая распространенная ошибка системы репликации – короткие инсерционные и делеционные петли (IDL), которые возникают также при образовании дуплексов в ходе гомологической рекомбинации [19, 20]. Перечисленные повреждения узнаются и восстанавливаются системой репарации неканонических пар нуклеотидов (MMR), понижая тем самым вероятность возникновения мутаций в 50–1000 раз [21, 22]. Система MMR участвует в восстановлении ДНК после некоторых химических модификаций. Показана репарация следующих повреждений: O⁶-метилгуанозина [23, 24], 8-оксогуанозина [25, 26], аддуктов, образующихся при воздействии на ДНК канцерогенов [27], фотоиндуцированных продуктов [28–30] и продуктов реакции ДНК с производными цисплатина [31].

Роль системы MMR не ограничивается репарацией указанных повреждений ДНК. Белки этой системы принимают участие в регуляции клеточного цикла. В частности, в фазе G₂ сигнал о повреждении ДНК, передаваемый белком MutS, запускает каскад процессов, вызывающих запрограммированную гибель клеток (апоптоз) [15, 32, 33]. Нарушение этой функции приводит к повышенной выживаемости клеток, лежащей в основе канцерогенеза, а также к их устой-

чивости к химиотерапии [13, 25]. Аналогично этому дефекты системы репарации «мисматчей» у прокариот приводят к повышению скорости мутагенеза и к межвидовой передаче генов, что может обеспечить приспособляемость бактерий к условиям стресса и действию антибиотиков [34].

Система MMR важна для поддержания длины микросателлитных повторов, т.е. коротких повторяющихся ДНК [13, 35, 36]. Репликация повторяющихся участков часто приводит к ошибкам из-за «соскальзывания» полимеразы на аналогичную последовательность. Так как основное бремя репарации этих повреждений лежит именно на системе MMR, нестабильность микросателлитов используется в качестве биомаркера нарушения функции белков этой системы репарации. При дисфункции системы MMR возникают различные перестройки ДНК и независимое от теломеразы удлинение теломер [37, 38].

Белки системы MMR важны для предотвращения рекомбинации между сходными, но не идентичными последовательностями ДНК, а также для спаривания хромосом в мейозе и сегрегации хромосом [39]. В соматических клетках MMR участвует в гипермутировании при формировании репертуара иммуноглобулинов в В-лимфоцитах [40, 41]. Большое разнообразие биологических функций системы репарации «мисматчей» вызывает интерес к деталям ее функционирования.

Система репарации «мисматчей» обнаружена во всех царствах живых организмов, она характеризуется высокой консервативностью ключевых белков – MutS и MutL, от бактерий до высших эукариот [42]. Учитывая структурное сходство белков, предполагается, что и основы механизма репарации «мисматчей» сходны у всех организмов. Дефекты белков системы MMR у человека приводят к возникновению опухолей, в том числе и злокачественных. Наиболее распространен среди них синдром Линча, или непוליпозный рак толстой кишки (HNPCC – hereditary nonpolyposis colon cancer), смертность от которого занимает третье место среди онкологических заболеваний [43–46]. В 85% случаев наследственного непוליпозного рака толстой кишки [44] и 15–25% спорадических опухолей различных тканей [47] находят мутации в генах белков системы MMR. Выявление нарушений в системе MMR играет важную роль при диагностике опухолей [48]. Существование связи между онкологическими заболеваниями человека и MMR определяет актуальность изучения системы репарации «мисматчей» в ДНК.

Процесс репарации MMR был воспроизведен *in vitro* с использованием очищенных компонентов еще в 1989 году [49], и на сегодняшний день уже сформировано общее представление о функционировании

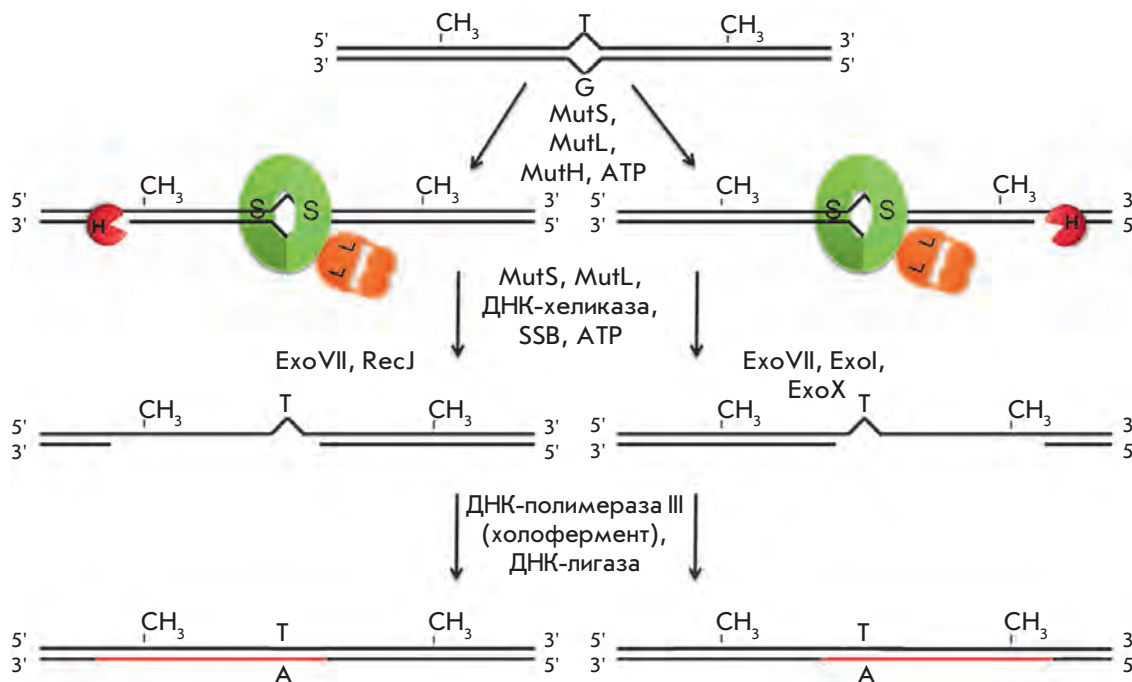


Рис. 1. Схема процесса репарации «мисматчей» в ДНК у *E. coli*

системы MMR. Однако для создания адекватной модели MMR необходимо решить много вопросов. Ниже будут рассмотрены основные взгляды на механизм функционирования MMR.

ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О МЕХАНИЗМЕ И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СОБЫТИЙ В ПРОЦЕССЕ MMR

Ключевыми белками системы MMR являются MutS и MutL. Гены этих белков первоначально обнаружили в бактериях *Streptococcus pneumoniae* (гены *hexA* и *hexB*) [50]. Немного позднее гомологичные гены обнаружили в *Escherichia coli* (ген *mutS*, гомолог *hexA*, и ген *mutL*, гомолог *hexB*, а также *mutH* и *mutU*) [51]. Белки системы MMR были названы Mut (сокращенное от *mutagenic*), так как нарушение их функции приводит к гипермутабильности микроорганизмов. Гены белков, гомологичных MutS и MutL, обнаружены в большинстве геномов с известной нуклеотидной последовательностью. Названия гомологов MutS и MutL образуются с использованием сокращений MSH (от *MutS homolog*) и MLH (от *MutL homolog*) соответственно.

Система MMR является поликомпонентной. Ее функционирование обусловлено координированным действием более 10 белков [52]. В табл. 1 приведены ключевые белки системы MMR *E. coli* и человека и сравнение их функций.

Общая схема репарации «мисматчей» у *E. coli* представлена на рис. 1. Белок MutS действует

как сенсор, сканирующий ДНК в поисках неканонических пар нуклеотидов: G/T, C/T, A/C, A/G, G/G, A/A, T/T (всех, кроме C/C) и небольших инсерционно-делеционных петель (IDL) [14]. За последние годы показано, что MutS также стимулирует ответ клеток млекопитающих на повреждающие агенты, такие, как цисплатин, ионизирующая радиация, антимаболиты, ультрафиолетовое излучение, интеркалирующие и алкилирующие агенты [24–31, 53, 54]. MutS образует с «мисматчем» специфические контакты в так называемом «начальном» узнающем комплексе (англ. *initial recognition complex, IRC*), характеризующемся изгибом ДНК на 60° [13, 55]. Затем белок MutS взаимодействует с MutL, образуя тройной комплекс, которому приписывают способность координировать дальнейшие процессы вплоть до различения материнской и дочерней (т.е. содержащей ошибку) цепей ДНК. MutS и MutL – это АТФ-азы: для их функционирования требуется присутствие АДФ и АТФ [13, 14].

Важную роль в различении материнской и дочерней цепей ДНК у энтеробактерий играет отсутствие метилирования во вновь синтезированной цепи. Поэтому систему репарации «мисматчей» у таких бактерий называют направленной метилированием системой репарации «мисматчей» (*methyl-directed repair system*). Эта зависимость была открыта Мезелсоном и соавт. [56, 57], которые исследовали репарацию бактериофага λ, несущего один или несколько «мисматчей», при трансфекции его в штаммы *E. coli*. Оказалось,

Таблица 1. Ключевые белки системы репарации «мисматчей» *E. coli* и человека

<i>E. coli</i>	Функция	Гомолог в клетках человека	Функция
MutS (гомодимер)	Узнавание «мисматчей»	MSH2–MSH6 (MutS α)	Репарация «мисматчей» и инсерционно-делеционных петель из 1–2 нуклеотидов
		MSH2–MSH3 (MutS β)	Репарация инсерционно-делеционных петель из двух и более нуклеотидов
		MSH4–MSH5	Участие в мейотической рекомбинации и в порядке переключения синтеза иммуноглобулинов
MutL (гомодимер)	Координирование процессов MMR после узнавания «мисматча» и до репарационного биосинтеза ДНК	MLH1–PMS2 (MutL α)	Как у MutL из <i>E. coli</i>
		MLH1–PMS1 (MutL β)	В дрожжевых гомологах подавление инсерционно-делеционного мутагенеза; функция человеческого гомолога в MMR неясна
		MLH1–MLH3 (MutL γ)	Подавление инсерционно-делеционного мутагенеза, участие в мейотической рекомбинации
MutH	Узнавание последовательности 5'-Gm ⁶ ATC-3'/3'-СТАG \downarrow -5' и гидролиз дочерней, неметилованной цепи ДНК	Не обнаружено	

что репарация близко расположенных «мисматчей» происходит в одной и той же цепи ДНК [56]. При выборе цепи ДНК для внесения разрыва и последующей эксцизионной репарации важно участие белка MutH, ДНК-никазы, узнающей монометилованную последовательность 5'-Gm⁶ATC-3'/3'-СТАG \downarrow -5' (где m⁶A – N⁶-метил-2'-дезоксаденозин; стрелкой указано место гидролиза). Возникновение участков узнавания MutH связано с действием клеточной Dam-метилтрансферазы. Перед началом репликации ДНК остатки аденозина обеих цепей всех последовательностей 5'-GATC-3' в клетке метилированы. Однако в течение некоторого времени после репликации клетка содержит пул ДНК, метилированных только по одной из двух цепей [58]. MutH катализирует одноцепочечный разрыв в неметилованной, т.е. вновь синтезированной цепи ДНК [16, 59]. Полностью метилированная ДНК в клетках *E. coli* не репарируется [60], а при отсутствии метилирования (штаммы *dam*⁻) различить материнскую и дочернюю цепи невозможно, что может привести к возникновению двухцепочечных разрывов ДНК. Поэтому в штаммах *E. coli*, имеющих как недостаточно, так и избыточно активную метилтрансферазу Dam, повышена частота мутаций [61, 62]. Каталитическая функция MutH стимулируется тройным комплексом, состоящим из белков MutS и MutL и ДНК с «мисматчем». Обычно активируется MutH, связанная со своим участком узнавания и расположенная наиболее близко к неканонической паре нуклеотидов с любой стороны ДНК относительно «мисматча». Расстояние от «мисматча» до места гидролиза может достигать 2000 п.н. [14, 63].

В клетках большинства организмов репарация «мисматчей» осуществляется независимо от метилирования ДНК. Вопрос о том, каким образом система репарации выявляет дочернюю, т.е. содержащую ошибку цепь, остается открытым. Введение разрыва в ДНК в таких организмах приписывают гомологам MutL, у которых обнаружен эндонуклеазный мотив [64], тем не менее экспериментально этот факт не подтвержден. Другое предположение состоит в том, что сигналами вновь синтезированной цепи ДНК могут быть одноцепочечные разрывы, образующиеся в процессе репликации ДНК: с 3'-конца лидирующей цепи и как с 3'-, так и с 5'- концев отстающей цепи [65].

Одноцепочечный разрыв служит сигналом для эксцизионной репарации, при которой удаляется фрагмент цепи ДНК, содержащей «мисматч». К ДНК в месте разрыва присоединяется ДНК-хеликаза UvrD, которая расплетает ДНК до неканонической пары нуклеотидов. Показано, что действие ДНК-хеликазы стимулируется тройным комплексом MutS–MutL–ДНК, и ДНК расплетается в направлении «мисматча» [66–68]. Последнее косвенно указывает на способность тройного комплекса координировать узнавание «мисматча» и последующую эксцизионную репарацию. Высвобожденную одноцепочечную ДНК гидролизует определенный набор экзонуклеаз в зависимости от того, 5'- или 3'-конец доступен [69, 70]. С материнской цепью ДНК при этом связываются субъединицы белка, проявляющего сродство к одноцепочечным участкам – SSB (от англ. single-strand binding protein), покрывая всю ее поверхность и предотвращая деградацию [71, 72]. Образовавшуюся

юся брешь застраивает ДНК-полимераза III (холофермент). ДНК-лигаза восстанавливает целостность исправленной цепи.

MutS КАК КЛЮЧЕВОЙ БЕЛОК СИСТЕМЫ MMR

На сегодняшний день накоплено много структурной и биохимической информации о белке MutS и его гомологах. Белок MutS из *E. coli* представляет собой полипептид с молекулярной массой 95 кДа. Четвертичная структура MutS в растворе представлена равновесной смесью димеров и тетрамеров [73], образованных равнозначными по первичной структуре субъединицами. У большинства других видов димеризуются две различные субъединицы. У человека найдено шесть гомологов MutS (MSH1–MSH6). Гетеродимеры, названные MutS α (MSH2–MSH6) и MutS β (MSH2–MSH3), совместно выполняют функции бактериального белка MutS, обеспечивая точность митотической репликации (табл. 1). MSH1 поддерживает генетическую стабильность в митохондриях эукариот [20]. Гетеродимер MSH4–MSH5 вовлечен в узнавание структур Холлидея при мейозе [74–76] и не участвует в репарации ошибок репликации. С помощью биоинформатического анализа построено филогенетическое дерево, отражающее функциональную специализацию гомологов MutS [77] (рис. 2).

Структура белка MutS *E. coli* и функции его отдельных доменов

Важнейшей вехой в исследовании белка MutS стало выяснение его кристаллической структуры. В 2000 году были расшифрованы кристаллические структуры комплексов MutS из *E. coli* [55] и *Thermus aquaticus* [78] с ДНК, содержащей неканоническую пару G/T. Позднее были получены кристаллы белков MutS и их мутантных форм в комплексах с ДНК, содержащими различные «мисматчи» [79–83]. Из эукариотических гомологов MutS определены структуры MSH α и MSH β человека. На сегодняшний день решена структура более 20 комплексов MutS с ДНК [55, 78, 79, 81–86], информация о них доступна в электронной базе данных трехмерных структур белков (PDB) (табл. 2).

Следует отметить однотипность всех структур комплексов MutS с ДНК, полученных методом рентгеноструктурного анализа (РСА). Они представляют собой «начальный» узнающий комплекс (IRC) MutS с ДНК, содержащей «мисматч». Белок MutS образует в этих структурах специфические контакты с неканонической парой нуклеотидов и связан с кофактором ADP. Единственная структура MutS в комплексе с ДНК, содержащей G/T-«мисматч», и двумя молекулами АТФ (код PDB 1W7A) получена пропитыванием кристаллов раствором АТФ. При этом молекулы

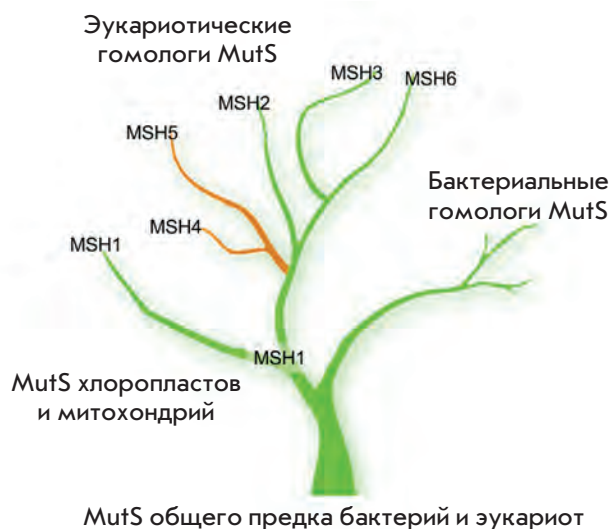


Рис. 2. Филогенетическое дерево белков семейства MutS. Зеленые ветви обозначают группы гомологов MutS, участвующие в поддержании стабильности генетического материала при вегетативном делении клеток, коричневые – при мейотической рекомбинации ДНК

оставались жестко зафиксированными в кристаллической решетке, что препятствовало значительным конформационным перестройкам комплекса [85]. Информацию о структуре белка на этапе сканирования ДНК в поисках «мисматча» или на этапе передачи сигнала другим компонентам системы репарации MMR получить не удастся из-за высокой динамичности комплексов MutS с ДНК на этих этапах.

Первичная структура MutS высококонсервативна у всех живых организмов. Как вторичная, так и третичная структура этого белка у разных организмов имеет значительное сходство. В комплексе с ДНК белок представляет собой димер продолговатой формы с двумя каналами (длиной около 100 Å). Своими очертаниями он напоминает греческую букву θ [87] (рис. 3А,Б). В то время как дуплекс с «мисматчем» располагается в большем из каналов, функция второго канала остается неизвестной, но его размеры и заряд позволяют сделать вывод, что он способен контактировать с ДНК [82].

Методом РСА установлена структура белка с высоким разрешением (до 2 Å). В белке, свободном от ДНК (PDB-код 1EWR), не удалось охарактеризовать структуры четырех областей (остатки 2–13, 57–66, 95–107 и 659–668), что указывает на конформационную подвижность белка в отсутствие ДНК. В комплексах MutS с ДНК, содержащей «мисматч», положение всех аминокислот, за исключением петли, образованной остатками 659–668, хорошо определяется [55].

Таблица 2. Кристаллические структуры белка MutS

Организм	ДНК ¹	АТФ или АДФ	Разреш., Å	Код PDB	Ссылка	Замена а.о.
<i>E. coli</i> ²	G/T	АДФ	2.20	1E3M	[55]	—
	«	«	2.10	1WB9	[84]	E38T
	«	«	2.50	1WBB	[84]	E38A
	«	«	2.40	1WBD	[84]	E38Q
	«	«	2.20	3K0S	[83]	D693N
	«	АДФ (2 молекулы)	2.60	1NG9	[79]	R697A
	«	АТФ (2 молекулы)	2.27	1W7A	[85]	—
	A/A	АДФ	2.40	1OH6	[81]	—
	A/A	«	3.40	2WTU	[83]	—
	G/G	«	2.50	1OH7	[81]	—
	C/A	«	2.90	1OH5	[81]	—
доп. Т	«	2.90	1OH8	[81]	—	
<i>Thermus aquaticus</i> ³	—	—	3.19	1EWR	[78]	—
	доп. Т	—	2.20	1EWQ	[78]	—
	доп. Т	АДФ (2 молекулы)	2.70	1FW6	[79]	—
	доп. Т	АДФ (2 молекулы)-BeF ₃	3.11	1NNE	[82]	—
Человек (MSH α)	G/T	АДФ	3.30	2O8E	[86]	—
	G/T	АДФ (2 молекулы)	2.75	2O8B	«	—
	G/dU	АДФ	3.00	2O8D	«	—
	m ⁶ G/T ⁴	«	3.37	2O8C	«	—
	доп. Т	«	3.25	2O8F	«	—
Человек (MSH β)	петля 4 н.о. ⁵	АДФ	3.09	3THW	—	—
	петля 3 н.о.	«	2.70	3THX	—	—
	петля 2 н.о.	«	2.89	3THY	—	—
	петля 6 н.о.	«	4.30	3THZ	—	—

¹Указана неканоническая пара нуклеотидов в ДНК-дуплексе, использованном для кристаллизации.

²В случае MutS *E. coli* использовались делеционные мутанты, содержащие 1–800 а.о.

³В случае MutS *T. aquaticus* использовались делеционные мутанты, содержащие 1–782 а.о.

⁴m⁶G – Об-метил-2'-дезоксигуанозин.

⁵н.о. – нуклеотидный остаток.

Каждый мономер MutS образует семь структурных доменов (рис. 3Б). N-Концевой домен является «мисматч»-связывающим (а.о. 2–115). Этот домен сформирован смешанным β -слоем, состоящим из пяти тяжей и окружающих его трех α -спиралей. Следующий за ним соединяющий домен (а.о. 116–266) в основном состоит из параллельных β -тяжей, которые окружены четырьмя α -спиральями. Коровый домен (а.о. 267–443 и 540–567) представляет собой два пучка α -спиралей. Рычажный домен (а.о. 504–567) состоит из двух α -спиралей, выступающих из корового домена и окружающих ДНК, но не соприкасающихся с ней. Важная черта структур и прокариотического, и эукариотического гомологов MutS – длинная α -спираль из 60 а.о., которая соединяет коровый домен с доменом «зажим». Скорее всего, эта спираль принимает участие в передаче сигнала между АТФ-

азным и ДНК-связывающим доменами [86]. Домен «зажим» (а.о. 444–503) является вставкой в верхнюю часть рычажного домена. Он сформирован четырьмя антипараллельными β -тяжами. АТФ-связывающий домен (АТФ-азный, а.о. 568–765) и домен НТН (от англ. НТН helix-turn-helix, спираль-поворот-спираль, а.о. 766–800) находятся в С-концевой части белка.

В структуре комплекса MutS с ДНК, содержащей «мисматч» (с гетеродуплексом), белок представляет собой асимметрично организованный гомодимер. Субъединица, образующая специфические контакты с «мисматчем», далее называется субъединицей 1 (на рис. 3 ее домены обозначены разными цветами). Вторая субъединица, образующая контакты только с углеводофосфатным остовом ДНК, далее называется субъединицей 2 (на рис. 3 обозначена зеленым цветом). Белок окружает ДНК в месте «мисматча»,

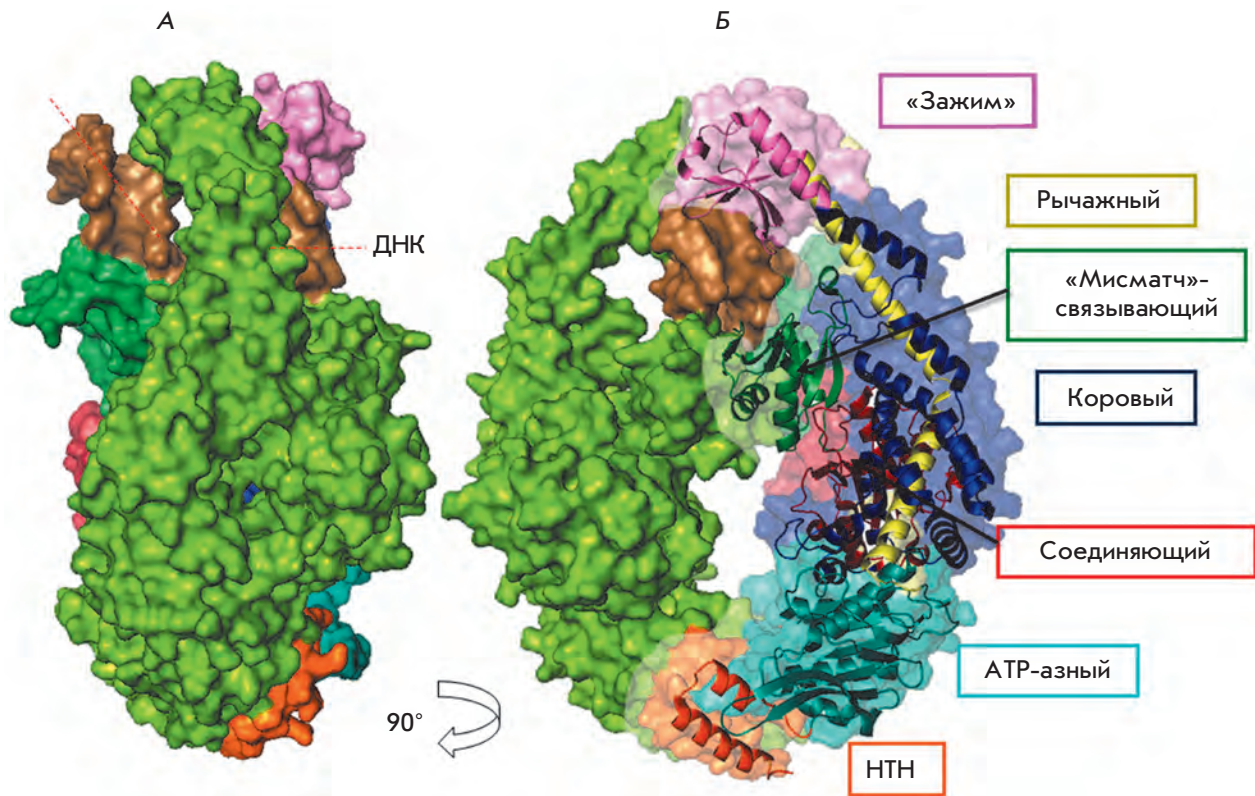


Рис. 3. Общая структура комплекса белка MutS из *E. coli* с ДНК, содержащей G/T-«мисматч». Представлены вид сбоку (А) и фронтальный вид (Б). ДНК окрашена коричневым, субъединица 2 MutS выделена зеленым цветом. На изображении Б указаны домены ДНК-связывающей субъединицы 1: «мисматч»-связывающий домен (а.о. 2–115) окрашен темно-зеленым цветом, соединяющий домен (а.о. 116–266) – красным, коровый домен (а.о. 267–443) – синим, рычажный домен (а.о. 504–567) – желтым, домен «зажим» (а.о. 444–503) – розовым, АТР-азный домен (а.о. 568–765) – голубым, домен НТН (а.о. 766–800) – оранжевым. Красной пунктирной линией указан изгиб ДНК (PDB-код 1E3M)

закрывая при этом область из 24–28 п.н. [88]. MutS охватывает ДНК в виде «зажима». Для связывания белком ДНК «зажим» должен «раскрыться». Полагают, что раскрытию «зажима» способствует гибкая, содержащая большой процент петель, структура верхней части этого домена [89]. Гибкость ДНК-связывающих доменов подтверждается тем, что в кристаллах MutS, не связанного с ДНК, они не структурированы [78].

В специфическом комплексе с MutS ДНК изогнута на 60° [78, 79] (рис. 3). В вершине угла находятся основания неканонической пары нуклеотидов. Изгиб приводит к расширению малой бороздки ДНК, так что ее ширина примерно совпадает с шириной большой бороздки. В специфическом комплексе аминокислотные остатки из обеих субъединиц MutS взаимодействуют с ДНК, однако связывание асимметрично – каждая субъединица образует множество контактов, но они различны. Общая площадь

поверхности ДНК-белковых контактов составляет ~1850 Å² [81]. Большинство контактов белка с ДНК являются гидрофильными (аминокислотные остатки взаимодействуют с углеводородным остовом ДНК) и не зависят от нуклеотидной последовательности. Благодаря этому MutS способен функционировать в различных нуклеотидных контекстах. Только аминокислоты из субъединицы 1 (мотив Phe-X-Glu) образуют специфические контакты с «мисматчем» [86]. Среди эукариотических гомологов этот мотив присутствует в MSH6, но отсутствует в MSH2 и MSH3. Еще до получения результатов PCA было установлено, что в связывании MutS с ДНК важную роль играет Phe36 (нумерация для MutS из *E. coli*). Замена Phe36 на Ala нарушает способность MutS к специфическому взаимодействию с ДНК [90]. Возможно, Phe36 важен при поиске «мисматча». Согласно данным PCA, фенилаланин из мотива Phe-X-Glu вовлечен в межплоскостные взаимодействия

(«стэкинг») с одним из гетероциклических оснований «мисматча» со стороны малой бороздки ДНК [55, 78]. В специфическом связывании MutS с «мисматчем» в ДНК важную роль играет также Glu38 (нумерация для MutS из *E. coli*), который контактирует с тем же гетероциклическим основанием, что и Phe36. В результате такого взаимодействия формируется водородная связь между карбонильным кислородом Glu38 и атомом азота основания. В структурах MutS с дуплексом, содержащим неканоническую пару G/T или неспаренный нуклеотид T, Glu38 образует водородную связь с N3-атомом T. При взаимодействии MutS с дуплексами, содержащими пары C/A и A/A, Glu38 образует водородную связь с N7-атомом пурина; аналогичный контакт формируется и с неканонической парой G/G [81]. Специфические контакты определяют направление изгиба ДНК. Показано, что замена консервативного остатка Glu38 на глутамин полностью нарушает способность белка различать канонический и «мисматч»-содержащий дуплексы [91].

К сожалению, на сегодняшний день мало известно о структуре неспецифического комплекса MutS с канонической ДНК (гомодуплексом), так как не удалось получить кристаллы MutS с таким фрагментом ДНК. Сиксма и соавт. [89] предполагают, что белок ищет «мисматч» по механизму связывания-высвобождения, пытаясь встроить Phe36 в «стопку» оснований на каждом этапе, и в результате изогнуть ДНК. «Мисматч» обычно не искажает структуру ДНК-дуплекса [92, 93], но дестабилизирует его [94]. Натраджан и соавт. [81] полагают, что MutS способен обнаруживать эти локальные ослабления структуры ДНК. С использованием атомной силовой микроскопии показано, что ДНК канонического состава в комплексе с MutS может находиться в одной из двух конформаций: изогнутой или выпрямленной [95]. Считается, что в поисках «мисматча» MutS постоянно изгибает и выпрямляет ДНК. Обнаружение «мисматча» приводит к АТФ-зависимым перестройкам доменов MutS и образованию активированного ДНК-белкового комплекса.

Белок MutS относится к АВС-семейству АТФ-аз (от англ. ATP binding cassette). Белки этого класса, такие, как мембранные трансферазы, связывают субстрат и для регуляции своей активности гидролизуют АТФ. У некоторых членов этого семейства наблюдается димеризация АТФ-азных доменов [96, 97]. У белка MutS площадь димеризации в районе АТФ-азных доменов значительна и составляет 2922 Å² [85]. Характерной чертой белков АВС-семейства АТФ-аз является консервативная петля, выступающая из одной субъединицы и дополняющая активный центр АТФ-азного домена в другой субъединице. Связывание

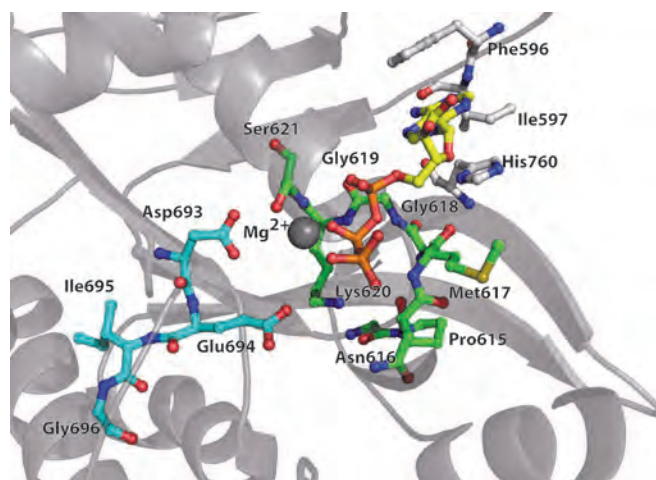


Рис. 4. АТФ-азный домен белка MutS. Аминокислотные остатки, образующие контакты с АДФ, выделены светло-серым цветом, аминокислоты мотива Уолкера из субъединицы 1 обозначены зеленым, из субъединицы 2 – голубым, молекула АДФ отмечена желто-оранжевым цветом, Mg²⁺ – серым

АТФ или АДФ происходит классическим для АТФ-аз способом через Р-петлю (от англ. phosphate-binding). Положение аденинового основания фиксируется с двух сторон остатками His760 и Phe596 (в MutS из *E. coli*, рис. 4). Консервативный Ile597 образует с нуклеотидом две водородные связи. Ser621 координирует образование комплекса иона Mg²⁺ и β-фосфата АДФ с участием четырех молекул воды [55]. Мотив Уолкера (англ. Walker motif, D-E-X-X, где X – любая аминокислота) в MutS из *E. coli*, образованный а.о. 693–696, стабилизирует молекулы воды, связанные с Mg²⁺ [55]. Замены этих аминокислотных остатков приводят к потере АТФ-азной активности белком MutS и инактивации системы репарации [85].

Данные, полученные биохимическими методами, свидетельствуют о значительных конформационных перестройках АТФ-азных доменов при связывании АТФ или его негидролизующих аналогов [98–100]. Однако в кристалле комплекса MutS с ДНК, в котором MutS связан с двумя молекулами АТФ, лишь некоторые аминокислотные остатки (Ser668, Asn616 и His728) меняют свое положение по сравнению с комплексом в присутствии АДФ [85]. Согласно биохимическим данным сродство двух АТФ-азных доменов друг к другу выше при связывании АТФ и ниже в присутствии АДФ. Общая структура белка MutS наиболее компактна при связывании двух молекул АТФ, тогда как наиболее релаксированная форма наблюдается в присутствии АДФ. Свободный от АТФ и АДФ белок имеет промежуточную конформацию

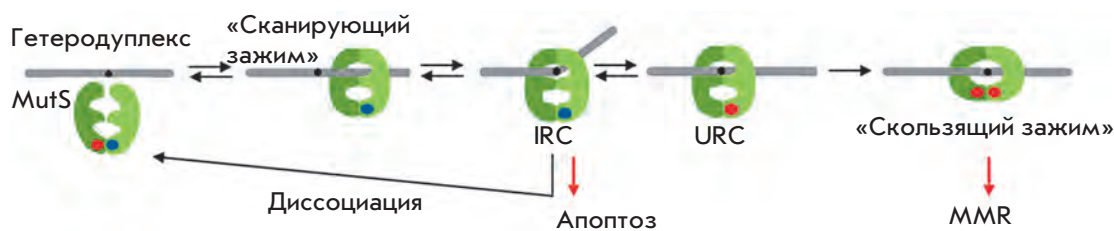


Рис. 5. Динамическая модель узнавания «мисматча» белком MutS. Гетеродуплекс – ДНК-дуплекс с неканонической парой

[101]. Косвенные наблюдения также свидетельствуют о модулировании конформации белка нуклеотидами. Например, распределение продуктов частичного протеолиза MutS из *E. coli* в присутствии ADP, ATP и ATP γ S отличалось от распределения в отсутствие нуклеотидов [98, 99].

Кроме того, в MutS обнаружена характерная для ABC-семейства ATP-аз неравнозначность двух доменов белка при связывании ADP [55, 85]. ADP более эффективно связывается в субъединице 1, образующей специфические контакты с «мисматчем». Асимметричность доменов наблюдается даже в отсутствие ДНК [83, 102].

Структурные и биохимические данные свидетельствуют о том, что конформационные изменения в ATP-азном домене стимулируют перестройки в ДНК-связывающих доменах и наоборот. Передача сигнала на расстояние ~ 60 Å и его усиление происходит через α -спирали, соединяющие два функциональных домена белка и высококонсервативную подвижную петлю ATP-азных доменов (рис. 4). Считается, что Glu38, Glu694, Asp693, Asn616, His728 и Ser668 являются основными аминокислотами, участвующими в передаче сигнала между ДНК-связывающими и ATP-азными доменами [84]. Замена этих аминокислотных остатков приводят к утрате связи между ДНК-связывающей и ATP-азной активностями MutS, в результате чего белок теряет свою функцию в MMR.

Полноразмерный белок MutS образует в растворе тетрамеры и олигомеры более высокого порядка. Тетрамеризация MutS важна для подавления гомологичной рекомбинации и репарации аддуктов цисплатина с ДНК [103]. Следует отметить, что тетрамер MutS является не просто димером димеров, так как способен связывать только один гетеродуплекс [73]. Все кристаллические структуры, где MutS является димером, получены с использованием укороченной формы белка, лишенной C-концевых аминокислот (53 а.о. в MutS из *E. coli*).

Этапы действия MutS в процессе MMR

В функционировании MutS можно выделить несколько этапов (рис. 5). Белок неспецифически свя-

зывается с ДНК и изгибает ее в поисках «мисматча». Перемещение MutS по ДНК на этом этапе происходит в ходе линейной диффузии [104]. При специфическом связывании с неканонической парой нуклеотидов в белке и в ДНК происходят конформационные перестройки с формированием «начального» узнающего комплекса, IRC [13]. В этом комплексе ДНК изогнута на 60° [55]. На сегодняшний день кристаллическая структура комплексов с ДНК только этого типа выяснена методом РСА. Предполагается, что следом за IRC происходит формирование «окончательного» узнающего комплекса, URC (англ. ultimate recognition complex), в котором ДНК выпрямлена, и неканоническая пара нуклеотидов расположена вне двойной спирали. Это предположение основано на аналогии с другими белками, такими, как ДНК-метилтрансферазы, транспозаза Tn10 и др., которые, так же как и MutS, «вклинивают» узнающие аминокислоты в ДНК со стороны малой бороздки [105, 106]. Затем связанный с ATP белок переходит в активную конформацию «скользящего зажима», способного активировать последующие этапы репарации неканонических пар нуклеотидов.

Роль ATP-азного цикла MutS

Связывание ADP или ATP в двух субъединицах MutS необходимо для перехода из одного конформационного состояния в другое и позволяет белку действовать как молекулярный переключатель [104, 107, 108].

Два нуклеотидсвязывающих центра MutS выполняют разные функции в MMR [79], что находится в соответствии со структурной асимметрией, обнаруженной методом РСА [55, 78]. Обе субъединицы могут одновременно связывать адениновые нуклеотиды, при этом тип нуклеотида (ATP или ADP) не важен [109]. Константы диссоциации комплексов MutS с ATP или ADP находятся в диапазоне 1–20 мкМ. Такое сродство позволяет сделать вывод, что состояние MutS, при котором один или оба нуклеотидсвязывающих участка свободны от нуклеотидов, существует только временно. Показано, что MutS проявляет различное сродство к ATP, ADP и к негидролизуемым аналогам ATP. Тем не менее единства взглядов на эффективность взаи-

модействия этих нуклеотидов с MutS нет. Например, даже при высокой концентрации ADP (100 мкМ) с гомологами MutS из *E. coli*, дрожжей и человека связывался только один эквивалент нуклеотида на димер белка [73, 109, 110]. С другой стороны, отношение связанных нуклеотидов ADP к ATP в MutS α в отсутствие ДНК составляет 1.6. Таким образом, белок связывает нуклеотиды в различных комбинациях – ATP/ADP или ADP/ADP, где вторая комбинация возникает в результате гидролиза молекулы ATP из первой комбинации [13]. На сегодняшний день надежно установлено, что MSH6 (и соответствующая ему субъединица 1 бактериального MutS) связывает ATP с более высокой эффективностью, чем MSH2 (субъединица 2 бактериального MutS) [111, 112]. ATP-азную активность всех гомологов MutS стимулирует присутствие ДНК (как канонической, так и неканонической) [113]. Однако данные о влиянии неканонической пары нуклеотидов в составе ДНК на ATP-азную активность MutS противоречивы. В некоторых работах описывается ускорение (до 4 раз) гидролиза ATP в присутствии ДНК с «мисматчем» по сравнению с гомодуплексом [107]. В другом исследовании [114] ДНК, содержащая «мисматч», стимулировала ATP-азную активность MutS в меньшей степени, чем ДНК канонического строения. Как гомо-, так и гетеродуплексы ускоряют обмен нуклеотидов в ATP-азных доменах [113], однако только в случае гетеродуплекса этапом, лимитирующим скорость, становится не обмен нуклеотидов (происходящий после гидролиза), а сам цикл гидролиза ATP [107].

Координацию процессов связывания ДНК и гидролиза ATP в ATP-азных доменах обеих субъединиц MutS можно описать двумя схемами. Согласно схеме 1 [83] при сканировании ДНК белком MutS в поисках «мисматча» ATP-азный домен субъединицы 1 содержит одну молекулу ADP. Если ДНК является субстратом системы репарации неканонических пар нуклеотидов, например, содержит G/T-пару, MutS образует специфический комплекс. При этом в ATP-азных доменах ADP заменяется на ATP. ATP-азный домен второй субъединицы также связывает ATP, затем в молекуле MutS происходят конформационные изменения, приводящие к образованию структуры «скользящий зажим». «Скользящий зажим» служит сигналом для привлечения белка MutL, который активирует дальнейшие этапы репарации. После этого происходит диссоциация MutS из комплекса с ДНК и гидролиз ATP. Белок MutS после завершения цикла сохраняет связанную молекулу ADP в одном из ATP-азных доменов и готов к новому акту взаимодействия с ДНК.

Схема 2 [115] предполагает иной подход к пониманию нуклеотидсвязывающей и ATP-азной функций

MutS. Эта схема основана на данных РСА, дополненных расчетами с использованием метода «нормальных режимов» (normal mode). Согласно построенной модели субъединица 1 в процессе сканирования ДНК связывает и сразу же гидролизует ATP. Высвобождение ADP является стадией, лимитирующей скорость ATP-азного цикла. В субъединице 2 в это время находится только ADP. После образования специфического комплекса с «мисматчем» обе субъединицы теряют сродство к ADP, связывают и удерживают ATP. Только после перехода MutS из структуры «скользящий зажим» снова в режим сканирования ДНК происходит гидролиз ATP в обеих субъединицах.

На наш взгляд, схемы 1 и 2 имеют существенные различия:

1. По схеме 1 в субъединице 2 в процессе сканирования ДНК отсутствуют ATP и ADP, тогда как в схеме 2 субъединица 2 обладает на этом этапе повышенным сродством к ADP.

2. Согласно схеме 1 MutS в ходе сканирования ДНК в поисках «мисматча» не гидролизует ATP, гидролиз происходит только на этапе высвобождения MutS из комплекса с ДНК, тогда как по схеме 2 гидролиз ATP происходит и на этапе сканирования ДНК, и после образования специфического комплекса.

Следует заключить, что не существует ясного представления о функционировании ATP-азных доменов MutS и о координации их функции с различными стадиями функционирования белка MutS, и дискуссия об этом продолжается.

БЕЛОК MutL – МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КООРДИНАТОР MMR

Одна из уникальных особенностей процесса репарации «мисматчей» – удаленность «мисматча» от участка гидролиза дочерней цепи ДНК вплоть до 2000 п.н. Поэтому имеет место четкая координация во времени и пространстве всех белков, вовлеченных в MMR. Центральную роль в координации различных этапов MMR приписывают белку MutL. MutL получает сигнал об обнаружении «мисматча» и направляет эксцизионную репарацию в дочерней цепи ДНК и репаративный синтез ДНК. Выполняя функцию координатора процессов репарации «мисматчей», MutL взаимодействует с MutS и с большинством белков, принимающих участие в последующих этапах репарации: MutH, UvrD-хеликазой, полимеразой III и факторами процессивности полимеразы – β -зажимом (у прокариот) и ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA, у эукариот), экзонуклеазой ExoI (у прокариот) и полимеразой Pol η (у эукариот) [116]. Роль MutL и его эукариотических гомологов не ограничивается репарацией «мисматчей» ДНК. Показано, что MutL взаимодействует с белка-

Таблица 3. Кристаллические структуры белка MutL

Организм	Фрагмент белка	Кофакторы и их аналоги	Разрешение, Å	Код PDB	Ссылка
<i>E. coli</i>	N-Концевой участок – фрагмент АТФ-азного домена (LN40)	-	2.90	1BKN	[122]
	«	ADP, Mg ²⁺	2.10	1B62	[121]
	«	ADPnP ¹ , Mg ²⁺	1.90	1B63	[121]
	«	ADPnP, Mg ²⁺ , Rb ⁺	2.40	1NHH	[123]
	«	ADPnP, Mg ²⁺ , K ⁺	2.00	1NHI	[123]
	«	ADPnP, Mg ²⁺ , Na ⁺	2.30	1NHJ	[123]
<i>Bacillus subtilis</i>	C-Концевой домен	Na ⁺	2.10	1X9Z	[124]
	C-Концевой домен	-	2.50	3GAB	[125]
	«	-	2.00	3KDG	[125]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	«	Zn ²⁺	2.26	3KDK	[125]
	C-Концевой домен	-	2.40	3NCV	[126]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (MLH1/PMS1)	C-Концевые домены гетеродимера	-	2.50	4E4W	—
	C-Концевые домены гетеродимера с фрагментом N-концевого домена	Zn ²⁺	2.69	4FMN	—
	C-Концевые домены гетеродимера с фрагментом экзонуклеазы I	Zn ²⁺ , Mg ²⁺	3.04	4FMO	—
Человек (MLH1)	N-Концевой домен	АТФ	2.50	3NA3	—
	C-Концевой домен	-	2.16	3RBN	—

¹ADPnP – 5'-аденилил-β,γ-имидодифосфат.

ми, которые участвуют в различных процессах, затрагивающих ДНК, таких, как репарация двухцепочечных разрывов ДНК, обеспечение клеточного ответа на повреждение ДНК, запуск апоптоза, мейотическая рекомбинация и соматическое гипермутирование [116–119]. Все это делает MutL главным звеном в координации узнавания повреждения в ДНК и в клеточном ответе на повреждение одним из возможных способов: репарацией, задержкой клеточного деления или апоптозом [116].

MutL (и его эукариотические гомологи) неспецифически связывает одно- и двухцепочечную ДНК [111, 120]. Предполагается, что взаимодействие MutL с ДНК происходит в комплексе с MutS. Биохимические исследования белка MutL затруднены из-за его конформационной мобильности, и о его действии можно судить только через изменение функции его белков-партнеров [116].

Белок MutL, как и MutS, функционирует в виде димера: гомодимера у *E. coli* и гетеродимера у эукариот (MutLα = MLH1 и PMS2, MutLβ = MLH1 и PMS1, MutLγ = MLH1 и MLH3). Полипептидная цепь MutL из *E. coli* имеет массу 68 кДа [121]. Структура полноразмерного белка не установлена, однако получены кристаллы С-концевого и N-концевого доменов по отдельности [122–127]. Все имеющиеся к настоящему моменту структуры, решенные для MutL и его гомологов, представлены в табл. 3.

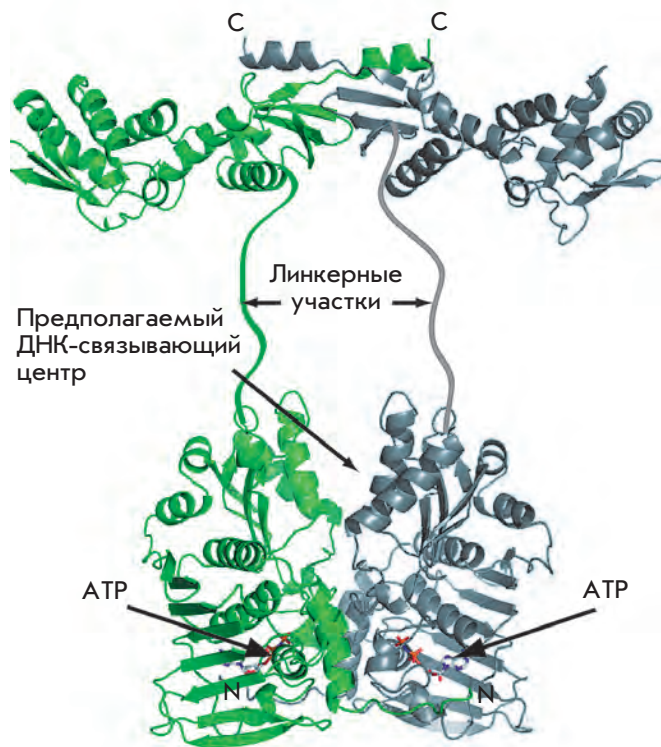


Рис. 6. Модель структуры полноразмерного гомодимерного белка MutL из *E. coli*, полученная на основе структуры N-концевого (PDB-код 1B62) и C-концевого (PDB-код 1X9Z) доменов

Существующая на сегодняшний день модель структуры MutL (рис. 6) получена на основе данных РСА для N- и C-концевых доменов белка [128]. Согласно этой модели N-концевой (а.о. 1–349) и C-концевой (а.о. 432–615) домены соединены между собой неструктурированным участком (а.о. 350–431) [125, 129]. Интересно, что первичная структура C-концевого домена гомологов MutL не является высококонсервативной, а вторичная структура консервативна, тогда как и первичная, и вторичная структуры N-концевого домена высококонсервативны.

В димере MutL C-концевые домены участвуют в образовании димеризационного интерфейса, а N-концевые домены содержат АТР-связывающие участки. MutL является АТР-азой, принадлежащей к новому семейству АТР-аз, не содержащих мотив Уолкера. К этому же семейству относятся топоизомеразы второго типа (гиразы), белок-шаперон Hsp90 и гистидиновые киназы [130]. Связывание и гидролиз АТР приводят к структурным перестройкам всего N-концевого домена [122]. В присутствии АТР и АТР N-концевые домены димеризуются. Для эукариотических гомологов MutL показана различная активность двух АТР-азных доменов гетеродимеров в АТР-азном цикле [131]. Значение АТР-азного цикла велико для функционирования MutL. Мутантные формы MutL, у которых АТР-азная активность отсутствует, не способны участвовать в репарации и выполнении остальных функций белка [132]. Полагают, что АТР-азная активность необходима белку MutL для модулирования белок-белковых взаимодействий [122].

Две петли MutL, приближенные к N-концу, участвуют во взаимодействии с MutS, а желобок, сформированный вдоль боковой поверхности N-концевого домена, вовлечен в связывание с MutH [133] (рис. 6). Желобок седловидной формы, находящийся на поверхности N-концевого домена, скорее всего, участвует в связывании с ДНК. Мутации основных аминокислот, находящихся в этом участке, например Arg266, приводят к уменьшению сродства MutL к ДНК и снижают его АТР-азную активность [134, 135]. Однако предположение о ДНК-связывающей поверхности в MutL требует экспериментальных подтверждений. Интересно, что MutL α содержит эндонуклеазный мотив DQNA(X)₂E(X)₄E (X – любая аминокислота), локализованный в субъединице PMS2 [136]. Этот каталитический мотив найден у всех гомологов MutL, за исключением гамма-протеобактерий, у которых сайт-направленный гидролиз дочерней цепи ДНК осуществляет белок MutH. Тем не менее регуляция функции каталитического мотива MutL при гидролизе дочерней цепи ДНК до конца не выяснена.



Рис. 7. Кристаллическая структура комплекса белка MutH из *Haemophilus influenzae* с ДНК (выделена серым), содержащей монометилированный участок 5'-Gm⁶ATC-3'/3'-CTAG-5' (PDB-код 2AOR). Координированные в комплексе два иона Ca²⁺ обозначены фиолетовым цветом. Указана α -спираль E MutH, взаимодействующая с белком MutL

MutH – БЕЛОК, НАПРАВЛЯЮЩИЙ MMR В *E. coli*

Белок MutH – мономерная сайт-специфическая нуклеаза массой 25 кДа обладает сходством с эндонуклеазой рестрикции II-го типа Sau3AI [137] и по структуре напоминает PvuII и EcoRV [138]. Белок MutH специфически связывает двухцепочечную последовательность 5'-Gm⁶ATC-3'/3'-CTAG \downarrow -5' (стрелкой указано место гидролиза) и катализирует гидролиз только одной – неметилированной, т.е. вновь синтезированной цепи ДНК [16]. Кроме того, MutH гидролизует и неметилированные участки, что может привести к появлению двухцепочечных разрывов [101]. Полностью метилированную последовательность ДНК MutH практически не узнает и не гидролизует [139]. Подобно большинству эндонуклеаз рестрикции II-го типа MutH содержит характерный мотив Asp(X)_n-Glu-X-Lys (DEK-мотив, X – любая аминокислота). Для проявления каталитической активности фермента требуются два иона Mg²⁺ [140]. Скорость гидролиза ДНК этим ферментом невелика, однако она значительно увеличивается в присутствии MutS, MutL и при наличии в ДНК «мисматча» [79]. При низкой ионной силе раствора активность MutH стимулируется белком MutL без участия MutS, связанного с «мисматчем» [91].

Определена кристаллическая структура MutH из *Haemophilus influenzae* (61% идентичности с MutH

из *E. coli*) как в комплексе с ДНК, так и без ДНК [137, 140]. По укладке фермент напоминает эндонуклеазу рестрикции II-го типа – PvuII [138]. Апофермент MutH представляет собой охватывающий «зажим» из двух «рук» (N- и C-«руки», рис. 7), разделенных большим ДНК-связывающим карманом. Каталитический центр находится в N-«руке». В C-«руке» находятся аминокислоты, отвечающие за специфическое связывание участка узнавания белка, в частности, образующие контакты с гетероциклическими основаниями. При связывании специфической ДНК белок компактизуется, «руки» смещаются одна относительно другой на 6–18° по сравнению с закрытой апоформой белка, ДНК-связывающий карман сужается, плотно охватывая участок узнавания в ДНК. Структура ДНК также претерпевает перестройки, при этом неметилированный участок узнавания сильнее изогнут и искажен (угол изгиба составляет около 30°), чем монометилированный. Тем не менее локальные ДНК-белковые контакты с участками узнавания в двух комплексах не отличаются. Однако монометилированная ДНК плотнее охвачена ферментом, чем неметилированная (площадь ДНК-белкового контакта составляет 2100 и 1850 Å² соответственно). В результате ДЕК-мотив эффективнее взаимодействует с ДНК, что обуславливает на порядок большую скорость гидролиза монометилированного участка узнавания по сравнению с неметилированным [140]. Таким образом, в случае белка MutH степень изгиба ДНК не коррелирует с эффективностью ее гидролиза. Единичные замены аминокислот ДНК-связывающего кармана показали, что в определении метилированного статуса ДНК важен Tyr212 [139].

Важной чертой MutH является увеличение его каталитической активности в процессе MMR. До сегодняшнего дня неясно, каким образом происходит стимуляция активности MutH. В кристаллической структуре апоформы белка MutH ДНК-связывающий канал недостаточно широк для связывания ДНК. Предполагается, что при связывании MutL с MutH расширяется ДНК-связывающий канал последнего, что увеличивает скорость связывания MutH с ДНК [140]. Как показано с помощью белок-белковых сшивок, MutL взаимодействует с расположенной на поверхности глобулы MutH C-концевой α-спиралью E [141] (рис. 7). Возможно, образование белок-белковых контактов облегчает вращательное движение C-«руки» MutH, ДНК-связывающий карман оказывается в результате более доступным для связывания с субстратом [132, 140].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ MutS, MutL, MutH И ДНК

Как упоминалось ранее, тройной комплекс, состоящий из белков MutS и MutL, связанных с ДНК, яв-

ляется ключевым интермедиатом в репарации «мисматчей» ДНК. Он координирует все этапы репарации после распознавания «мисматча» (т.е. эксцизионную репарацию, включая расплетание ДНК по направлению к «мисматчу») и участвует также в передаче сигнала о повреждении ДНК другим системам клетки, контролирующим клеточное деление и запуск апоптоза [142]. Однако структура этого комплекса на сегодняшний день не выяснена. Кроме того, сам белок MutL имеет довольно низкое сродство к ДНК, особенно к ее коротким линейным фрагментам. В присутствии MutS, ионов Mg²⁺ и АТФ связывание с ДНК происходит более эффективно [83, 115].

Тройной комплекс (MutS, MutL и ДНК) имеет динамичную природу, поэтому его невозможно изучать методами кристаллизации и РСА. Для изучения областей контакта белков MutS и MutL использовали мутационный анализ и масс-спектрометрию, основанную на водород/дейтериевом обмене. Было установлено, что аминокислотные остатки MutS, важные для образования контактов с MutL, расположены в его соединительном домене [143]. Во взаимодействии с MutS принимает участие N-концевой, АТФ-азный домен MutL [133]. Кроме того, проведены детальные исследования, основанные на сайт-направленной белок-белковой «сшивке» с помощью бифункциональных химических агентов, реагирующих с остатками цистеина белка, в сочетании с флуоресцентными методами [144]. Предварительно были сконструированы мутантные формы белков MutS и MutL, содержащие единственный остаток цистеина в заданном положении. На основе экспериментальных данных П. Фридрихсхоффом и соавт. [144] предложена модель структуры комплекса MutS, MutL и MutH, связанных с ДНК, содержащей «мисматч» (рис. 8). Для построения модели комплекса авторы использовали структуру белка MutL без C-концевого домена. Ранее было показано [122], что этот домен не контактирует с ДНК, и N-концевого домена MutL достаточно для активации MutH. Согласно модели, аминокислотные остатки в положении 246 MutS и 297 MutL (из обоих мономеров белков) находятся на расстоянии менее 40 Å, а остатки 449 MutS и 297 MutL удалены более чем на 50 Å. Эта модель не описывает все возможные взаимодействия молекул, для создания более полной картины требуются дополнительные исследования. Кроме того, модель не учитывает описанного ранее [95] перехода ДНК из изогнутой формы в линейную после активации MutS, предшествующей взаимодействию MutS с MutL.

Предложенная П. Фридрихсхоффом и соавт. [144] модель комплекса белков MutS, MutL и MutH с ДНК базируется на опубликованной ими ранее модели взаимодействия белков MutL и MutH [133]. Рас-

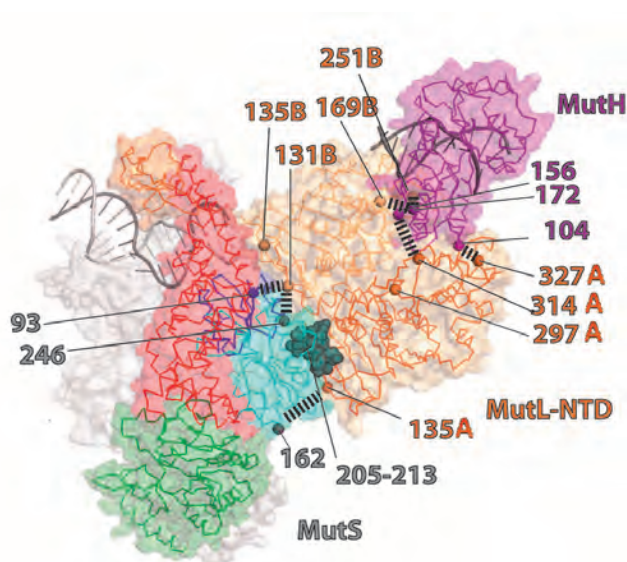


Рис. 8. Структурная модель комплекса MutS–MutL–MutH–ДНК. MutS обозначен серым цветом («мисматч»-связывающий домен выделен красным, соединительный домен – зеленым). N-Концевые домены (NTD) двух субъединиц димера MutL обозначены темно- и светло-оранжевым. С-Концевые и линкерные домены MutL не показаны. Белок MutH выделен фиолетовым цветом. Модель построена на основе структур: MutS (PDB-код 1E3M), MutL (PDB-код 1B63) и MutH с ДНК (PDB-коды 2AZO и 2AOR). Указаны аминокислоты, участвующие в образовании белок-белковых контактов (цвет цифры обозначает принадлежность аминокислотного остатка к тому или иному белку)

стояния между двумя белками и поверхности взаимодействия также определены с использованием мутантных форм MutL и MutH, содержащих единственный остаток цистеина, а также тиолдисульфидных реагентов и «фотокросслинкеров». Сделан вывод о возможности существования комплекса, в котором все три молекулы: MutS, MutL и MutH, находятся в непосредственной близости друг к другу. При этом не требуется формирование разделяющей белки петли ДНК, что позволяет комплексу скользить по ДНК в поисках сигнала дискриминации материнской и дочерней цепей ДНК.

МОДЕЛИ КООРДИНАЦИИ МЕЖДУ УЧАСТКОМ УЗНАВАНИЯ И УЧАСТКОМ ГИДРОЛИЗА ДНК В СИСТЕМЕ ММР

На сегодняшний день существуют различные представления о процессах, которые происходят после формирования «окончательного» узнающего комплекса. В ряде работ сделаны попытки систематизации этих моделей [13, 14, 59, 145]. Однако это только

усложняет ситуацию, так как одни и те же явления описываются с использованием различной терминологии и, наоборот, одни и те же термины применяют к различным процессам. В данном обзоре мы попытались обобщить существующие модели передачи сигнала от «мисматча» к белкам, выполняющим эксцизионную репарацию, основываясь на принципах «физического» взаимодействия белков репарации с ДНК. Взаимосвязь ДНК-связывающей и нуклеотидсвязывающей функций белков рассмотрена выше и не учитывается с целью создания упрощенной картины.

В клетках *E. coli* на этапе передачи сигнала для выявления дочерней цепи и последующей эксцизионной репарации «мисматч» и одноцепочечный разрыв разделяют большие расстояния (вплоть до 2000 п.н.) [146]. Процесс является двунаправленным, т.е. гидролиз происходит как в одном, так и в другом направлении от «мисматча» [61, 147]. Эти экспериментальные факты лежат в основе всех моделей. Различные точки зрения на механизм инициации процесса ММР суммированы на рис. 9.

Существующие транс- и цис-модели [13] координации между участком узнавания и участком гидролиза ДНК в системе ММР различаются тем, требуются ли значительные конформационные перестройки ДНК (например, образование петель в форме буквы α) или нет соответственно. Примеры цис-механизма действия можно найти среди эндонуклеаз рестрикции (типы I и III), а транс-механизм распространен при регуляции транскрипции генов [145].

За основу для создания модели берут и другой признак – остается MutS (или тройной комплекс MutS–MutL–ДНК) связанным с «мисматчем» или перемещается от него. При этом выделяют стационарные модели и модели «скользящего зажима». На сегодняшний день все перечисленные выше модели имеют экспериментальные подтверждения. Наиболее популярна модель «скользящего зажима» [98, 148–150]. Согласно этой модели в «окончательном» узнающем комплексе с ДНК и двумя молекулами АТФ MutS теряет сродство к «мисматчу» и формирует структуру своеобразного ДНК-«зажима». При этом димер белка имеет два канала, разделенных между собой центральными («мисматч»-связывающими) доменами, больший из них связывает ДНК (рис. 3). При образовании «скользящего зажима» в MutS происходят значительные перестройки. Предполагается, что центральные («мисматч»-связывающие) домены из каждой субъединицы димера отходят друг от друга, и таким образом канал, в котором находится ДНК, увеличивается в 2 раза в результате объединения двух каналов [44]. Однако эти предположения нуждаются в экспериментальных подтверждениях.

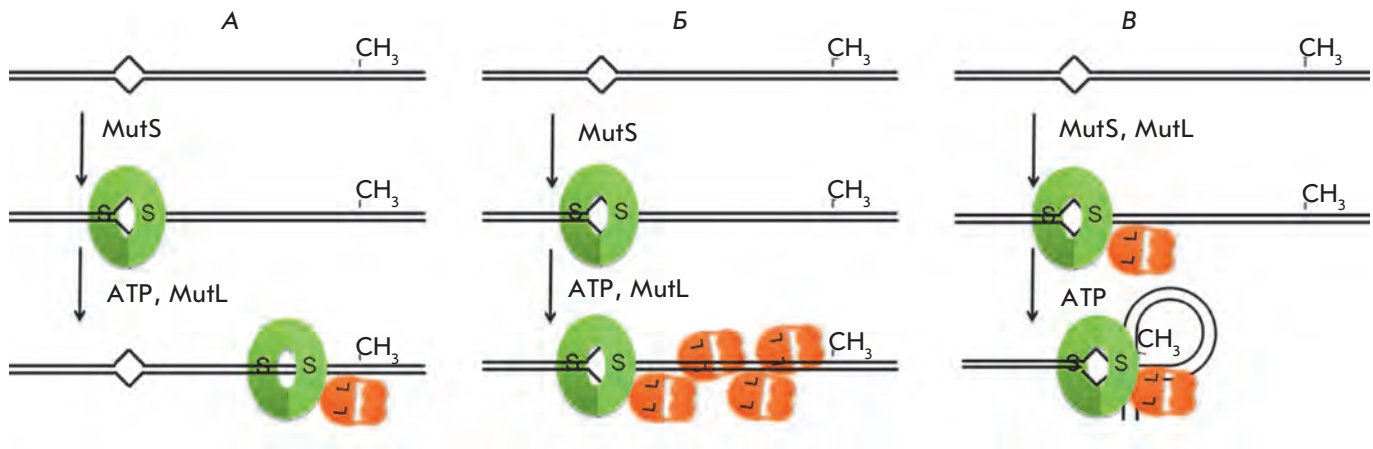


Рис. 9. Модели координации между «мисматчем» и монометилированным участком 5'-Gm⁶ATC-3' / 3'-CTAG-5': цис- (А и Б) и транс- (В). По другой классификации: модели «скользящего зажима» (А), множественной полимеризации MutL на ДНК (Б) и выпетливания ДНК (В)

В конформации «скользящего зажима» MutS служит «включенным» переключателем, способным перемещаться по ДНК и активировать функцию других белков системы MMR. Для такого перемещения MutS не требуется гидролиз АТФ [104]. «Молекулярные зажимы» выполняют важные функции в метаболизме ДНК, например, PCNA направляет репликацию ДНК и увеличивает процессивность ДНК-полимеразы. В пользу этой модели служит тот факт, что и бактериальные белки MutS, и их эукариотические гомологи в присутствии АТФ «соскальзывают» с участка ДНК, содержащего неканоническую пару нуклеотидов, а затем с концов линейных ДНК (если они не «заблокированы» объемными группами или прочно связанными с ними белками) [98, 151]. Недавние исследования [104], выполненные с использованием флуоресцентных методов, позволили рассчитать время жизни «скользящего зажима»: оно оказалось довольно продолжительным и составляло около 10 мин. Обсуждаемый механизм предполагает возможность связывания нескольких молекул MutS с ДНК, содержащей неканоническую пару нуклеотидов, что может повысить эффективность репарации [145].

Согласно другим моделям MutS должен оставаться связанным с ДНК. Например, Кункель и Эре [13] предполагают, что АТФ-зависимое перемещение MutS с «мисматча» не обязательно для его функционирования, и для дальнейших событий репарации важны лишь конформационные изменения белка. В пользу этой модели свидетельствует тот факт, что у тройного комплекса MutS–MutL–ДНК, связанного с АТФ, время жизни в районе «мисматча» больше, чем только у MutS, активированного «мисматчем» и связанного с АТФ [145, 151, 152]. Скорее всего, *in vivo* MutS может перемещаться с «мисматча», но лишь на небольшие

расстояния, так как по результатам футпринтинга [152] и исследований, выполненных методом поверхностного плазмонного резонанса [150], участок ДНК в районе «мисматча» закрыт связавшимися с ним белками. Кункель и Эре также предполагают, что изгиб ДНК в районе «мисматча» или какая-либо деформация ДНК, вызванная белком MutS, должны сохраняться в ходе всех этапов MMR, что будет служить направляющим и, вероятно, терминирующим сигналом при эндонуклеазной деградации дочерней цепи ДНК [13]. Это возможно только при сохранении контакта между «мисматчем» и MutS.

Согласно еще одной стационарной модели передача сигнала от MutS к MutH (между «мисматчем» и участком гидролиза) происходит в результате связывания большого числа молекул MutL с ДНК (образование нуклеопротеиновых филаментов), пока не будет достигнут участок гидролиза ДНК (рис. 9В) [153]. Экспериментальное подтверждение этой модели появилось совсем недавно. Методом флуоресцентной микроскопии на живых клетках, вырабатывающих флуоресцентно меченные белки MutL и MutS, показано, что в районе «мисматча» белков MutL в 3 раза больше, чем MutS [154]. Тем не менее это число недостаточно велико, чтобы можно было однозначно утвердить модель полимеризации.

Существуют модели, предполагающие выпетливание ДНК (транс-модели, рис. 9В). Впервые предположение о таком механизме было выдвинуто в результате изучения активации MutH в присутствии MutS и MutL. В эксперименте «мисматч» находился на одной плазмиде, а участок 5'-Gm⁶ATC-3' / 3'-CTAG-5' – на другой. В контроле оба участка находились на одной и той же плазмиде. Эффективность гидролиза в обоих случаях совпадала [152]. Более

того, в клетке редко встречается ДНК, свободная от белков. Обычно практически сразу после репликации она структурируется с участием белков, и в результате для скольжения MutS вдоль ДНК создаются помехи [115]. В пользу модели, включающей выпетливание ДНК, служат также данные, полученные методом атомно-силовой микроскопии. Эти данные указывают на значение тетрамеризации MutS в присутствии АТР [148, 155]. На микрофотографиях можно обнаружить два типа комплексов MutS с ДНК. Первый тип сформирован димером MutS с ДНК, а другой представляет собой петлю ДНК, образованную с участием двух димеров белка. Таким образом, происходит разделение гомодимеров MutS по функциям на две группы, где часть остается связанной с «мисматчем», а другая «протягивает» через себя ДНК, сохраняя контакт с первым димером. «Неподвижная» группа димеров MutS может быть результатом гидролиза АТР в одном из доменов димера. В рамки этого «комбинированного» механизма укладываются цис- и транс-механизмы процесса MMR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существуют различные взгляды на механизм MMR, поэтому продолжаются активные исследования в этой области. Выявление единичного «мисматча» среди многих тысяч канонических пар нуклеотидов в ДНК представляет собой уникальный процесс [155]. Методом флуоресцентного резонансного переноса энергии на уровне одной молекулы обнаружено множество конформаций белка MutS в присутствии канонических ДНК-лигандов [104].

Вместе с тем связывание белка MutS с ДНК в поиске «мисматча», представляющее собой ключевое событие процесса MMR, до сих пор не охарактеризовано полностью. Спорные моменты касаются не только короткоживущих промежуточных комплексов MutS с ДНК, но и более сложных комплексов: MutS–MutL–ДНК и MutS–MutL–MutH–ДНК. Для характеристики этих комплексов можно использовать сочетание различных оптических [95, 153, 154] и флуоресцентных [143] методов с кросслинкингом белков и белков с ДНК [140]. Перспективным представляется недавно предложенный подход к изучению короткоживущих комплексов, основанный на ковалентной фиксации MutS на ДНК [156].

Необходимы исследования структуры MutS в процессе сканирования ДНК. Полагают, что «мисматч»-связывающие домены из обеих субъединиц димера MutS теряют сродство к друг другу, тем самым канал белка, в котором находится ДНК, увеличивается в 2 раза [44]. Особенно сложную проблему представляет изучение взаимной координации белков системы MMR, а также влияние на их активность других клеточных белков. Очевидно, что для создания полной картины функционирования системы репарации MMR в живой клетке необходимы дальнейшие исследования. ●

*Работа поддержана РФФИ
(грант № 13-04-00615-а) и программой
РФФИ-ННИО «Международные исследовательские
группы с участием молодых ученых»
(грант № 11-04-91336-ННИО_а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lewin B. Genes. Boston, MA: Jones Bartlett Publ., 2008. 892 p.
- Futreal P.A., Coin L., Marshall M., Down T., Hubbard T., Wooster R., Rahman N., Stratton M.R. // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4. P. 177–183.
- Drake J.W. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1999. V. 870. P. 100–107.
- Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1987. Т. 2. 368 с.
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C.: ASM Press, 1995. 698 p.
- O'Neil N., Rose A. // WormBook. 2006. P. 1–12.
- Koshland D.E. Jr. // Science. 1994. V. 266. P. 1925.
- Лаврик О.И. // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 7.
- Buermeyer A.B., Deschênes S.M., Baker S.M., Liskay R.M. // Annu. Rev. Genet. 1999. V. 33. P. 533–564.
- Hsieh P. // Mutat. Res. 2001. V. 486. P. 71–87.
- Marti T.M., Kunz C., Fleck O. // J. Cell Physiol. 2002. V. 191. P. 28–41.
- Barnes D.E., Lindahl T. // Annu. Rev. Genet. 2004. V. 38. P. 445–476.
- Kunkel T.A., Erie D.A. // Annu. Rev. Biochem. 2005. V. 74. P. 681–710.
- Iyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.L. // Chem. Rev. 2006. V. 106. P. 302–323.
- Jiricny J. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006. V. 7. P. 335–346.
- Fukui K. // J. Nucl. Acids. 2010. V. 2010. P. 1–16.
- Голясная Н.В., Цветкова Н.А. // Молекуляр. биология. 2006. Т. 40. С. 211–223.
- Modrich P. // Annu. Rev. Genet. 1991. V. 25. P. 229–253.
- Lichten M., Goyon C., Schultes N., Treco D., Szostak J.W., Haber J.E., Nicolas A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 7653–7657.
- Reenan R.A., Kolodner R.D. // Genetics. 1992. V. 132. P. 975–985.
- Modrich P., Lahue R. // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. P. 101–133.
- Kolodner R.D., Marsischky G.T. // Curr. Opin. Genet. Dev. 1999. V. 9. P. 89–96.
- Branch P., Aquilina G., Bignami M., Karran P. // Nature. 1993. V. 362. P. 652–654.
- Duckett D.R., Drummond J.T., Murchie A.I.H., Reardon J.T., Sancar A., Lilley D.M.J., Modrich P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 6443–6447.
- Ni T.T., Marsischky G.T., Kolodner R.D. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 439–444.
- Mazurek A., Berardini M., Fishel R. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 8260–8266.
- Li G.M., Wang H., Romano L.J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271.

- P. 24084–24088.
28. Feng W.Y., Lee E.H., Hays J.B. // *Genetics*. 1991. V. 129. P. 1007–1020.
29. Mu D., Tursun M., Duckett D.R., Drummond J.T., Modrich P., Sancar A. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 760–769.
30. Wang H., Lawrence C.W., Li G.M., Hays J.B. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 16894–16900.
31. Mello J.A., Acharya S., Fishel R., Essigmann P. // *Chem. Biol.* 1996. V. 3. P. 579–589.
32. Pabla N., Ma Z., McIlhatton M.A., Fishel R., Dong Z. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10411–10418.
33. Stojic L., Brun R., Jiricny J. // *DNA Repair (Amst.)*. 2004. V. 3. P. 1091–1101.
34. Greig D., Travisano M., Louis E.J., Borts R.H. // *J. Evol. Biol.* 2003. V. 16. P. 429–437.
35. Sia E.A., Kokoska R.J., Dominska M., Greenwell P., Petes T.D. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. P. 2851–2858.
36. Wu B.P., Zhang Y.L., Zhou D.Y., Gao C.F., Lai Z.S. // *World J. Gastroenterol.* 2000. V. 6. P. 902–905.
37. Bechter O.E., Zou Y., Walker W., Wright W.E., Shay J.W. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 3444–3451.
38. Nguyen B., Elmore L.W., Holt S.E. // *Cancer Biol. Ther.* 2004. V. 3. P. 293–295.
39. Evans E., Alani E. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 7839–7844.
40. Schanz S., Castor D., Fischer F., Jiricny J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 5593–5598.
41. Chahwan R., Edelmann W., Scharff M.D., Roa S. // *Biomed. Pharmacother.* 2011. V. 65. P. 529–536.
42. Aravind L., Walker D.R., Koonin E. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 1223–1242.
43. Michailidi C., Papavassiliou A.G., Troungos C. // *Curr. Mol. Med.* 2012. V. 12. P. 237–246.
44. Qiu R., DeRocco V. C., Harris C., Sharma A., Hingorani M.M., Erie D.A., Weninger K.R. // *EMBO J.* 2012. V. 31. P. 2528–2540.
45. Jiricny J., Nystrom-Lahti M. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. V. 10. P. 157–161.
46. Harfe B.D., Jinks-Robertson S. // *Annu. Rev. Genet.* 2000. V. 34. P. 359–399.
47. Peltomäki P. // *J. Clin. Oncol.* 2003. V. 21. P. 1174–1179.
48. Reuschenbach M., Kloor M., Morak M., Wentzensen N., Germann A., Garbe Y., Tariverdian M., Findeisen P., Neumaier M., Holinski-Feder E., et al. // *Fam. Cancer*. 2010. V. 9. P. 173–179.
49. Lahue R.S., Au K.G., Modrich P. // *Science*. 1989. V. 245. P. 160–164.
50. Balganesch T.S., Lacks S.A. // *J. Bacteriol.* 1985. V. 162. P. 979–984.
51. Radman M., Wagner R. // *Annu. Rev. Genet.* 1986. V. 20. P. 523–538.
52. Li G.M. // *Cell Res.* 2008. V. 18. P. 85–98.
53. Zhao J., Winkler M.E. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 5025–5028.
54. Fourrier L., Brooks P., Malinge J.M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 21267–21275.
55. Lamers M.H., Perrakis A., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., de Wind N., Sixma T.K. // *Nature*. 2000. V. 407. P. 711–717.
56. Wildenberg J., Meselson M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 2202–2206.
57. Wagner R., Meselson M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976. V. 73. P. 4135–4139.
58. Lyons S.M., Schendel F. // *J. Bacteriol.* 1984. V. 159. P. 421–423.
59. Duppatla N.J., Rao D.N. // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 2006. V. 81. P. 1–49.
60. Lu A.-L., Clark S., Modrich P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. P. 4639–4643.
61. Glickman B.W. // *Mutat. Res.* 1979. V. 61. P. 153–162.
62. Marinus M.G., Poteete A., Arraj J.A. // *Gene*. 1984. V. 28. P. 123–125.
63. Gorman J., Chowdhury A., Surtees J.A., Shimada J., Reichman D.R., Alani E., Greene E.C. // *Mol. Cell*. 2007. V. 28. P. 359–370.
64. Nishant K.T., Plys A.J., Alani E. // *Genetics*. 2008. V. 179. P. 747–755.
65. Claverys J.-P., Mejean P., Gasc A.-M., Sicard A.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. P. 5956–5960.
66. Yamaguchi M., Dao V., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 9197–9201.
67. Mechanic L.E., Frankel B.A., Matson S.W. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 38337–38346.
68. Matson S.W., Robertson A.B. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 4089–4097.
69. Cooper D.L., Lahue R.S., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 11823–11829.
70. Viswanathan M., Burdett P., Baitinger C., Modrich P., Lovett S.T. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 31053–31058.
71. Han E.S., Cooper D.L., Persky N.S., Sutter V.A. Jr., Whitaker R.D., Montello M.L., Lovett S.T. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 1084–1091.
72. Lohman T.M., Ferrari M.E. // *Annu. Rev. Biochem.* 1994. V. 63. P. 527–570.
73. Bjornson K.P., Blackwell L.J., Sage H., Baitinger C., Allen D., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 34667–34673.
74. Kang J., Huang S., Blaser M.J. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 3528–3537.
75. Snowden T., Acharya S., Butz C., Berardini M., Fishel R. // *Mol. Cell*. 2004. V. 15. P. 437–451.
76. Hollingsworth N.M., Ponte L., Halsey C. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. P. 1728–1739.
77. Culligan K.M., Meyer-Gauen G., Lyons-Weiler J., Hays J.B. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 463–471.
78. Obmolova G., Ban C., Hsieh P., Yang W. // *Nature*. 2000. V. 407. P. 703–710.
79. Junop M.S., Obmolova G., Rausch K., Hsieh P., Yang W. // *Mol. Cell*. 2001. V. 7. P. 1–12.
80. Lamers M.H., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 746–756.
81. Natrajan G., Lamers M.H., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., Perrakis A., Sixma T.K. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 4814–4821.
82. Alani E., Lee J.Y., Schofield M.J., Kijas A.W., Hsieh P., Yang W. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 16088–16094.
83. Lebbink J.H.G., Fish A., Reumer A., Natrajan G., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 13131–13141.
84. Lebbink J.H.G., Georgijevic D., Natrajan G., Fish A., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K., de Wind N. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 409–419.
85. Lamers M.H., Georgijevic D., Lebbink J.H., Winterwerp H.H.K., Agianian B., de Wind N., Sixma T.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 43879–43885.
86. Warren J.J., Pohlhaus T.J., Changela A., Iyer R.R., Modrich P.L., Beese L.S. // *Mol. Cell*. 2007. V. 26. P. 579–592.
87. Jiricny J. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. P. R788–790.
88. Biswas I., Hsieh P. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 13355–13364.
89. Sixma T.K. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001. V. 11. P. 47–52.
90. Yamamoto A., Schofield M.J., Biswas I., Hsieh P. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3564–3569.
91. Junop M.S., Yang W., Funchain P., Clendenin W., Miller J.H. // *DNA Repair (Amst.)*. 2003. V. 2. P. 387–405.

92. Hunter W.N., Brown T., Kneale G., Anand N.N., Rabinovich D., Kennard O. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 9962–9970.
93. Skelly J., Edwards K.J., Jenkins T.C., Neidle S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 804–808.
94. Werntges H., Steger G., Riesner D., Fritz H.J. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 3773–3790.
95. Wang H., Yang Y., Schofield M.J., Du C., Fridman Y., Lee S.D., Larson E.D., Drummond J.T., Alani E., Hsieh P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 14822–14827.
96. Hirano M., Hirano T. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 5733–5744.
97. Verdon G., Albers S., van Oosterwijk N., Dijkstra B.W., Driessen A.J., Thunnissen A.M. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 334. P. 255–267.
98. Gradia S., Subramanian D., Wilson T., Acharya S., Makhov A., Griffith J., Fishel R. // *Mol. Cell.* 1999. V. 3. P. 255–261.
99. Joshi A., Rao B.J. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. P. 3654–3666.
100. Hess M.T., Gupta R.D., Kolodner R.D. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 25545–25553.
101. Joseph N., Duppatla V., Rao D.N. // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 2006. V. 81. P. 1–49.
102. Antony E., Hingorani M.M. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 13115–13128.
103. Calmann M.A., Nowosielska A., Marinus M.G. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. P. 1193–1200.
104. Jeong C., Cho W.K., Song K.M., Cook C., Yoon T.Y., Ban C., Fishel R., Lee J.B. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. P. 379–385.
105. Cheng X., Blumenthal R.M. // *Structure.* 1996. V. 4. P. 639–645.
106. Bischerour J., Chalmers R. // *PLoS One.* 2009. V. 4. e6201. doi: 10.1371/journal.pone.0006201.
107. Gradia S., Acharya S., Fishel R. // *Cell.* 1997. V. 91. P. 995–1005.
108. Fishel R. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 2096–2101.
109. Antony E., Hingorani M.M. // *Biochemistry.* 2003. V. 42. P. 7682–7693.
110. Martik D., Baitinger C., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 28402–28410.
111. Drotschmann K., Hall M.C., Shcherbakova P.V., Wang H., Erie D.A., Brownell F.R., Kool E.T., Kunkel T.A. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383. P. 969–975.
112. Kijas A.W., Studamire B., Alani E. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 331. P. 123–138.
113. Acharya S., Foster P.L., Brooks P., Fishel R. // *Mol. Cell.* 2003. V. 12. P. 233–246.
114. Bowers J., Sokolsky T., Quach T., Alani E. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 16115–16125.
115. Mukherjee S., Law S.M., Feig M. // *Biophys. J.* 2009. V. 96. P. 1707–1720.
116. Polosina Y.Y., Cupples C.G. // *Mutat. Res.* 2010. V. 705. P. 228–238.
117. Zhao N., Zhu F., Yuan F., Haick A.K., Fukushige S., Gu L., Her C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 370. P. 338–343.
118. Dherin C., Gueneau E., Francin M., Nunez M., Miron S., Liberti S.E., Rasmussen L.J., Zinn-Justin S., Gilquin B., Charbonnier J.B., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. P. 907–918.
119. Kanao R., Hanaoka F., Masutani C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 389. P. 40–45.
120. Bende S.M., Grafstrom R.H. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 1549–1555.
121. Grilley M., Welsh K.M., Su S.S., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 1000–1004.
122. Ban C., Junop M., Yang W. // *Cell.* 1999. V. 97. P. 85–97.
123. Ban C., Yang W. // *Cell.* 1998. V. 95. P. 541–552.
124. Hu X., Machius M., Yang W. // *FEBS Lett.* 2003. V. 544. P. 268–273.
125. Guarné A., Ramon-Maiques S., Wolff E.M., Ghirlando R., Hu X., Miller J.H., Yang W. // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 4134–4145.
126. Pillon M.C., Lorenowicz J.J., Uckelmann M., Klocko A.D., Mitchell R.R., Chung Y.S., Modrich P., Walker G.C., Simmons L.A., Friedhoff P., Guarné A. // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. P. 145–511.
127. Namadurai S., Jain D., Kulkarni D.S., Tabib C.R., Friedhoff P., Rao D.N., Nair D.T. // *PloS One.* 2010. V. 5. e13726.
128. Kosinski J., Steindorf I., Bujnicki J.M., Giron-Monzon L., Friedhoff P. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 351. P. 895–909.
129. Jones D.T. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 292. P. 195–202.
130. Jun S.H., Kim T.G. // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 1609–1619.
131. Sacho E.J., Kadyrov F.A., Modrich P., Kunkel T.A., Erie D.A. // *Mol. Cell.* 2008. V. 29. P. 112–121.
132. Spampinato C., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 9863–9869.
133. Giron-Monzon L., Manelyte L., Ahrends R., Kirsch D., Spengler B., Friedhoff P. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 49338–49345.
134. Schofield M.J., Hsieh P. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2003. V. 57. P. 579–608.
135. Robertson A., Pattishall S.R. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 8399–8408.
136. Kadyrov F.A., Dzantiev L. // *Cell.* 2006. V. 126. P. 297–308.
137. Ban C., Yang W. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 1526–1534.
138. Yang W. // *Mutat. Res.* 2000. V. 460. P. 245–256.
139. Friedhoff P., Thomas E., Pingoud A. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 325. P. 285–297.
140. Lee J.Y., Chang J. // *Mol. Cell.* 2005. V. 20. P. 155–166.
141. Toedt G.H., Krishnan R., Friedhoff P. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 819–825.
142. Polosina Y.Y., Cupples C.G. // *BioEssays.* 2010. V. 32. P. 51–59.
143. Mendillo M.L., Hargreaves V.V., Jamison J.W., Mo A.O., Li S., Putnam C.D., Woods V.L. Jr., Kolodner R.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 22223–22228.
144. Winkler I., Marx A.D., Lariviere D., Heinze R.J., Cristovao M., Reumer A., Curth U., Sixma T.K., Friedhoff P. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 17326–17337.
145. Kolodner R.D., Mendillo M.L., Putnam C.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 12953–12964.
146. Pluciennik A., Modrich P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 12709–12713.
147. Dzantiev L., Constantin N., Genschel J., Iyer R.R., Burgers M., Modrich P. // *Mol. Cell.* 2004. V. 15. P. 31–41.
148. Allen D.J., Makhov A., Grilley M., Taylor J., Thresher R., Modrich P., Griffith J.D. // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 4467–4476.
149. Blackwell L.J., Martik D., Bjornson K., Bjornson E.S., Modrich P.J. // *Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 32055–32062.
150. Blackwell L.J., Wang S., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 33233–33240.
151. Mazur D.J., Mendillo M.L., Kolodner R.D. // *Mol. Cell.* 2006. V. 22. P. 39–49.
152. Schofield M.J., Nayak S., Scott T.H., Du C., Hsieh P. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 28291–28299.
153. Modrich P. // *Annu. Rev. Biochem.* 1987. V. 56. P. 435–466.
154. Elez M., Radman M., Matic I. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. 3929–3938.
155. Jiang Y., Marszalek E. // *EMBO J.* 2011. V. 30. P. 2881–2893.
156. Heinze R.J., Sekerina S., Winkler I., Biertümpfel C., Oretskaya T.S., Kubareva E., Friedhoff P. // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. P. 1861–1864.

УДК 577.21

Невирусные методы доставки и терапевтическое применение малых интерферирующих РНК

Н. А. Никитенко*, В. С. Прасолов

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

*E-mail: nanthalia@gmail.com

Поступила в редакцию 18.02.2013

РЕФЕРАТ Интерференция РНК является удобным инструментом регуляции экспрессии генов. Результаты детального изучения молекулярных механизмов РНК-интерференции открывают перспективы использования этого подхода в терапии различных заболеваний человека. Эффективная доставка малых интерферирующих РНК (siРНК) к клеткам-мишеням представляет собой серьезную проблему, поэтому необходима разработка новых систем доставки siРНК к своим потенциальным мишеням, а также способов защиты этих нестабильных молекул от деградации в условиях *in vivo*. В данном обзоре рассмотрены различные виды химических модификаций siРНК, а также невирусные векторы для их доставки на основе природных и синтетических полимеров, липидов, пептидов и неорганических соединений. Описаны преимущества, недостатки и перспективы применения этих методов в клинической практике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА интерференция РНК, малые интерферирующие РНК, невирусные системы доставки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РНК-и – интерференция РНК; дцРНК – двухцепочечная РНК; siРНК – малая интерферирующая РНК; shРНК – малая шпилечная РНК; miРНК – микроРНК; RISC – РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RNA-induced silencing complex); НЧ – наночастица.

ВВЕДЕНИЕ

Интерференция РНК (РНК-и) – эволюционно консервативный механизм регуляции экспрессии генов. Использование интерферирующих РНК открывает возможности для развития новых методов профилактики и лечения различных заболеваний человека [1]. Последние достижения биологии и медицины расширили спектр предполагаемых терапевтических мишеней. В настоящее время проходят клинические испытания препаратов, основанных на принципе РНК-и и предназначенных для применения при инфекционных, генетических и онкологических заболеваниях. Такие лекарственные средства, как терапевтические рибозимы, аптамеры и малые интерферирующие РНК (siРНК), широко применяются в различных областях научных исследований, а также в терапии и диагностике заболеваний человека. Следует отметить, что интерферирующие РНК потенциально иммуногенны, обладают невысокой стабильностью и нуждаются в эффективных и безопасных средствах доставки в клетки-мишени. Тем не менее обнадеживающие результаты клинических испытаний показывают, что эти барьеры можно преодолеть путем усовершенствования синтетических носителей и химических модификаций РНК [2]. В данном обзоре рассмотрены различные способы невирусной доставки интерферирующих РНК, а также

их преимущества, недостатки и перспективы применения в клинической практике. Разумеется, в достаточно коротком обзоре невозможно остановиться на детальном описании каждого из этих методов. Нашей целью было указать на многообразие уже апробированных и разрабатываемых способов доставки siРНК, что позволит заинтересованному читателю быстро сориентироваться в данной проблеме. Надеемся, что наша работа будет интересна широкому кругу читателей журнала *Acta Naturae*.

МЕХАНИЗМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Сигналом к началу РНК-интерференции служит появление в клетке экзогенной (вирусной или синтетической, введенной в ходе эксперимента) либо эндогенной (продукт транскрипции собственных генов) двухцепочечной РНК (дцРНК). Минимальный размер дцРНК, достаточный для индукции интерференции, – 21 п.н. Скорее всего, такое ограничение защищает от деградации собственную клеточную мРНК с короткими внутримолекулярными самокомплементарными структурами [3, 4].

После проникновения дцРНК в клетку фермент Dicer, относящийся к семейству РНКаз III (*рис. 1*), распознает и нарезает ее [5, 6]. Этот эволюционно консервативный белок обнаружен у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, низшего гриба *Neurospora cras-*

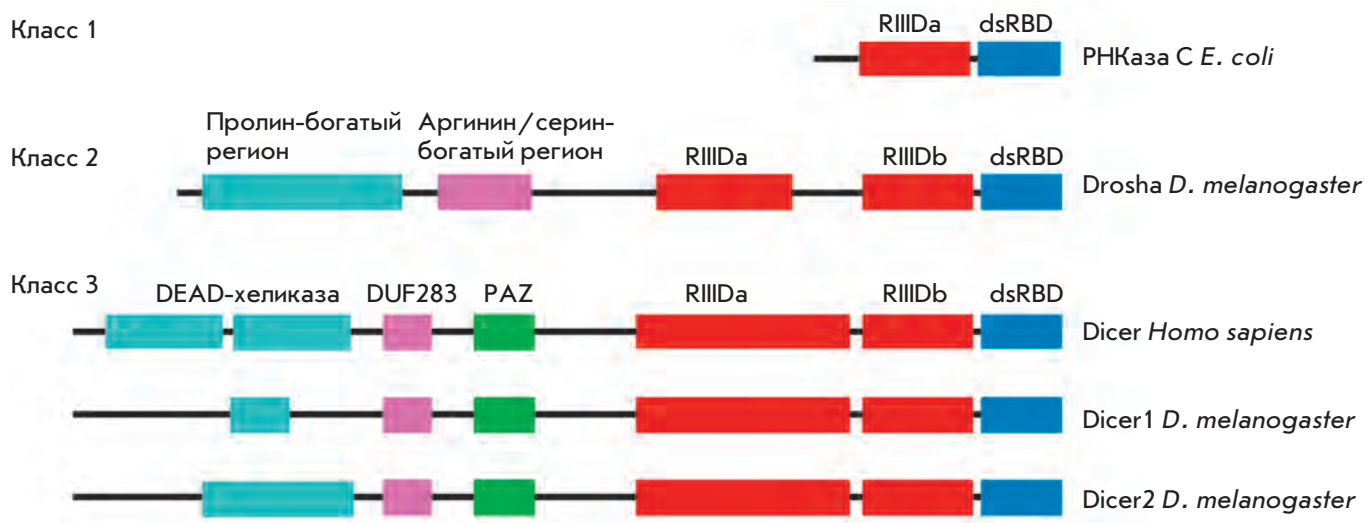


Рис. 1. Доменная структура РНКаз III [11]

sa, низших и высших растений и животных, включая млекопитающих, в том числе и человека [3, 4].

Молекула Dicer (*pus. 1*) содержит дцРНК-связывающий (double-stranded RNA-binding domain, dsRBD) домен, расположенный на С-конце, центральный домен PAZ, который связывается с дцРНК, имеющей два неспаренных нуклеотида на 3'-конце, и N-концевые домены – хеликазный домен DEAD-box и DUF283 (Domain of Unknown Function 283), которые не входят в число необходимых для работы Dicer *in vitro* [7, 8].

Dicer содержит также два РНКазных домена (RNase III domain – RIIID), формирующих внутримолекулярный псевдодимер, в котором оба каталитических сайта расположены близко друг к другу. Каждый домен разрезает одну из цепей дцРНК с образованием дуплексов с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-концах (*pus. 2*) [9–11].

У млекопитающих и *Caenorhabditis elegans* молекулы Dicer одного типа предназначены для процессинга и miРНК, и siРНК; у дрозофилы имеются два типа молекул Dicer: Dicer1 – для miРНК, Dicer2 – для siРНК. В результате работы Dicer образуются дцРНК длиной 21–25 н. (видоспецифический признак) с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-конце, несущие гидроксильные группы на 3'-концах и фосфатные группы на 5'-концах [12].

Следующий этап процесса интерференции – формирование RLC-комплекса (RISC-loading complex) [13]. Этот комплекс состоит из белков Dicer, TRBP (TAR RNA binding protein) и/или PACT и фрагмента дцРНК у человека (у *Drosophila melanogaster* – Dicer1/LOQS и Dicer2/R2D2 для miРНК и siРНК

соответственно). Полагают, что термодинамически более стабильный конец дцРНК (имеющий большую температуру плавления) связывается с TRBP, а другой взаимодействует с Dicer [14]. По-видимому, такое расположение дцРНК в комплексе RLC определяет, какая из двух цепей РНК будет направляющей (комплементарной целевой мРНК), а какая пассажирской (подлежащей разрушению) [15]. RLC переносит дцРНК на белок семейства Argonaute – Ago2 (*pus. 3*) – основной белок комплекса pre-RISC (RISC – RNA-induced silencing complex). Ago2 состоит из трех основных доменов (*pus. 3*): PAZ, служащего сайтом связывания 3'-конца направляющей цепи siРНК; MID – сайта связывания 5'-конца направляющей цепи siРНК, и PIWI, структурно сходного с РНКазой H [16].

Домен PIWI обладает эндонуклеазной активностью [17]. В составе белка Ago он расщепляет фосфодиэфирную связь, расположенную между нуклеотидами пассажирской цепи, комплементарными 10 и 11 основаниям направляющей цепи [10]. После разрушения пассажирской цепи комплекс pre-RISC становится функционально активным комплексом RISC (RISC содержит только антисмысловую направляющую цепь РНК, комплементарную участку мРНК-мишени). Затем происходит расщепление целевой молекулы мРНК (*pus. 4*) на фрагменты длиной 21–23 н. [13]. Описанный выше механизм характерен для siРНК (*pus. 4*). Процессинг miРНК включает несколько дополнительных этапов (*pus. 4A*).

Сначала на гене miРНК с помощью РНК-полимеразы II (или, реже, РНК-полимеразы III) синтезируется протяженный первичный транскрипт –

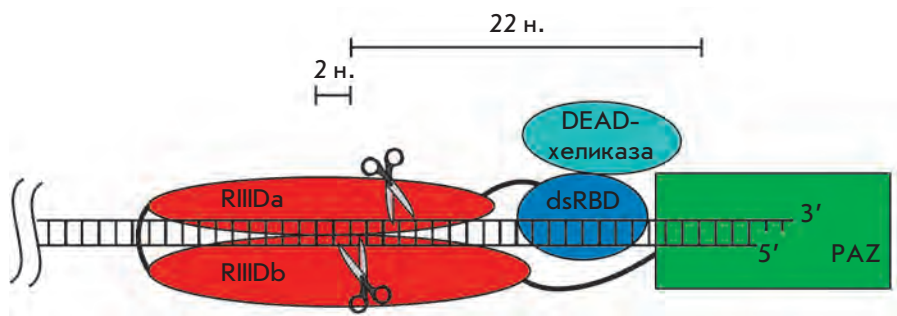


Рис. 2. Модель работы фермента Dicer [11]. Домен PAZ связывается с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-конце дцРНК. Домены RIIIDa и RIIIDb образуют внутримолекулярный псевдодимер. Домен RIIIDa разрезает 3'-концевую цепь дцРНК, а RIIIDb – 5'

pri-miРНК, имеющий шпильчатую структуру типа «петля-стебель» [18, 19]. Гены miРНК, как правило, представляют собой кластеры, которые транскрибируются как единые полицистронные единицы [20]. В то же время гены некоторых miРНК представляют собой самостоятельные транскрипционные единицы [21]. Процессинг pri-miРНК осуществляется в ядре с помощью комплекса, который состоит из двух белков (РНКаза типа III) – Drosha и Pasha (у *D. melanogaster* и *C. elegans*, у млекопитающих аналогом является белок DGCR8) – несущего два дцРНК-связывающих домена (dsRBD – double-stranded RNA-binding domain). Pasha взаимодействует с pri-miРНК, что позволяет ферменту Drosha разрезать стебель шпильки на расстоянии 11 п.н. от его основания. Это приводит к образованию pre-miРНК длиной 60–70 н., которые имеют шпильчатую структуру, а также два выступающих нуклеотида на 3'-конце и 5'-фосфатную группу. У двукрылых, червей и млекопитающих некоторые pre-miРНК образуются без участия фермента Drosha (DGCR8).

Дальнейшее развитие событий зависит от степени гомологии между miРНК и мРНК-мишенью. Для большинства изученных miРНК животных не характерно полное соответствие последовательности нуклеотидов мРНК-мишени [3, 4]. Тем не менее некоторые miРНК двукрылых и млекопитающих полностью комплементарны своим мРНК-мишеням, что обуславливает непосредственное расщепление мРНК эндонуклеазами [22]. Большинство miРНК комплементарны своим мишеням только по небольшому участку 5'-концевой области miРНК, называемой «seed». Область «seed» является одним из факторов, определяющих специфичность выбора мишени. Небольшой размер «seed» позволяет предположить, что одна miРНК может регулировать экспрессию сотни различных генов [23, 24].

ПРОБЛЕМЫ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОСТАВКИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

Использование siРНК в терапевтической практике имеет существенные ограничения: чувствительность к нуклеазам сыворотки крови [25], возможность неспецифического связывания, действия siРНК по механизму miРНК, что приводит к подавлению экспрессии отличных от мишени генов, мРНК которых частично комплементарна области «seed» [26], и активации врожденного иммунного ответа [27].

Для достижения терапевтического эффекта при системной доставке молекулы малых интерферирующих РНК должны находиться в активной форме во время циркуляции в кровотоке, а также избегать фильтрации почками, поглощения фагоцитами, образования агрегатов с белками сыворотки крови и деградации нуклеазами. Кроме того, для проникновения в ткани siРНК должны пройти через эндотелиальный барьер. Этот барьер задерживает молекулы размером более 5 нм. Однако сосуды печени и селезенки пропускают молекулы размером до 200 нм в диаметре, а сосуды опухолей – вещества с молекулярной массой более 40 кДа. Это явление известно как усиленный эффект проникновения и удержания (enhanced permeation and retention effect – EPR) [28].

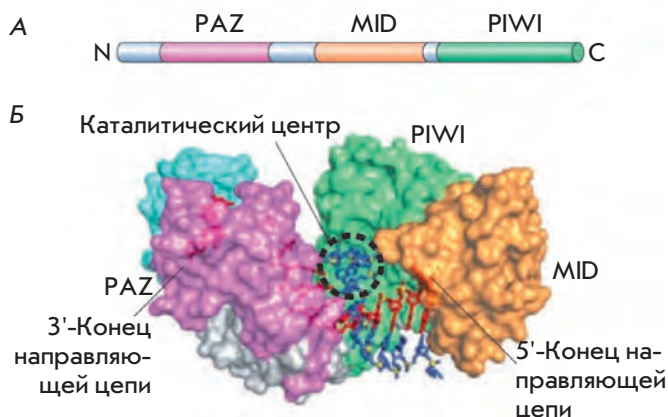


Рис. 3. Структура белков семейства Argonaute. А – Белки семейства Argonaute содержат три домена: PAZ, MID и PIWI. Б – Расположение направляющей цепи siРНК в белке Argonaute [10, 13]

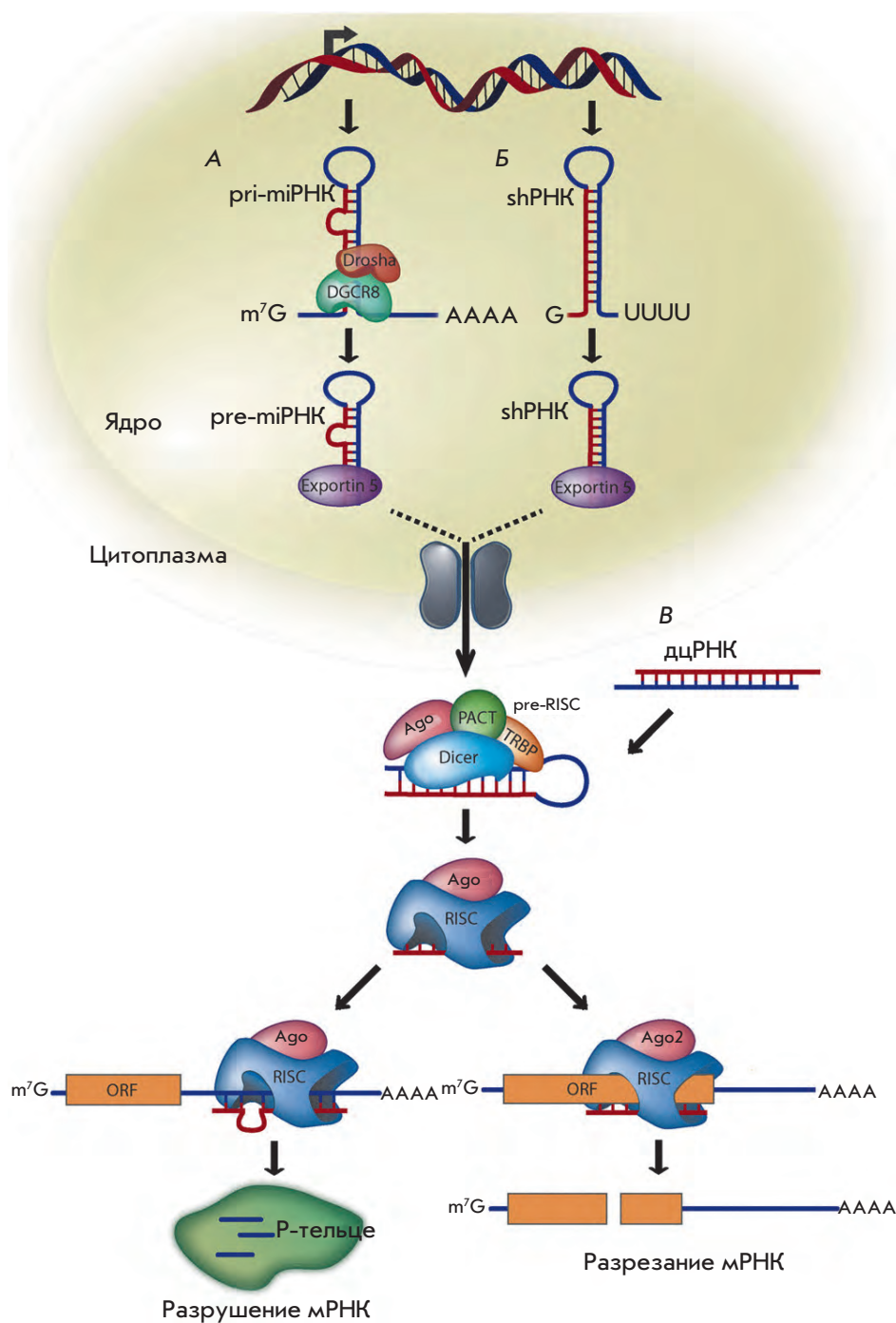


Рис. 4. Механизм посттранскрипционной регуляции экспрессии генов для miРНК, shРНК и siРНК у млекопитающих. А – Вначале на гене miРНК синтезируется протяженный первичный транскрипт pri-miРНК, который процессируется до прекурсора miРНК – pre-miРНК с помощью фермента Drosha (DGCR8). дцРНК-связывающий белок Exportin 5 транспортирует pre-miРНК в цитоплазму, где при участии комплекса Dicer/TRBP происходит образование дуплексов miРНК длиной 22 п.н. Несовершенные дуплексы miРНК взаимодействуют с белком Ago и загружаются в комплекс RISC, где происходит разрушение пассажирской цепи. Подавление экспрессии гена осуществляется либо путем ингибирования инициации трансляции, либо за счет транспорта зрелого комплекса RISC в Р-тельца, где происходит деаденилирование и расщепление целевой мРНК. Б – Как и miРНК, shРНК транскрибируется с ДНК. Для shРНК характерен аналогичный процессинг. Так как последовательность shРНК полностью комплементарна последовательности мРНК-мишени, далее происходит Ago2-опосредованное расщепление целевой мРНК. В – В отличие от shРНК, siРНК искусственно вводит в цитоплазму. Стадии процессинга siРНК и shРНК после взаимодействия молекул с Dicer/TRBP совпадают [2]

После того как молекулы siРНК покидают кровоток, они должны пройти через внеклеточный матрикс, сеть структурных белков и полисахаридов, окружающую клетки-мишени. Внеклеточный матрикс может значительно затруднить поглощение siРНК клетками, повышая тем самым вероятность их фагоцитоза и расщепления [29].

Плазматическая мембрана является основным барьером для проникновения siРНК в клетку. Ги-

дрофильная природа, высокая молекулярная масса, а также суммарный отрицательный заряд молекул siРНК обуславливают низкую эффективность их поглощения. Существует несколько путей решения данной проблемы. Например, соединение молекул siРНК с катионными липидами и полимерами приводит к нейтрализации отрицательного заряда siРНК и образованию положительно заряженных комплексов [30].

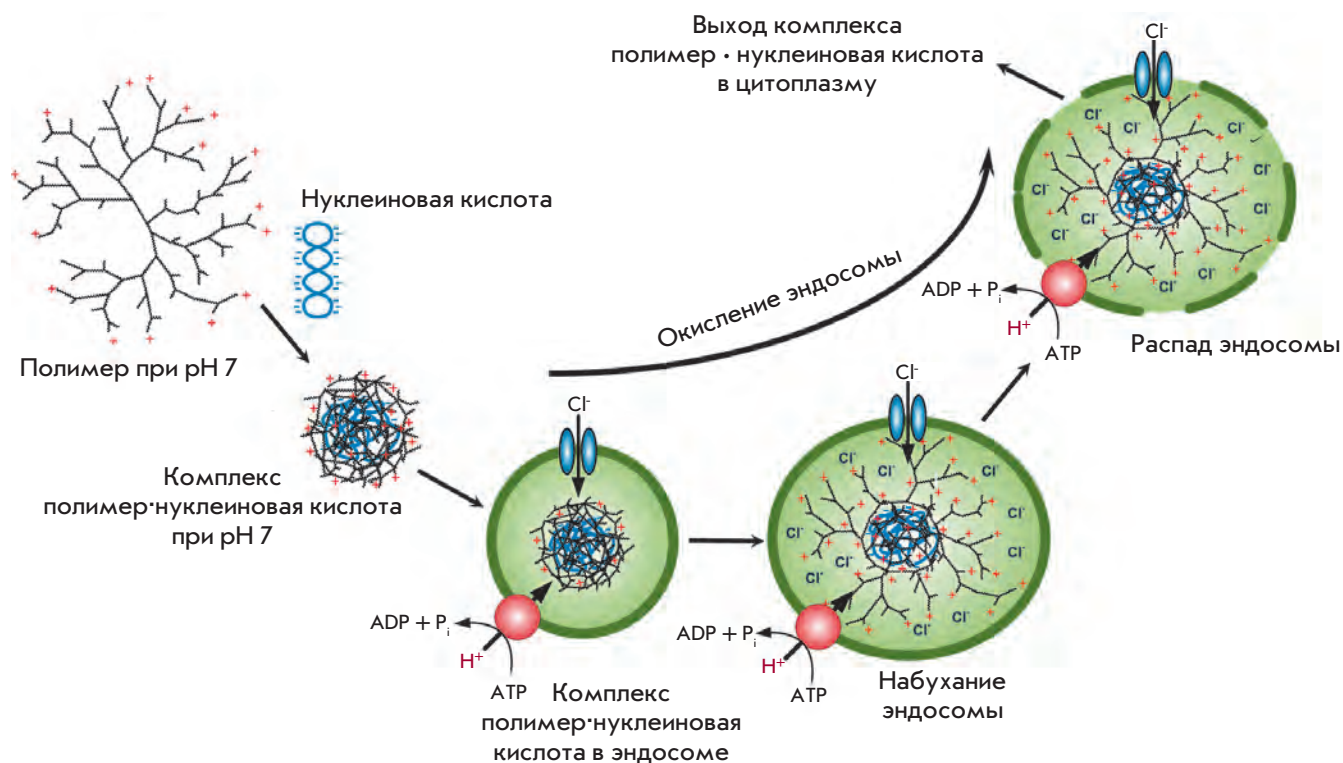


Рис. 5. Схематическая иллюстрация гипотез протонной губки и эффекта зонтика [40]. Положительно заряженный полимер формирует комплекс с отрицательно заряженной нуклеиновой кислотой. При низких значениях pH в эндосоме комплекс полимер · нуклеиновая кислота частично разворачивается. Из-за протонирования концевых аминогрупп и электростатического отталкивания происходит высвобождение терминальных ветвей полимера, и комплекс переходит в развернутое состояние

Показано, что невирусные носители проникают в клетки путем эндоцитоза. Выделяют клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеол-опосредованный эндоцитоз, макропиноцитоз, а также клатрин- и кавеол-независимый эндоцитоз [31]. В отличие от вирусов, синтетические векторы характеризуются невысокой эффективностью трансфекции. Один из способов увеличения поглощения носителей клетками – присоединение специфических лигандов, способствующих рецептор-опосредованному эндоцитозу транспортных молекул. Такие лиганды, как правило, нацелены на рецепторы, опосредующие всасывание питательных веществ: рецепторы трансферрина, фолиевой кислоты и липопротеинов низкой плотности [32, 33].

После проникновения в клетку молекулы siРНК обнаруживаются в составе ранних эндосом. Благодаря работе вакуолярной H⁺-АТФ-азы происходит закисление среды ранних эндосом (снижение pH до 5–6), в результате чего они преобразуются в поздние эндосомы. Затем происходит слияние поздних эндосом с лизосомами, которые имеют еще более

низкие значения pH (около 4.5) и содержат нуклеазы, расщепляющие siРНК. Чтобы избежать деградации в лизосомах, молекулы siРНК (в несвязанной форме или в комплексе с носителем) должны выйти из эндосомы в цитозоль. Выход из эндосомы является основным лимитирующим этапом процесса РНК-интерференции [34, 35].

Эффективная доставка siРНК с помощью различных катионных полимеров обусловлена большой буферной емкостью этих соединений (за счет непротонированных вторичных и третичных аминов) в диапазоне pH от 5 до 7. Предполагают, что такие полимеры предотвращают закисление среды эндосомы, выступая в качестве протонных губок (рис. 5). При этом происходит увеличение притока протонов за счет активации вакуолярной H⁺-АТФ-азы, сопровождаемое накоплением анионов хлора Cl⁻, а также повышение осмотического давления. Это приводит к осмотическому набуханию и распаду эндосомы [36–38].

Также предложена гипотеза об эффекте зонтика (рис. 5), которая описывает способность полимеров

к объемному расширению при pH 5–6. Избыток протонов в эндосомах приводит к протонированию третичных аминов внутренней части полимера. Из-за электростатического отталкивания соседних заряженных аминокрупп концевые ветви полимера разворачиваются, и комплекс переходит из свернутого состояния в разветвленное, если нет стерических ограничений [39, 40].

Выход из эндосом векторов на основе катионных липидов опосредован преимущественно электростатическими взаимодействиями этих молекул с отрицательно заряженными фосфолипидами мембран эндосом, а также способностью липидных структур переходить из ламеллярной фазы (бислоя) в гексагональную. Формирование катион-анионных пар дестабилизирует липидные бислои, в результате чего нуклеиновые кислоты высвобождаются из комплекса [41, 42].

ХИМИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ РНК

Период полужизни немодифицированных siРНК в сыворотке крови не превышает 15 мин, что серьезно препятствует их клиническому применению [25, 43]. Согласно Y. Zou и соавт. [44] в сыворотке крови крысы и человека направляющая цепь в большей степени подвержена действию экзонуклеаз, тогда как пассажирская цепь – эндонуклеаз. Наиболее распространенный метод увеличения стабильности siРНК (устойчивости к действию нуклеаз сыворотки крови) – введение различных химических модификаций [45, 46]. Однако следует учитывать, что это может приводить к исчезновению биологической активности siРНК [45].

Выбор вносимых химических модификаций определяется последовательностью нуклеотидов siРНК, предполагаемой областью ее применения и способом доставки [26]. На сегодняшний день большинство siРНК, используемых в научных, доклинических и клинических исследованиях, представляют собой синтетические РНК-дуплексы длиной 21 п.н., имитирующие структуру природных siРНК. Также в фундаментальных исследованиях и при разработке лекарственных средств используют РНК-дуплексы длиной 19, 25 и 27 п.н. с тупыми концами, а также асимметричные РНК-дуплексы длиной 25/27 или 27/29 п.н. [47, 48].

Выделяют следующие типы химических модификаций siРНК: модификации фосфатного оства молекулы, сахара и оснований [49]. Несмотря на то что существует огромное количество возможных вариантов изменения структуры РНК, наиболее часто применяют следующие модификации (рис. 6): фосфотиоат (PS), 2'-О-метил (2'-ОМе), 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ) и закрытую нуклеиновую

кислоту (locked nucleic acid – LNA) [2, 46, 50]. Модификации фосфатного оства предполагают внесение изменений в фосфодиэфирные связи нуклеотидов в молекуле РНК. Фосфотиоат образуется при замене атома кислорода немостикового фосфата атомом серы. Впервые такая модификация была применена более 25 лет назад, однако ее широко используют и по сей день [51]. PS-модификация придает олигонуклеотидам следующие свойства: повышенную устойчивость к деградации нуклеазами *in vivo*; способность вызывать РНКазу Н-опосредованное расщепление мРНК-мишени; повышенное сродство к белкам плазмы крови, обеспечивающее снижение почечного клиренса и, таким образом, препятствующее быстрому выведению олигонуклеотидов из организма [2, 52]. Внесение фосфотиоата снижает температуру плавления дуплексов siРНК, примерно на 0.5°C на один PS [53]. Следует иметь в виду, что молекулы с PS-модификацией могут неспецифически связываться с белками клеточной мембраны, в результате чего возрастает цитотоксичность siРНК [53]. T. Tuschl и соавт. [53] сообщили о цитотоксичности siРНК, в которых каждый второй нуклеотид содержал PS. Показано, что токсичность может быть снижена за счет уменьшения общего содержания PS, а также при введении данной модификации только в один конец siРНК. Согласно данным Z.Y. Li и соавт. [54] внедрение PS-модификаций в положения 3, 5 и 17 на 5'-конце пассажирской цепи повышает эффективность действия siРНК за счет ускорения загрузки направляющей цепи в комплекс RISC. Непосредственное внесение PS-модификаций в направляющую цепь, напротив, снижает эффективность подавления экспрессии генов с помощью siРНК [53, 54].

Наиболее широко используют модификации по второму положению рибозного кольца (рис. 6): 2'-О-метил, 2'-фтор и 2'-О-метоксиэтил [55, 56]. siРНК, модифицированная таким образом, образует термостабильный дуплекс типа А. Это связано с тем, что предпочтительной конформацией модифицированного сахара является 3'-эндо [2, 56]. 2'-О-метил-РНК обнаружены среди рибосомных и транспортных РНК млекопитающих. Внесение 2'-ОМе увеличивает температуру плавления дуплексов siРНК на 0.5–0.7°C на одну модификацию, а также повышает устойчивость к нуклеазам и усиливает эффективность действия siРНК [53, 56]. 2'-ОМе-модификации рекомендуют вносить в пассажирскую цепь. Введение таких модификаций в направляющую цепь может привести к снижению эффективности РНК-и из-за невозможности связывания направляющей цепи с комплексом RISC [57]. Включение 2'-ОМе совместно с PS увеличивает аффинность направляющей цепи к мРНК-мишени и повышает устойчивость siРНК к воздей-

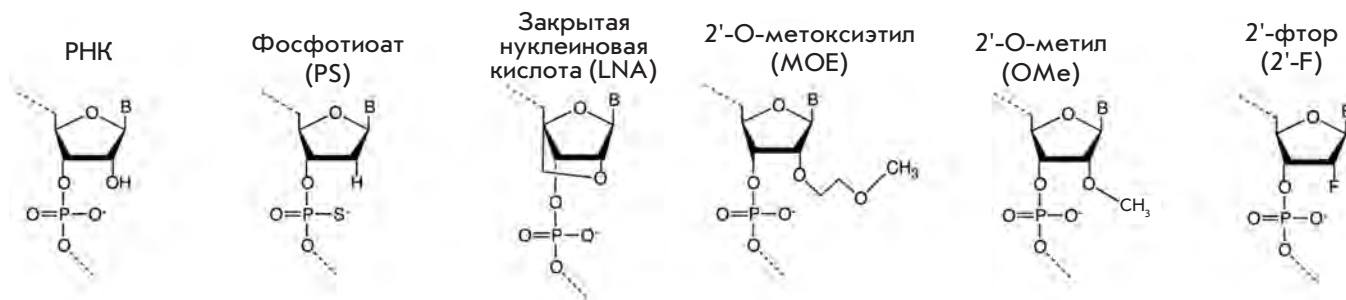


Рис. 6. Химические модификации РНК

ствию нуклеаз, не снижая при этом эффективность РНК-интерференции [56, 57].

Внесение 2'-фтор-модификаций не препятствует функционированию siРНК, а также защищает дуплекс от расщепления нуклеазами. Включение 2'-F в позиции пиримидина поддерживает активность siРНК *in vitro* и *in vivo* [58, 59]. 2'-F-модификация сайта расщепления siРНК белком Ago2 также не влияет на эффективность РНК-и [60]. РНК-дуплексы, содержащие и 2'-F-пиримидины, и 2'-ОМе-пурины, обладают очень высокой стабильностью в сыворотке крови, а также повышенной эффективностью при подавлении экспрессии генов *in vivo* [61]. Показано, что такие siРНК могут действовать в 500 раз эффективнее по сравнению с немодифицированными РНК [59].

Другая важная 2'-С-модификация рибозы – 2'-фтор-β-D-арабинонуклеотид (2'-fluoro-β-D-arabinonucleotide – FANA) [56, 62, 63]. Включение FANA увеличивает температуру плавления РНК-дуплекса примерно на 0.5°C на одну модификацию [64]. FANA отличается от других 2'-С-модификаций, так как содержит арабинозу и структурно похожа на ДНК (в 2'-эндо-конформации). Стереохимия FANA противоположна стереохимии рибозы с фтором во втором положении. Внесение FANA-модификаций в дуплексную РНК неизбежно приводит к искажениям структуры этой молекулы, поэтому такую модификацию нежелательно вводить в направляющую цепь. В то же время эффективность РНК-интерференции значительно повышается в случае FANA-модификаций по всей длине пассажирской цепи и на 3'-конце направляющей цепи [62, 63].

Также часто применяют модификацию рибозы 2'-О-метоксиэтилом (МОЕ). Включение МОЕ приводит к увеличению сродства siРНК к РНК-мишени, повышению устойчивости к действию нуклеаз *in vivo* и уменьшению неспецифического связывания белков, что может свести к минимуму токсические эффекты. Тем не менее эту модификацию нежелательно вносить в направляющую цепь. Это связано

с возникновением стерических ограничений при взаимодействии с боковыми группами Ago2 и, как следствие, невозможностью загрузки направляющей цепи в RISC [55, 65, 66].

Показано, что siРНК, содержащие и 2'-фторпиримидины, и 2'-метоксипурины, обладают чрезвычайно высокой устойчивостью к действию нуклеаз в сыворотке крови человека (время полужизни направляющей цепи составляет до трех дней) [61]. Закрытая нуклеиновая кислота – это модификация, при которой 2'- и 4'-положения кольца рибозы связаны между собой через метиленовый мостик (рис. 6). При этом фуранозное кольцо закрыто в 3'-эндо-конформации, придающей ему структурное сходство с обычным мономером РНК [67]. Жесткость конформации LNA обуславливает более четкую организацию фосфатного остова и усиление как стэкинг-взаимодействий между основаниями, так и гибридизации направляющей цепи с РНК-мишенью. Высокая аффинность LNA-модифицированных siРНК позволяет использовать более короткие последовательности (около 16 н. вместо 20). Включение одной модификации LNA может привести к увеличению температуры плавления РНК-дуплекса на 5–10°C. Большое значение имеет выбор положения для внесения данной модификации. Показано, что присутствие LNA в положениях 10, 12 и 14 направляющей цепи приводит к исчезновению интерферирующей активности siРНК. Это связано со стерическими и конформационными изменениями при включении LNA вблизи сайта расщепления [67, 68]. Наличие LNA на 3'-конце siРНК защищает дуплекс от воздействия 3'-экзонуклеаз сыворотки крови [69]. Тем не менее использование LNA-модифицированных siРНК *in vivo* затруднено из-за их высокой гепатотоксичности [70].

К модифицированным siРНК также относят шпигельмеры. Они представляют собой L-олигорибонуклеотиды – энантиомеры природных D-РНК, которые получили свое название от немецкого слова Spiegel (зеркало). Высокая устойчивость шпигельмеров к действию нуклеаз в сочетании с высокой аф-

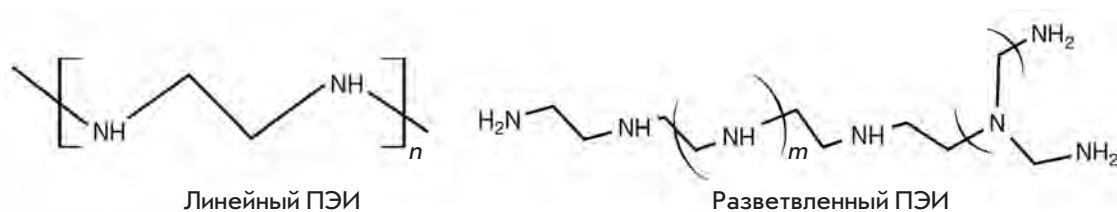


Рис. 7. Полиэтиленимин

финностью этих молекул к РНК-мишени делает их очень перспективными для использования в терапевтических целях [71].

НЕВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

Первые разработки в области доставки олигонуклеотидов в клетки были посвящены созданию синтетических векторов для транспортировки ДНК [72, 73]. Рекомбинантные вирусные векторы показали многообещающие результаты *in vitro*, но после выявления существенных недостатков и осложнений при проведении клинических испытаний большое внимание стали уделять и невирусным системам доставки [73]. В настоящее время для транспортировки интерферирующих РНК применяют следующие виды комплексов и наночастиц (НЧ) диаметром от 1 до 1000 нм: полиплексы, катионные пептиды, липосомы, квантовые точки, углеродные нанотрубки и другие неорганические наночастицы [73].

Полиплексы

Комплексы малых интерферирующих РНК с катионными полимерами называют полиплексами. Такие соединения способны к самоорганизации в результате ионного взаимодействия между повторяющимися положительно заряженными участками полимеров и отрицательно заряженными фосфатными группами siРНК. Основное преимущество полимеров – их структурная гибкость, которая позволяет легко изменять физико-химические характеристики системы доставки. Молекулярная масса, плотность заряда, растворимость и гидрофобность могут быть подобраны в соответствии с условиями исследования. Например, изменение соотношения полимера и siРНК позволяет регулировать степень нейтрализации зарядов комплекса. Для изменения характеристик полимерных молекул и придания им новых свойств можно также добавлять различные химические группы. Как природные, так и синтетические полимеры применяют для создания полиплексных систем доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих [74–76].

Полиэтиленимин (ПЭИ) (рис. 7) считается одним из наиболее эффективных средств доставки олиго-

нуклеотидов из-за своей исключительной способности к эндоцитозу и эндосомолитической активности. Для транспортировки малых интерферирующих РНК чаще используют высокомолекулярный ПЭИ (25 кДа) [77]. Высокая плотность заряда полимера обуславливает прочную связь ПЭИ с siРНК и обеспечивает ее эффективную защиту от ферментативного расщепления. Однако высокая цитотоксичность и ограниченная биodeградация этого полимера создают препятствия для его клинического применения [78, 79]. Низкомолекулярный ПЭИ (< 2 кДа) менее токсичен, но при этом и менее эффективно доставляет siРНК. Считают, что ПЭИ и другие катионные полимеры увеличивают проницаемость мембраны клетки путем создания в ней короткоживущих nanoотверстий [77, 80]. Полагают также, что дестабилизирующее действие на мембраны может быть причиной цитотоксичности [80]. Другой фактор, влияющий на эффективность действия и токсичность ПЭИ, – степень разветвленности структуры полимера [60]. Разветвленный полиэтиленимин содержит первичные, вторичные и третичные амины в соотношении 1 : 2 : 1, тогда как линейный полимер состоит только из вторичных аминов, за исключением концевых первичных аминов (рис. 7) [81]. Разветвленный ПЭИ превосходит линейный по эффективности доставки нуклеиновых кислот [81].

В качестве транспортеров siРНК и других олигонуклеотидов широко применяют комплексы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (poly(lactic-co-glycolic acid) – PLGA). К их преимуществам относят малый размер, низкую цитотоксичность и способность к длительной циркуляции в кровотоке [82]. Комплексы PLGA-siРНК получают двумя способами: (1) путем включения siРНК в ядро комплекса и (2) путем адсорбции siРНК на поверхности модифицированных катионных наночастиц PLGA с помощью электростатических взаимодействий. PLGA защищает siРНК от действия нуклеаз сыворотки крови, а также обеспечивает пролонгированное высвобождение транспортируемого вещества [83, 84].

PLGA использовали для доставки siРНК, направленной против мРНК гена *TNF α* (фактор некроза опухоли α), с целью подавления воспалительных

реакций. В клетках линии J774.1 (макрофаги мыши) наблюдалось снижение уровня мРНК и белка $TNF\alpha$ – на 50 и 40% по сравнению с контролем соответственно. Эффективность действия анти- $TNF\alpha$ -siРНК была изучена *in vivo* на мышинной модели коллаген-индуцированного артрита. В результате инъекций комплексов PLGA-анти- $TNF\alpha$ -siРНК в пораженные коленные суставы наблюдалось локальное снижение экспрессии $TNF\alpha$, а также заметное уменьшение проявлений воспаления синовиальной сумки (по данным гистологического исследования). Важно отметить, что после введения этих комплексов в полость сустава значительное количество siРНК обнаруживалось в синовиальной оболочке, где в основном и находятся клетки, вырабатывающие $TNF\alpha$. Ингибиторный эффект отмечали в течение 11 дней после инъекции siРНК, поскольку PLGA обладает свойством замедленного высвобождения переносимого вещества [85].

J. Steinbach и соавт. успешно применили PLGA для доставки siРНК, направленных против мРНК генов нектин-1 и *UL29.2*, играющих ключевую роль в развитии герпесвирусной инфекции типа 2. Как *in vitro*, так и *in vivo* (на мышинной модели) было достигнуто существенное подавление экспрессии целевых генов. Также установлено, что наночастицы PLGA обладают низкой цитотоксичностью. В этой работе показана возможность применения комплексов PLGA-siРНК при инфицировании вирусом простого герпеса типа 2 [86].

Дендримеры, также применяемые для доставки терапевтических олигонуклеотидов, представляют собой сильно разветвленные полимерные молекулы размером 1–5 нм. Ветви дендримера симметрично расположены вокруг центральной части молекулы. Дендримеры состоят из трех архитектурных доменов (рис. 8): внутренней области – ядра, соединенных с ним дендронов и поверхности с большим количеством реакционноспособных участков [87, 88]. Дендримерные молекулы обладают свойствами монодисперсности и гидрофильности [89, 90]. Возможность функционализации дендримеров, изменения их растворимости, прикрепления флуоресцентных зондов позволяет использовать данные молекулы для доставки различных терапевтических агентов, в том числе малых интерферирующих РНК в клетки-мишени [91]. Переносимое вещество может быть соединено с периферическими группами дендримеров либо через ковалентную связь, либо путем ионных взаимодействий. Транспортируемые терапевтические средства могут быть инкапсулированы внутри дендримерных частиц, формируя таким образом мономолекулярные мицеллы [89]. Конъюгаты, образованные дендримерами и переносимыми веществами, более устойчивы, чем липосомы [91]. Силь-

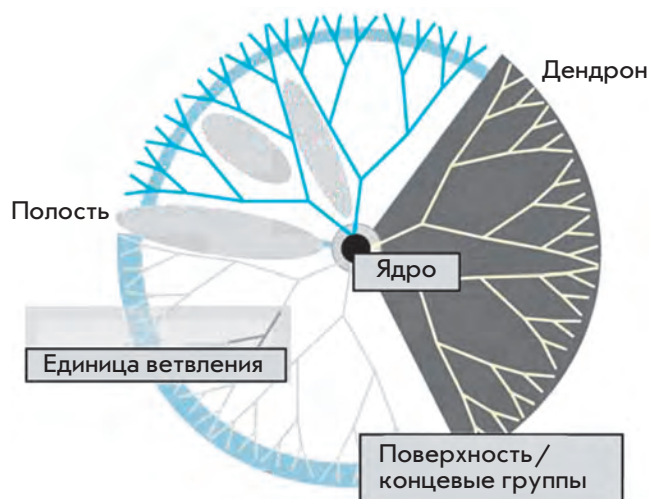


Рис. 8. Схема строения дендримера [89]

но разветвленные полимеры, разработанные еще в 1980-х годах, такие, как дендримерные молекулы полиамидамина (РАМАМ), полипропиленimina (PPI), поли(L-лизина) (PLL) и карбонсилана (carbon-silane), в настоящее время используют для доставки siРНК [92].

РАМАМ-полимеры для доставки siРНК коммерчески доступны (Polyfect и Superfect) [93]. РАМАМ был успешно применен для доставки siРНК в нейроны *in vitro* и *in vivo* (внутричерепные инъекции кроликам), продемонстрировав при этом минимальную токсичность [94].

Y. Tang и соавт. изучали эффективность доставки анти-GFP-siРНК (GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок) с помощью наночастиц на основе ПЭГирированного (ассоциированного с полиэтиленгликолем) РАМАМ *in vitro* и *in vivo*. Отмечено значительное снижение уровня экспрессии GFP под действием анти-GFP-siРНК в клетках линий НЕК293 (фибробласты почки эмбриона человека) и Cos7 (фибробласты почки зеленой мартышки). Эффективность трансфекции наночастиц РАМАМ-siРНК была сравнима с эффективностью Lipofectamine 2000 (Invitrogen). При внутримышечном введении этих комплексов GFP-трансгенным мышам также наблюдали снижение уровня экспрессии мРНК зеленого флуоресцентного белка. Показано, что наночастицы РАМАМ надежно защищают siРНК от действия нуклеаз сыворотки крови [95].

Полипропиленимин (PPI) был специально разработан на основе ПЭИ для доставки siРНК. O. Taratula и соавт. изучали эффективность доставки siРНК, направленной против мРНК гена *bcl-2*, с помощью

комплексов на основе полипропиленimina. Наночастицы PPI были покрыты полиэтиленгликолем (ПЭГ) для придания им большей стабильности; дистальный конец ПЭГ был соединен с синтетическим аналогом рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона с целью обеспечения адресной доставки siРНК в опухолевые клетки. *In vitro* наблюдали значительное снижение уровня экспрессии целевого гена в клетках линий A2780 (рак яичников человека) и A549 (рак легкого человека). В результате исследования *in vivo* выявлено замедление роста ксенотрансплантатов из клеточной линии A549 у мышей nude с иммунодефицитом. При этом комплексы PPI-siРНК локализовались преимущественно в ткани опухоли, а концентрация нановектора с siРНК в печени и почках была минимальной. Установлено, что наночастицы на основе PPI обладают умеренной цитотоксичностью, однако предполагается, что снижение выживаемости клеток (примерно на 20%) можно объяснить подавлением экспрессии гена *bcl-2*, который играет важную роль в регуляции пролиферации клеток [96].

Природный полисахарид хитозан, используемый для доставки siРНК и состоящий из мономеров глюкозамина и N-ацетилглюкозамина (рис. 9), получают из хитина путем деацетилирования [97, 98]. Хитозан легко расщепляется лизоцимами и хитиназами *in vivo* [97]. Этот полимер практически нетоксичен для млекопитающих [99]. Как правило, размер комплексов хитозан-siРНК не превышает 200 нм, что является преимуществом при доставке *in vivo* [97, 98]. Несмотря на относительную безопасность и биосовместимость хитозана, на данный момент проведено лишь несколько испытаний *in vivo*, возможно, из-за ограниченной эффективности полимера при транспортировке siРНК. Принято считать, что первыми для доставки siРНК *in vitro* хитозан использовали Н. Katas и Н.О. Alpar [100]. Оказалось, что способ формирования комплексов хитозана с siРНК оказывает большое влияние на эффективность подавления экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Показано также, что наночастицы хитозантриполифосфата, содержащие siРНК, обладают рядом преимуществ перед комплексами хитозана с siРНК: они имеют более высокую связывающую способность и коэффициент заполнения [100].

К.А. Howard и соавт. разработали систему доставки siРНК на основе хитозана, применимую как *in vitro*, так и *in vivo*. В результате было достигнуто подавление эктопической экспрессии *EGFP* (*EGFP* – enhanced green fluorescent protein, усиленный зеленый флуоресцентный белок) в клетках линии H1299 (клетки немелкоклеточного рака легкого человека) и в перитонеальных макрофагах мыши (снижение уровня флуоресценции *EGFP* на 77.9 и 89.3% соот-

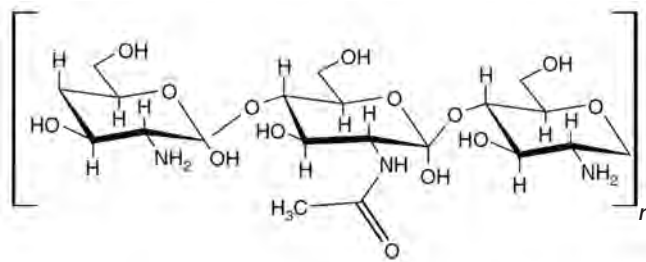


Рис. 9. Хитозан

ветственно). Показано также, что хитозан может применяться для доставки анти-*EGFP*-siРНК в эпителиальные клетки бронхиол *EGFP*-трансгенных мышей путем интраназального введения. Снижение экспрессии *EGFP* составило 37 и 43% по сравнению с мисматч- и отрицательным контролем соответственно. Эти данные подтверждают принципиальную возможность использования хитозана в качестве транспортного агента siРНК при поражениях слизистых оболочек [101].

Е.Ж. Nielsen и соавт. [102] разработали систему доставки анти-*EGFP*-siРНК в легочный эпителий с использованием наночастиц хитозана в виде аэрозоля. Трансфекция таких комплексов в клетки линии H1299 приводила к снижению уровня флуоресценции *EGFP* на 62%. После внутритрахеального введения аэрозоля наночастиц *EGFP*-трансгенным мышам наблюдалось снижение флуоресценции *EGFP* на 68% по сравнению с мисматч-контролем. При этом комплексы хитозан-siРНК локализовались в клетках и альвеол, и бронхиол, а также равномерно распределялись по всему объему легких. К.А. Howard и соавт. [103] показали, что внутривнутрибрюшинное введение комплексов анти-TNF α -siРНК-хитозан мышам с коллаген-индуцированным артритом приводит к снижению на 44% экспрессии целевого гена в перитонеальных макрофагах и торможению локальных и общих воспалительных реакций. Таким образом, наночастицы на основе хитозана могут быть использованы в качестве транспортеров терапевтических средств при системных заболеваниях.

ПЭГилирование хитозана повышает стабильность комплексов с siРНК, а также увеличивает время полужизни наночастиц в сыворотке крови [104]. В работе D.W. Lee и соавт. наночастицы хитозана заданного размера получали методом коацервации в присутствии полигулороната. Диаметр комплексов варьировал от 110 до 430 нм в зависимости от соотношения хитозана и siРНК. Такие наночастицы показали высокую эффективность при доставке siРНК в клетки линий HEK293 (фибробласты почки эмбриона че-

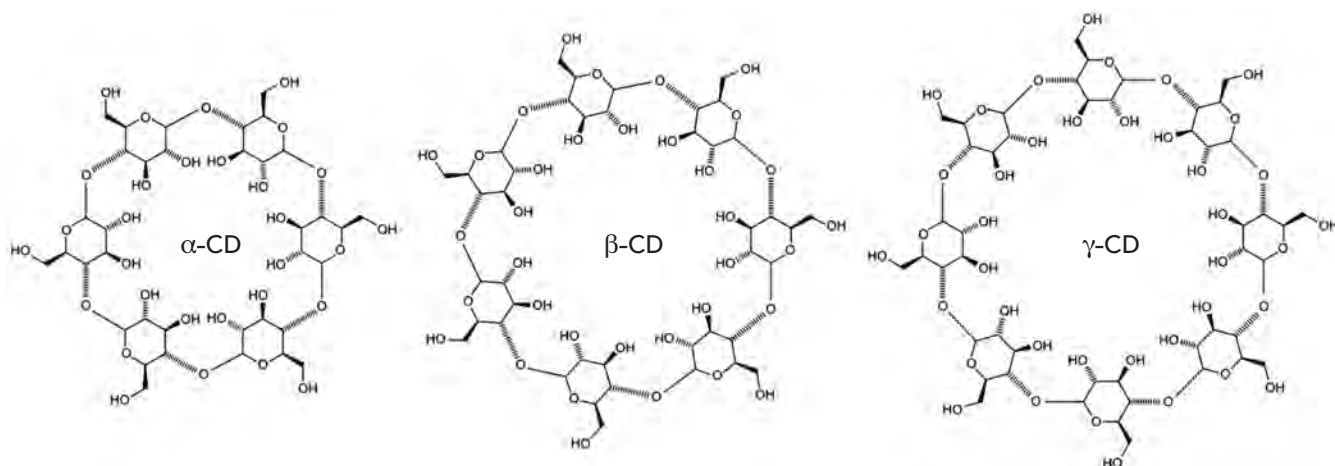


Рис. 10. Химическая структура циклодекстринов. Выделяют три типа циклодекстринов: α-циклодекстрин (α-CD), β-циклодекстрин (β-CD) и γ-циклодекстрин (γ-CD). α-, β- и γ-циклодекстрины состоят из шести, семи и восьми глюкопиранозных звеньев соответственно

ловека) и HeLa (клетки рака шейки матки), а также низкую цитотоксичность [105].

А.М. Ji и соавт. описали комплексы хитозан-siРНК как нерегулярные, положительно заряженные ламеллярные и разветвленные структуры с гидродинамическим радиусом около 148 нм. Такие наночастицы использовали для доставки siРНК, направленной против мРНК гена, кодирующего белок FHL2 (four and a half LIM-domain protein), в клетки линии Lovo (клетки рака толстого кишечника). Повышенная экспрессия этого онкогена отмечена в различных типах раковых клеток (рак эпителия яичников, гепатобластома, аденокарцинома толстого кишечника, некоторые виды рака молочной железы и линия клеток HeLa). Наблюдалось снижение экспрессии гена *FHL2* на 70%, что сопоставимо с результатами, полученными после трансфекции siРНК с помощью Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) [106].

Хитозан использовали также в качестве «оболочки» для повышения эффективности других систем доставки. Покрытые хитозаном частицы полиизогексилцианоакрилата применили для транспортировки анти-RhoA-siРНК в клетки ксенотрансплантатов рака молочной железы у мышей nude. Гиперэкспрессия гена *RhoA* (Ras homolog gene family, member A) ассоциирована с плохим прогнозом у онкологических больных, так как обуславливает ускорение пролиферации опухолевых клеток и ангиогенеза, а также инвазивный тип роста опухоли. Анти-RhoA-siРНК вводили мышам nude каждые 3 дня в дозах 150 или 1500 мкг/кг массы тела. В результате при введении этой siРНК в дозе 150 мкг/кг рост опухоли тормозился более чем на 90%. Введение 1500 мкг/кг

приводило к частичному некрозу опухоли за счет подавления ангиогенеза. При этом комплексы не оказывали токсического действия [107].

Циклодекстрины также применяют для доставки siРНК. Они представляют собой циклические (α-1,4)-связанные олигосахариды β-D-глюкопиранозы. Молекулы циклодекстрина имеют тороидную форму. Они состоят из гидрофобной центральной полости и гидрофильной наружной поверхности (рис. 10) [108, 109]. Циклодекстрины защищают siРНК от деградации нуклеазами сыворотки крови и снижают иммуногенность siРНК *in vivo*, даже при наличии иммуностимулирующих последовательностей в составе siРНК [109]. Несмотря на то что природные siРНК не обладают иммуногенностью, доставка двухцепочечных siРНК и одноцепочечных РНК с помощью липосом может активировать иммунную систему млекопитающих. При этом происходит активация Toll-подобных рецепторов (TLR7, TLR8 и TLR9) в периферических мононуклеарах, моноцитах, плазматоидных дендритных клетках и CD34⁺-клетках-предшественниках. Возможными причинами отсутствия иммунного ответа при использовании циклодекстринов в качестве транспортеров siРНК считаются антиоксидантная активность данной системы доставки (показано, что ингибиторы окисления эндосом способны блокировать развитие иммунного ответа) и отсутствие поглощения наночастиц иммунокомпетентными клетками [109].

S. Hu-Lieskovan и соавт. [110] показали, что использование комплексных частиц, образованных циклодекстрином, анти-EWS-FLI1-siРНК и трансферрином, который является лигандом для адресной

доставки, значительно снижает экспрессию целевого онкогена в клетках саркомы Юинга, экспрессирующих рецептор трансферрина.

В настоящее время на больных с солидными опухолями проходит первая фаза клинических испытаний siРНК, направленной против мРНК гена *RRM2* (Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2) [111]. *RRM2* кодирует малую субъединицу фермента рибонуклеотидредуктазы, который катализирует превращение рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды. Показано, что ингибиторы рибонуклеотидредуктазы обладают химиотерапевтическим противоопухолевым эффектом. Это связывают с тем, что репаративные возможности клетки зависят от концентрации дезоксирибонуклеотидов [112]. В качестве системы доставки анти-*RRM2*-siРНК используют наночастицы на основе циклодекстринов. В биопсийном материале больных меланомой, получавших анти-*RRM2*-siРНК, опухолевые клетки содержали большое количество наночастиц. Наблюдалось существенное снижение уровня экспрессии мРНК и белка *RRM2* по сравнению с показателями до начала терапии [111].

Липидные системы доставки

Липосомы представляют собой высокоорганизованные липидные агрегаты (рис. 11). Они образованы одним или несколькими концентрическими замкнутыми

бибислоями фосфолипидов, имеющих гидрофобные головки и гидрофильные хвосты, ограничивающими внутреннюю водную фазу. Липосомы успешно применяют для доставки водорастворимых веществ, помещенных в их гидрофильное ядро [113, 114].

Широкое применение липосом для доставки siРНК связано с их оптимальным размером (около 100 нм), хорошей биосовместимостью, а также простотой получения и использования [115]. Например, нейтральный липид 1,2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DOPC) может инкапсулировать до 65% siРНК в результате смешивания растворов двух компонентов. Также липосомы получают из диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE) (рис. 12), 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) (рис. 12), фосфатидилхолина (PC) и других нейтральных липидов [116].

Липосомы стали первыми наночастицами, одобренными для клинического применения. Эти наночастицы представляли собой ПЭГилированные липосомные комплексы доxorубина (doxorubicin). После введения больным саркомой Капоши доxorубина в составе липосом 1 раз в 3 недели у 19 из 53 человек зафиксирован частичный ответ, а у одного – полный ответ. При этом отмечено увеличение времени циркуляции доxorубина в кровотоке, а также снижение его кардиотоксичности [117, 118].

Недавно доxorубин в составе липосом прошел клинические испытания (фаза II) в сочетании с до-

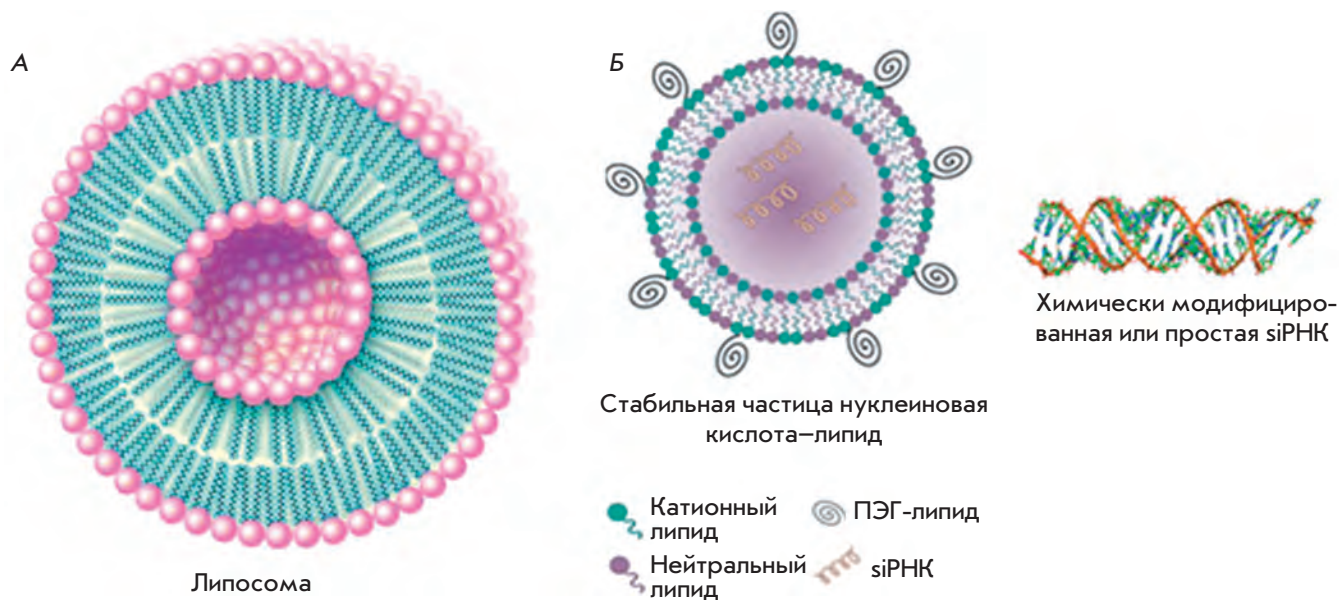


Рис. 11. Комплексы для доставки siРНК на основе липидов. А – Схема строения липосомы (Encyclopædia Britannica, Inc.). Б – Схема строения стабильной частицы нуклеиновая кислота–липид (stable nucleic acid lipid particle – SNALP) [117]

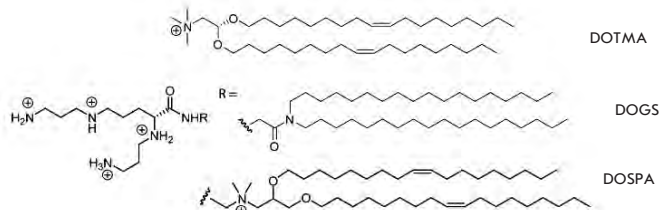
цетакселом (docetaxel) и трастузумабом (trastuzumab). В этом исследовании принял участие 31 больной с метастазирующим *HER2*-положительным раком молочной железы. При использовании этих препаратов кардиотоксичность и общие побочные эффекты были минимальными. Отмечено также улучшение прогноза у больных метастазирующим раком молочной железы [119].

C.N. Landen и соавт. [120] сообщили о снижении экспрессии *EphA2* (ген рецептора тирозинкиназы, ассоциированный с плохим прогнозом при раке яичников) у мышей *nude* при использовании DOPC-липосом в качестве системы доставки. DOPC-липосомы применяли и для подавления экспрессии гена рецептора PAR-1 (Protease-activated receptor) с целью прекращения роста и метастазирования меланомы в результате снижения ангиогенеза. DOPE-липосомы были использованы для доставки siРНК, направленной против *Ubc13* [116, 120].

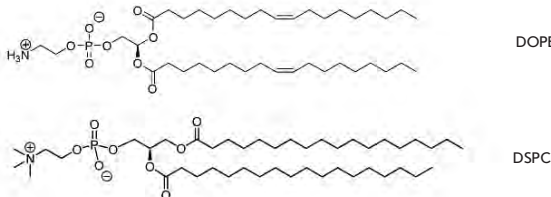
S.H. Kang и соавт. разработали липосомы, содержащие siРНК, направленную против мРНК *Mcl1*, и ингибитор протеинкиназы MEK – PD0325901. Сигнальный путь Raf/MEK/ERK, в котором участвует киназа MEK, играет важную роль в регуляции пролиферации клеток; нарушения этого пути выявлены при нескольких типах рака. Продукт гена *Mcl1* (myeloid cell leukemia sequence 1) относится к семейству белков Bcl-2, регулирующих апоптоз. Введение в опухолевые клетки анти-*Mcl1*-siРНК повышает их чувствительность к химиотерапевтическим средствам, индуцирующим апоптоз. Противоопухолевую активность наночастиц изучали *in vitro* и *in vivo*. Комплексы катионных липосом на основе N',N''-диолеилглутамида с ингибитором PD0325901 и анти-*Mcl1*-siРНК добавляли к клеткам линии KB (клетки эпидермальной карциномы носоглотки человека). Согласно данным вестерн-блоттинга количество белков *Mcl1* и pERK1/2 существенно снизилось по сравнению с контролем, как и выживаемость опухолевых клеток. Эти наночастицы вводили также мышам BALB/c с ксенотрансплантатами из клеток линии KB каждые 2 дня в дозе 0.7 мг/кг анти-*Mcl1*-siРНК и 0.72 мг/кг ингибитора PD0325901. Показано существенное уменьшение размера опухоли (на 79% по сравнению с контрольной группой); данные вестерн-блоттинга были сопоставимы с результатами, полученными в опытах *in vitro* [121].

Комплексы катионных липидов (рис. 12) и нуклеиновых кислот называют липоплексами. Основное преимущество катионных липидов – пассивное взаимодействие с отрицательно заряженными siРНК и плазматической мембраной клетки, что значительно облегчает процесс интернализации. Тем не менее катионные липосомы более токсичны, чем

Катионные липиды



Нейтральные липиды



Ионизируемые катионные липиды

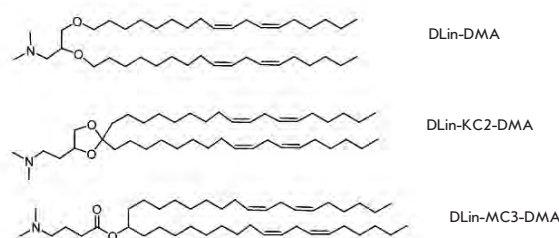


Рис. 12. Катионные, нейтральные и ионизируемые катионные липиды, используемые для доставки siРНК [117]

нейтральные, они характеризуются меньшим временем полужизни в сыворотке крови (отчасти из-за поглощения ретикулоэндотелиальной системой) и повышенной иммуногенностью (из-за поглощения макрофагами) [116].

Липоплексы на основе диметилгидроксиэтиламинопропанкарбамоилхолестерина (DMHAPC-Chol) и диолеилфосфатидилэтаноламина успешно использовали для доставки siРНК, направленной против мРНК фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), в клетки линий A431 (эпидермоидный рак человека) и MDA-MB231 (рак молочной железы человека). Введение комплексов DMHAPC-Chol·DOPE, содержащих анти-VEGF-siРНК, приводило к снижению экспрессии целевого гена более чем на 90%. Такие наночастицы обладали большей эффективностью трансфекции, чем при использовании Lipofectamine 2000 (Invitrogen). При трансфекции плазмиды, содержащей GFP, и анти-GFP-siРНК оказалось, что липоплексы на основе DMHAPC-Chol·DOPE более эффективны для транспортировки siРНК, чем плазмид [122].

К. Un и соавт. предложили использовать липopleксы, ассоциированные с маннозой и чувствительные к ультразвуковому воздействию [123–125], для селективной доставки малых интерферирующих РНК в клетки печени. Подобный метод доставки siРНК сочетает в себе преимущества липофекции и сонопорации: значительное количество переносимых нуклеиновых кислот может проникать непосредственно в цитоплазму благодаря образованию пор в клеточной мембране под действием ультразвука. В данной работе были использованы siРНК, направленные против мРНК гена белка внутриклеточной адгезии *ICAM-1*, экспрессия которого повышена в эндотелиальных клетках печени на ранних стадиях развития гепатита. Экспрессия *ICAM-1* существенно снижена как *in vitro* на эндотелиальных клетках печени, так и *in vivo* на мышинных моделях воспаления печени, индуцированного липополисахаридами, диметилнитрозамином, четыреххлористым углеродом, ишемией-реперфузией. Кроме того, *in vivo* отмечали противовоспалительный эффект, индуцированный этой siРНК. Предложенный способ доставки siРНК считается перспективным для терапии заболеваний печени [126].

Стабильные частицы нуклеиновая кислота-липид (stable nucleic acid lipid particles – SNALP) сравнительно недавно были разработаны Tekmira Pharmaceuticals Corporation. SNALP представляют собой полимерные наночастицы размером около 100 нм, состоящие из ионизируемых катионных липидов, таких, как DLin-DMA (1,2-дидолеилокси-3-диметиламинопропан), DLin-KC2-DMA (2,2-дидолеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксалан) и холестерин, липидов с высокой температурой фазового перехода (1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин – DSPC) и ПЕГилированных липидов. Сложноорганизованные SNALP характеризуются пролонгированным временем циркуляции в кровотоке и большими возможностями модификации, что позволяет решать различные задачи при доставке siРНК [116, 127].

D.V. Morrissey и соавт. [61] показали возможность применения SNALP для эффективной системной доставки siРНК на мышинной модели вирусного гепатита В (HBV). Внутривенное введение SNALP, содержащих анти-HBV-siРНК (3 мг/кг) в течение 3 дней подряд приводило к торможению репликации вируса. Этот эффект сохранялся в течение 7 дней после инъекций комплексов SNALP-анти-HBV-siРНК.

T.S. Zimmermann и соавт. успешно использовали SNALP в качестве системы доставки siРНК, направленной против мРНК гена аполипопротеина В (*ApoB*), у яванских макаков. Спустя 48 ч после однократного внутривенного введения 2.5 мг/кг анти-*ApoB*-siРНК,

заключенных в SNALP, уровень мРНК *ApoB* в печени снижается на 80–90% одновременно с уменьшением концентрации холестерина в сыворотке крови на 65%. Такой подход дает быстрый и длительный эффект (до 11 дней после инъекции комплексов SNALP-siРНК) [128].

SNALP успешно использовали для доставки siРНК, направленной против мРНК киназы *PLK1*. Сверхэкспрессия гена *PLK1* играет важную роль в нарушении регуляции пролиферации опухолевых клеток различного гистологического происхождения. Внутривенное введение комплексов SNALP-анти-*PLK1*-siРНК приводило к подавлению роста ортотопических опухолей печени (клетки Нер3В) у мышей. Показано также, что SNALP не обладают иммуногенностью [122].

Пептидные системы доставки

Пептиды также могут служить в качестве эффективных систем доставки интерферирующих РНК [129]. Особый класс катионных пептидов, называемых пептиды, проникающие в клетку (cell-penetrating peptides, CPP), известен в качестве транспортеров различных макромолекул, в том числе интерферирующих РНК, через плазматическую мембрану [130, 131]. Первыми обнаруженными CPP были белки ТАТ ВИЧ-1, INF-1 и INF-7 вируса гриппа [116]. Несмотря на небольшой размер (5–40 аминокислотных остатков), CPP могут переносить вещества, молекулярная масса которых более чем в 100 раз превышает их собственную [132]. Наиболее изученными CPP являются основной белок ТАТ ВИЧ-1 и полиаргинин, поскольку в образовании комплекса с siРНК принимают участие основные аминокислоты – аргинин и лизин [133]. Аргинин содержит гуанидиновую группу на конце бокового радикала, которая связывается с клеточной поверхностью посредством ионных взаимодействий [134]. CPP имеют низкий уровень цитотоксичности в концентрациях, используемых для доставки макромолекул [118, 135].

В настоящее время для использования CPP в качестве транспортера интерферирующих РНК в клетки мишени применяют два подхода [131]. Первый основан на образовании ковалентной связи CPP с siРНК [136]. Ковалентная связь между siРНК и CPP устанавливается через дисульфидную или, реже, тиоэфирную связь, которая разрушается в цитоплазме клетки [137]. Необходимо отметить, что использование этой стратегии может приводить к снижению эффективности действия siРНК из-за неполной диссоциации комплекса CPP-siРНК [131].

Успешное применение CPP пептида и транспортера, ковалентно связанных с siРНК, направленной против мРНК *GFP*, *in vitro* описано А. Muratovska

и соавт. Трансфекция конъюгатов CPP-siРНК в клетки линии СНО (клетки яичника китайского хомяка), экспрессирующие *GFP*, приводила к снижению уровня флуоресценции *GFP* на 53 и 63% соответственно. При использовании Lipofectamine 2000 (Invitrogen) флуоресценция снижалась лишь на 36% [138]. Недавно наночастицы CPP, содержащие пенетратин и ТАТ, прошли испытания *in vivo*. siРНК, направленная против мРНК р38 MAP-киназы (этот белок участвует в развитии различных воспалительных реакций), была ковалентно соединена с одним из следующих носителей: ТАТ, пенетратином или холестеринном. После инкубации комплексов с фибробластами мыши уровень экспрессии р38 MAP-киназы снижался на 20–36%. Однако после внутритрахеального введения этих комплексов мышам не было выявлено существенных изменений экспрессии р38 MAP-киназы. Кроме того, комплексы пенетратин · siРНК вызывали повышение уровня иммунных маркеров TNF α и IL12. Таким образом, можно предположить, что CPP могут активировать иммунный ответ [118, 139].

Другой подход основан на формировании комплексов CPP с siРНК путем электростатических взаимодействий, при которых положительно заряженные CPP связываются с отрицательно заряженными siРНК [140, 141]. В результате образуется очень стабильный комплекс, в котором siРНК надежно защищена от деградации нуклеазами сыворотки крови [131]. Однако при таком подходе существует риск нейтрализации положительного заряда CPP при электростатических взаимодействиях с siРНК и, как следствие, невозможным становится связывание CPP с плазматической мембраной и последующее поглощение комплекса CPP-siРНК [142, 143]. Примером использования «нековалентного» метода образования наночастиц CPP-siРНК может служить работа J. Noyer и соавт. [144]. Они синтезировали разветвленные производные укороченной формы кальцитонина человека и оценили их эффективность в качестве средства доставки siРНК, направленной против мРНК гена рецептора NPY Y₁ человека. Данный рецептор относят к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками, экспрессия которых повышается при различных системных заболеваниях. Так, например, снижение уровня экспрессии гена рецептора NPY Y₁ рассматривается как одно из потенциальных направлений терапии остеопороза. Показано, что CPP эффективно переносят siРНК в клетки линии НЕК293, не проявляя при этом признаков цитотоксичности. Снижение уровня экспрессии целевого гена было сопоставимым с результатами, полученными при липофекции.

L. Johnson и соавт. описали пептид POD (peptide for ocular delivery) – CPP, предназначенный для до-

ставки макромолекул в ткани глаза. POD успешно применили для транспортировки анти-*GFP*-siРНК в культивируемые эмбриональные клетки сетчатки человека, в которых эктопически экспрессируется *GFP*. Экспрессия трансгенного *GFP* снижалась при этом более чем на 50%. Показано также, что POD может эффективно доставлять квантовые точки в ткани глаза *in vitro* и *in vivo* [145].

Неорганические наночастицы, применяемые для доставки siРНК

Неорганические наноматериалы – углеродные нанотрубки, квантовые точки, наночастицы золота и др. – представляют собой альтернативные средства доставки интерферирующих РНК [146–149]. Такие наночастицы отличаются от органических структурой, размерами, физическими и химическими свойствами, также они легко поддаются функционализации. Эти материалы воспроизводят структурные свойства высокомолекулярных полимеров, обладая при этом малой молекулярной массой [150].

Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой линейные протяженные цилиндрические слои графена. Однослойные углеродные нанотрубки состоят из одного слоя графена, а многослойные – из нескольких концентрических однослойных нанотрубок. Диаметр однослойной нанотрубки не превышает 0.4 нм, тогда как у многослойной он может составлять около 100 нм. Длина этих структур, как правило, варьирует от сотен нанометров до нескольких десятков микрометров. Уникальной особенностью углеродных нанотрубок является графеновый слой, который может быть легко модифицирован различными биомолекулами. Формирование комплексов УНТ siРНК возможно путем образования ковалентной или нековалентной связи. Углеродные нанотрубки нетоксичны для клеток млекопитающих, так как могут проходить через клеточную мембрану эндоцитоз-независимым способом, не нарушая при этом ее целостности [146, 151].

I.V. Neagoe и соавт. сравнили эффективность однослойных УНТ и коммерческого трансфекционного агента siPORT NeoFX фирмы Ambion для доставки siРНК, направленных против мРНК генов *TNF* и *VEGF*, *in vitro*. Уровень экспрессии (в процентах от исходного) составил 53.7% для *VEGF* и 56.7% для *TNF α* при использовании siPORT NeoFX, и 47.7 и 46.5% при использовании однослойных УНТ соответственно [152].

X. Wang и соавт. показали, что УНТ, модифицированные аммонием, могут связывать siРНК, направленную против мРНК циклина A2, путем электростатических взаимодействий. Введение комплексов УНТ-антициклин A2-siРНК в клетки линии K526

(эритролейкоз человека) приводило к торможению роста и гибели клеток [153].

Квантовые точки (КТ) представляют собой коллоидные наночастицы полупроводников [147]. Как правило, КТ используют в качестве флуоресцентных зондов из-за отличительных физико-химических свойств, которые позволяют им преодолевать ограничения флуоресцентных белков и органических красителей. Эти наночастицы имеют широкую полосу возбуждения, что позволяет возбуждать нанокристаллы разных цветов одним источником излучения, и узкие симметричные пики флуоресценции. Также КТ обладают высокой фотостабильностью [154]. Они могут использоваться в качестве эффективных средств доставки терапевтических олигонуклеотидов. Например, КТ успешно применили для одновременной визуализации и доставки малых интерферирующих РНК с целью избирательного подавления экспрессии гена рецептора эпидермального фактора роста III в клетках линии U87 (клетки глиобластомы человека) [155].

Основное ограничение для возможного клинического использования КТ в качестве флуоресцентных зондов и средств доставки – их высокая цитотоксичность, поскольку большинство КТ содержат высокотоксичные кадмий (Cd), селен (Se) или теллур (Te) [156]. Из-за этого применение КТ в настоящее время ограничено, в основном, исследованиями *in vitro*.

Для решения проблемы токсичности W.B. Tan и соавт. поместили КТ в наночастицы на основе хитозана и использовали такие конъюгаты в качестве носителей siРНК, направленной против мРНК гена рецептора эпидермального фактора роста *HER2/neu* человека. Процесс доставки siРНК в клетки контролировали методами цитофлуориметрии. При этом было достигнуто значительное подавление экспрессии гена *HER2/neu* человека [157].

M.V. Yezhelyev и соавт. разработали КТ с полимерным покрытием, поглощающим протоны (протонной губкой) [158]. Сбалансированный состав положительно и отрицательно заряженных функциональных групп, таких, как карбоновые кислоты и третичные амины, на поверхности КТ позволяет использовать подобные наночастицы для эффективной и безопасной доставки siРНК. КТ, покрытые слоем протонной губки, в 10–20 раз увеличивали эффективность подавления экспрессии гена циклофилина B, а их цитотоксичность на линии клеток MDA-MB231 (рак молочной железы) снизилась в 5–6 раз по сравнению с Lipofectamine 2000 (Invitrogen), TransITTKO (Mirus Bio Corp.) и JetPEI (Qbiogene). Кроме того, комплексы КТ-siРНК обладают равной эффективностью трансфекции как без, так и в присутствии сыворотки в культуральной среде, в то время как другие

трансфекционные агенты нуждаются в отсутствии сыворотки для достижения наилучших результатов. Поглощение таких наночастиц клетками можно наблюдать в реальном времени за счет флуоресцентного сигнала КТ. Установить локализацию комплексов в различных компартментах клетки можно с помощью электронной микроскопии, детектируя наличие полупроводников [158].

Недавно был получен новый вид квантовых точек (I-III-VI₂): AgInS₂, CuInS₂ и ZnS·AgInS₂. P. Subramaniam и соавт. синтезировали библиотеку квантовых точек типа Zn_xS·Ag_yIn_{1-y}S₂ (ZAIS) с изменяемыми физическими свойствами (фотолюминесценцией). Показано, что ZAIS обладают гораздо меньшей цитотоксичностью по сравнению со своими аналогами, а также могут использоваться в качестве многофункциональных наночастиц для одновременной визуализации и доставки siРНК в клетки глиобластомы линии U87 [159].

Наночастицы золота имеют уникальные химические и физические свойства, необходимые для транспортировки олигонуклеотидов. Они практически инертны и нетоксичны, а их размер колеблется от 1 до 150 нм [148].

S.T. Kim и соавт. оценили эффективность подавления экспрессии гена β-галактозидазы (*β-gal*) на линии эндотелиальных клеток SVR-bag4 с помощью РНК-интерференции. В качестве системы доставки использовали синтезированные ими наночастицы, которые состояли из золотого ядра (2 нм в диаметре) и полимерных дендронов с концевыми триэтилентетраминами. Дендроны, несущие положительный заряд, связывались с отрицательно заряженной siРНК посредством электростатических взаимодействий. Была выявлена зависимость величины снижения экспрессии *β-gal* от соотношения НЧ : siРНК; максимальное снижение уровня экспрессии *β-gal* составило 48% при соотношении НЧ : siРНК = 2. Эффективность трансфекции наночастицами золота была сравнима с эффективностью Lipofectamine 2000 (Invitrogen) [160].

Альтернативная классификация нановекторов

Доза и биологическая активность вещества, переносимого НЧ, зависит от нескольких факторов: кинетики связывания с клеточной поверхностью и интернализации, внутриклеточного процессинга и окончательной локализации НЧ, а также стадии клеточного цикла. Кинетика связывания с клеточной поверхностью и интернализация зависят от размера, формы, заряда и биологической активности НЧ. Наночастицы при делении клеток распределяются случайным и неравномерным образом, следовательно, концентрация наночастиц в каждой дочер-

ней клетке может быть различной. Метаболический путь НЧ и ее окончательное местоположение внутри клетки обуславливают величину дозы доставляемого вещества и его биологическую активность [161, 162].

Среди огромного разнообразия систем доставки, имеющих различный состав, геометрию и модификации поверхности, на основе их функций и возможностей можно выделить три основные категории.

Первое поколение нановекторов представлено наиболее простыми наночастицами, которые доставляются к сайтам-мишеням пассивно. В опухолевые клетки такие векторы попадают с помощью усиленного эффекта проникновения и удержания (EPR) – переноса веществ из кровеносных сосудов в ткань опухоли и их накопления [163].

Более сложные, чем их предшественники, нановекторы второго поколения представляют собой прогрессивное развитие первого. Эти системы доставки отличает наличие дополнительных функций: связывание с сайтом-мишенью в результате специфического взаимодействия лигандов и рецепторов, уникальных или сверхэкспрессированных в опухолевой ткани; совместная доставка нескольких терапевтических агентов и контролируемое высвобождение переносимых веществ [163].

Третье поколение нановекторов представлено многокомпонентными системами. Поскольку ни один агент не может самостоятельно преодолеть множество барьеров на пути к мРНК-мишени, эти системы состоят из наночастиц с различными свойствами, помещенных в один нановектор. Такие носители, или Logic Embedded Vectors (логические вложенные векторы) [164], представляют собой терапевтические многокомпонентные конструкции, в которых функции биологического распознавания и прохождения через биологические барьеры выполняют различные составляющие нановектора, что позволяет добиться более эффективной и избирательной доставки. В качестве примера такой терапевтической стратегии можно представить вектор, который проходит через кровеносную систему благодаря своей геометрии, связывается со стенкой капилляра в пораженной области вследствие специфических поверхностных взаимодействий и высвобождает различные наночастицы, которые синергично проникают из сосудов в ткань, достигают клеток-мишеней и доставляют терапевтические агенты в оптимальных концентрациях с минимальными побочными эффектами [163].

Представителем третьего поколения наночастиц являются биологически активные молекулярные сети под названием «nanoshuttles» (наночелноки), состоящие из бактериофагов, соединенных с наноча-

стицами золота. Nanoshuttles сочетают способность к гипертермической реакции наночастиц золота под воздействием ближнего инфракрасного или радиочастотного излучения с возможностями направленной доставки веществ [165].

Другой пример третьего поколения наносистем доставки – наночастицы, известные как «nanocells». Nanocells были разработаны с целью применения в области комбинированной химиотерапии. Внешняя оболочка этих нановекторов представляет собой липидные наночастицы, а внутреннее ядро состоит из полимерных наночастиц [166].

Наночастицы кремния и силикона также относятся к третьему поколению нановекторов. Наночастицы на основе среднепористого кремния успешно применили для совместной доставки доксорубина и siРНК, направленной против мРНК гена *bcl-2*. Доксорубин находился внутри пор кремния, а анти-*bcl-2*-siРНК была связана с дендримерной оболочкой. Целью разработки этого нановектора была одновременная доставка противоопухолевого препарата (для индукции апоптоза опухолевых клеток) и молекул анти-*bcl-2*-siРНК (для супрессии ионных насосов, которые опосредуют возникновение множественной лекарственной устойчивости). В результате наблюдалось значительное повышение цитотоксичности доксорубина вследствие уменьшения IC_{50} (концентрации полумаксимального ингибирования) в 64 раза [167].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология интерферирующих РНК открывает большие перспективы для лечения различных заболеваний человека путем направленного снижения уровня экспрессии генов. Некоторые терапевтические средства, основанные на принципе РНК-интерференции, уже проходят клинические испытания. Дальнейшее развитие этого направления терапии зависит от разработки безопасных и эффективных носителей для системной доставки siРНК. В целом эффективность трансфекции невирусных транспортных агентов по-прежнему ниже, чем вирусных векторов. Необходимы дальнейшие усовершенствования, направленные на повышение эффективности и снижение токсичности невирусных систем доставки.

В данном обзоре мы постарались ознакомить читателя с существующими на сегодняшний день невирусными методами доставки интерферирующих РНК, а также с проблемами, стоящими на пути внедрения этих технологий в медицину. Для более подробного изучения каждой из представленных систем мы предлагаем обратиться к работам [74–76, 88, 97, 98, 108, 113, 134, 149]. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Milhavel O., Gary D.S., Mattson M.P. // *Pharmacol. Rev.* 2003. V. 55. № 4. P. 629–648.
2. Burnett J.C., Rossi J.J. // *Chem. Biol.* 2012. V. 19. № 1. P. 60–71.
3. Vilgelm A.E., Chumakov S.P., Prassolov V.S. // *Mol. Biol.* 2006. V. 40. № 3. P. 339–354.
4. Shrivastava N., Srivastava A. // *Biotechnol. J.* 2008. V. 3. № 3. P. 339–353.
5. Scherr M., Morgan M.A., Eder M. // *Curr. Med. Chem.* 2003. V. 10. № 3. P. 245–256.
6. Lima W.F., Murray H., Nichols J.G., Wu H., Sun H., Prakash T.P., Berdeja A.R., Gaus H.J., Croke S.T. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 4. P. 2535–2548.
7. Ma J.B., Ye K., Patel D.J. // *Nature.* 2004. V. 429. № 6989. P. 318–322.
8. Macrae I.J., Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A.N., Cande W.Z., Adams P.D., Doudna J.A. // *Science.* 2006. V. 311. № 5758. P. 195–198.
9. Zhang H., Kolb F.A., Jaskiewicz L., Westhof E., Filipowicz W. // *Cell.* 2004. V. 118. № 1. P. 57–68.
10. Kim V.N., Han J., Siomi M.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 2. P. 126–139.
11. Hammond S.M. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 26. P. 5822–5829.
12. Lee Y.S., Nakahara K., Pham J.W., Kim K., He Z., Sontheimer E.J., Carthew R.W. // *Cell.* 2004. V. 117. № 1. P. 69–81.
13. Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Tuschl T., Patel D.J. // *Nature.* 2008. V. 456. № 7224. P. 921–926.
14. MacRae I.J., Ma E., Zhou M., Robinson C.V., Doudna J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 2. P. 512–517.
15. Miyoshi K., Okada T.N., Siomi H., Siomi M.C. // *RNA.* 2009. V. 15. № 7. P. 1282–1291.
16. Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Wardle G.S., Tuschl T., Patel D.J. // *Nature.* 2009. V. 461. № 7265. P. 754–761.
17. Nowotny M., Yang W. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2009. V. 19. № 3. P. 286–293.
18. Birney E., Stamatoyannopoulos J.A., Dutta A., Guigo R., Gingeras T.R., Margulies E.H., Weng Z., Snyder M., Dermitzakis E.T., Thurman R.E., et al. // *Nature.* 2007. V. 447. № 7146. P. 799–816.
19. Carthew R.W., Sontheimer E.J. // *Cell.* 2009. V. 136. № 4. P. 642–655.
20. Титов И.И., Ворожейкин П.С. // *Вавиловский журн. генетики и селекции.* 2011. Т. 15. № 1. С. 139–147.
21. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. // *Биохимия.* 2007. Т. 72. № 11. С. 1427–1448.
22. Yekta S., Shih I.H., Bartel D.P. // *Science.* 2004. V. 304. № 5670. P. 594–596.
23. Ameres S.L., Martinez J., Schroeder R. // *Cell.* 2007. V. 130. № 1. P. 101–112.
24. Selbach M., Schwanhaussner B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N. // *Nature.* 2008. V. 455. № 7209. P. 58–63.
25. Kawakami S., Hashida M. // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 2007. V. 22. № 3. P. 142–151.
26. Watts J.K., Deleavey G.F., Damha M.J. // *Drug Discovery Today.* 2008. V. 13. № 19–20. P. 842–855.
27. Hartmann G. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 3. P. 438–442.
28. Fang J., Sawa T., Maeda H. // *Adv. Exp. Med. Biology.* 2003. V. 519. P. 29–49.
29. Zamecnik J., Vargova L., Homola A., Kodet R., Sykova E. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2004. V. 30. № 4. P. 338–350.
30. Singh S., Narang A.S., Mahato R.I. // *Pharmaceut. Res.* 2011. V. 28. № 12. P. 2996–3015.
31. Perez-Martinez F.C., Guerra J., Posadas I., Cena V. // *Pharmaceut. Res.* 2011. V. 28. № 8. P. 1843–1858.
32. Arias J.L., Clares B., Morales M.E., Gallardo V., Ruiz M.A. // *Curr. Drug Targets.* 2011. V. 12. № 8. P. 1151–1165.
33. Leucuta S.E. // *Curr. Clin. Pharmacol.* 2012. V. 7. № 4. P. 282–317.
34. Khatra N., Rathi M., Baradia D., Trehan S., Misra A. // *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems.* 2012. V. 29. № 6. P. 487–527.
35. Sakurai Y., Hatakeyama H., Sato Y., Akita H., Takayama K., Kobayashi S., Futaki S., Harashima H. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 24. P. 5733–5742.
36. Duan J., Zhang Y., Chen W., Shen C., Liao M., Pan Y., Wang J., Deng X., Zhao J. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. V. 2009. P. 149–254.
37. Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. // *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2005. V. 4. № 7. P. 581–593.
38. Sonawane N.D., Szoka F.C., Jr., Verkman A.S. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 45. P. 44826–44831.
39. Elyahu H., Barenholz Y., Domb A.J. // *Molecules.* 2005. V. 10. № 1. P. 34–64.
40. Nguyen J., Szoka F.C. // *Accounts Chem. Res.* 2012. V. 45. № 7. P. 1153–1162.
41. Zelphati O., Szoka F.C., Jr. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 21. P. 11493–11498.
42. Hafez I.M., Maurer N., Cullis P.R. // *Gene Therapy.* 2001. V. 8. № 15. P. 1188–1196.
43. Chu C.Y., Rana T.M. // *RNA.* 2008. V. 14. № 9. P. 1714–1719.
44. Zou Y., Tiller P., Chen I.W., Beverly M., Hochman J. // *Rapid Comm. Mass Spectrometry: RCM.* 2008. V. 22. № 12. P. 1871–1881.
45. Bramsen J.B., Kjems J. // *Meth. Mol. Biol.* 2011. V. 721. P. 77–103.
46. Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A. // *Curr. Opin. Mol. Therapeutics.* 2010. V. 12. № 2. P. 158–167.
47. Rose S.D., Kim D.H., Amarzguiou J., Heidel J.D., Collingwood M.A., Davis M.E., Rossi J.J., Behlke M.A. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 13. P. 4140–4156.
48. Dore-Savard L., Roussy G., Dansereau M.A., Collingwood M.A., Lennox K.A., Rose S.D., Beaudet N., Behlke M.A., Sarret P. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* 2008. V. 16. № 7. P. 1331–1339.
49. Deleavey G.F., Watts J.K., Damha M.J. // *Curr. Prot. Nucl. Acids Chem.* 2009. Suppl. 39. P. 16.3.1–16.3.22.
50. Phelps K., Morris A., Beal P.A. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 1. P. 100–109.
51. Detzer A., Sczakiel G. // *Curr. Topics Med. Chem.* 2009. V. 9. № 12. P. 1109–1116.
52. Mescalchin A., Detzer A., Wecke M., Overhoff M., Wunsche W., Sczakiel G. // *Expert. Opinion Biol. Therapy.* 2007. V. 7. № 10. P. 1531–1538.
53. Harborth J., Elbashir S.M., Vandenberg K., Manninga H., Scaringe S.A., Weber K., Tuschl T. // *Antisense Nucl. Acid Drug Devel.* 2003. V. 13. № 2. P. 83–105.
54. Li Z.Y., Mao H., Kallick D.A., Gorenstein D.G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 329. № 3. P. 1026–1030.
55. Prakash T.P., Allerson C.R., Dande P., Vickers T.A., Sioufi N., Jarres R., Baker B.F., Swayze E.E., Griffey R.H., Bhat B. // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. № 13. P. 4247–4253.
56. Gaglione M., Messere A. // *Mini Rev. Med. Chem.* 2010. V. 10. № 7. P. 578–595.
57. Kraynack B.A., Baker B.F. // *RNA.* 2006. V. 12. № 1. P. 163–176.
58. Pallan P.S., Greene E.M., Jicman P.A., Pandey R.K., Manoharan M., Rozners E., Egli M. // *Nucl. Acids Res.* 2011.

- V. 39. № 8. P. 3482–3495.
59. Allerson C.R., Sioufi N., Jarres R., Prakash T.P., Naik N., Berdeja A., Wanders L., Griffey R.H., Swayze E.E., Bhat B. // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. № 4. P. 901–904.
 60. Muhonen P., Tennila T., Azhayeve E., Parthasarathy R.N., Janckila A.J., Vaananen H.K., Azhayeve A., Laitala-Leinonen T. // *Chem. Biodiversity*. 2007. V. 4. № 5. P. 858–873.
 61. Morrissey D.V., Lockridge J.A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machemer L., Radka S., Jadhav V., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. № 8. P. 1002–1007.
 62. Ferrari N., Bergeron D., Tedeschi A.L., Mangos M.M., Paquet L., Renzi P.M., Damha M.J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1082. P. 91–102.
 63. Dowler T., Bergeron D., Tedeschi A.L., Paquet L., Ferrari N., Damha M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 6. P. 1669–1675.
 64. Watts J.K., Choubdar N., Sadalpure K., Robert F., Wahba A.S., Pelletier J., Pinto B.M., Damha M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 5. P. 1441–1451.
 65. Lima W.F., Wu H., Nichols J.G., Sun H., Murray H.M., Crooke S.T. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 38. P. 26017–26028.
 66. Vickers T.A., Zhang H., Graham M.J., Lemonidis K.M., Zhao C., Dean N.M. // *J. Immunol.* 2006. V. 176. № 6. P. 3652–3661.
 67. Moschos S.A., Frick M., Taylor B., Turnpenny P., Graves H., Spink K.G., Brady K., Lamb D., Collins D., Rockel T.D., et al. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. 2011. V. 19. № 12. P. 2163–2168.
 68. Elmen J., Thonberg H., Ljungberg K., Frieden M., Westergaard M., Xu Y., Wahren B., Liang Z., Orum H., Koch T., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 1. P. 439–447.
 69. Mook O.R., Baas F., de Wissel M.B., Fluiter K. // *Mol. Cancer Therapeut.* 2007. V. 6. № 3. P. 833–843.
 70. Swayze E.E., Siwkowski A.M., Wancewicz E.V., Migawa M.T., Wyrzykiewicz T.K., Hung G., Monia B.P., Bennett C.F. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 2. P. 687–700.
 71. Hoffmann S., Hoos J., Klussmann S., Vonhoff S. // *Curr. Prot. Nucl. Acids Chem.* 2011. Suppl. 46. P. 4.46.1–4.46.30.
 72. Luo D., Saltzman W.M. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 8. P. 893–895.
 73. Paulo C.S., Pires das Neves R., Ferreira L.S. // *Nanotechnology*. 2011. V. 22. № 49. P. 494002.
 74. Jafari M., Soltani M., Naahidi S., Karunaratne D.N., Chen P. // *Curr. Med. Chem.* 2012. V. 19. № 2. P. 197–208.
 75. Xing J., Deng L., Guo S., Dong A., Liang X.J. // *Mini Rev. Med. Chem.* 2010. V. 10. № 2. P. 126–137.
 76. Tros de Ilarduya C., Sun Y., Duzgunes N. // *Eur. J. Pharmaceut. Sci.: Official J. Eur. Fed. Pharmaceut. Sci.* 2010. V. 40. № 3. P. 159–170.
 77. Jere D., Jiang H.L., Arote R., Kim Y.K., Choi Y.J., Cho M.H., Akaike T., Cho C.S. // *Expert Opin. Drug Delivery*. 2009. V. 6. № 8. P. 827–834.
 78. Nimesh S. // *Curr. Clin. Pharm.* 2012. V. 7. № 2. P. 121–130.
 79. Singha K., Namgung R., Kim W.J. // *Nucl. Acid Therapeut.* 2011. V. 21. № 3. P. 133–147.
 80. Hong S., Leroueil P.R., Janus E.K., Peters J.L., Kober M.M., Islam M.T., Orr B.G., Baker J.R., Jr., Banaszak Holl M.M. // *Bioconjugate Chem.* 2006. V. 17. № 3. P. 728–734.
 81. Wightman L., Kircheis R., Rossler V., Carotta S., Ruzicka R., Kurska M., Wagner E. // *J. Gene Med.* 2001. V. 3. № 4. P. 362–372.
 82. Luten J., van Nostrum C.F., De Smedt S.C., Hennink W.E. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2008. V. 126. № 2. P. 97–110.
 83. Gary D.J., Puri N., Won Y.Y. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2007. V. 121. № 1–2. P. 64–73.
 84. Cun D., Foged C., Yang M., Frokjaer S., Nielsen H.M. // *Internat. J. Pharmaceut.* 2010. V. 390. № 1. P. 70–75.
 85. Presumey J., Salzano G., Courties G., Shires M., Ponchel F., Jorgensen C., Apparailly F., De Rosa G. // *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.: Official J. Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2012. V. 82. № 3. P. 457–464.
 86. Steinbach J.M., Weller C.E., Booth C.J., Saltzman W.M. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2012. V. 162. № 1. P. 102–110.
 87. Svenson S., Tomalia D.A. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005. V. 57. № 15. P. 2106–2129.
 88. Quadir M.A., Haag R. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2012. V. 161. № 2. P. 484–495.
 89. Morgan M.T., Nakanishi Y., Kroll D.J., Griset A.P., Carnahan M.A., Wathier M., Oberlies N.H., Manikumar G., Wani M.C., Grinstaff M.W. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 24. P. 11913–11921.
 90. Dufes C., Uchegbu I.F., Schatzlein A.G. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005. V. 57. № 15. P. 2177–2202.
 91. Tomalia D.A., Reyna L.A., Svenson S. // *Biochem. Soc. Transactions*. 2007. V. 35. Pt 1. P. 61–67.
 92. Wang Y., Li Z., Han Y., Liang L.H., Ji A. // *Curr. Drug Metabolism*. 2010. V. 11. № 2. P. 182–196.
 93. Minko T., Patil M.L., Zhang M., Khandare J.J., Saad M., Chandna P., Taratula O. // *Meth. Mol. Biol.* 2010. V. 624. P. 281–294.
 94. Kim I.D., Lim C.M., Kim J.B., Nam H.Y., Nam K., Kim S.W., Park J.S., Lee J.K. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2010. V. 142. № 3. P. 422–430.
 95. Tang Y., Li Y.B., Wang B., Lin R.Y., van Dongen M., Zurcher D.M., Gu X.Y., Banaszak Holl M.M., Liu G., Qi R. // *Mol. Pharmaceut.* 2012. V. 9. № 6. P. 1812–1821.
 96. Taratula O., Garbuzenko O.B., Kirkpatrick P., Pandya I., Savla R., Pozharov V.P., He H., Minko T. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2009. V. 140. № 3. P. 284–293.
 97. Rudzinski W.E., Aminabhavi T.M. // *Internat. J. Pharmaceut.* 2010. V. 399. № 1–2. P. 1–11.
 98. Saranya N., Moorthi A., Saravanan S., Devi M.P., Selvamurugan N. // *Internat. J. Biol. Macromolecules*. 2011. V. 48. № 2. P. 234–238.
 99. Alameh M., Dejesus D., Jean M., Darras V., Thibault M., Lavertu M., Buschmann M.D., Merzouki A. // *Internat. J. Nanomed.* 2012. V. 7. P. 1399–1414.
 100. Katas H., Alpar H.O. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2006. V. 115. № 2. P. 216–225.
 101. Howard K.A., Rahbek U.L., Liu X., Damgaard C.K., Glud S.Z., Andersen M.O., Hovgaard M.B., Schmitz A., Nyengaard J.R., Besenbacher F., et al. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. 2006. V. 14. № 4. P. 476–484.
 102. Nielsen E.J., Nielsen J.M., Becker D., Karlas A., Prakash H., Glud S.Z., Merrison J., Besenbacher F., Meyer T.F., Kjems J., et al. // *Pharmaceut. Res.* 2010. V. 27. № 12. P. 2520–2527.
 103. Howard K.A., Paludan S.R., Behlke M.A., Besenbacher F., Deleuran B., Kjems J. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. 2009. V. 17. № 1. P. 162–168.
 104. Tripathi S.K., Goyal R., Kashyap M.P., Pant A.B., Haq W., Kumar P., Gupta K.C. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 16. P. 4204–4219.
 105. Lee D.W., Yun K.S., Ban H.S., Choe W., Lee S.K., Lee K.Y. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2009. V. 139. № 2. P. 146–152.
 106. Ji A.M., Su D., Che O., Li W.S., Sun L., Zhang Z.Y., Yang B., Xu F. // *Nanotechnology*. 2009. V. 20. № 40. P. 405103.
 107. Pille J.Y., Li H., Blot E., Bertrand J.R., Pritchard L.L., Opolon

- P., Maksimenko A., Lu H., Vannier J.P., Soria J., et al. // *Hum. Gene Therapy*. 2006. V. 17. № 10. P. 1019–1026.
108. O'Mahony A.M., Godinho B.M., Ogier J., Devocelle M., Darcy R., Cryan J.F., O'Driscoll C.M. // *ACS Chem. Neurosci*. 2012. V. 3. № 10. P. 744–752.
109. Alabi C., Vegas A., Anderson D. // *Curr. Opin. Pharmacol*. 2012. V. 12. № 4. P. 427–433.
110. Hu-Lieskovan S., Heidel J.D., Bartlett D.W., Davis M.E., Triche T.J. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. № 19. P. 8984–8992.
111. Davis M.E., Zuckerman J.E., Choi C.H., Seligson D., Tolcher A., Alabi C.A., Yen Y., Heidel J.D., Ribas A. // *Nature*. 2010. V. 464. № 7291. P. 1067–1070.
112. Heidel J.D., Yu Z., Liu J.Y., Rele S.M., Liang Y., Zeidan R.K., Kornbrust D.J., Davis M.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 14. P. 5715–5721.
113. Zhang S., Zhi D., Huang L. // *J. Drug Targeting*. 2012. V. 20. № 9. P. 724–735.
114. DeLong R.K., Risor A., Kanomata M., Laymon A., Jones B., Zimmerman S.D., Williams J., Witkowski C., Warner M., Ruff M., et al. // *Nanomedicine (Lond.)*. 2012. V. 7. № 12. P. 1851–1862.
115. Gavrilov K., Saltzman W.M. // *Yale J. Biol. Med*. 2012. V. 85. № 2. P. 187–200.
116. Aliabadi H.M., Landry B., Sun C., Tang T., Uludag H. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 8. P. 2546–2569.
117. Northfelt D.W., Dezube B.J., Thommes J.A., Levine R., von Roenn J.H., Dosik G.M., Rios A., Krown S.E., DuMond C., Mamelok R.D. // *J. Clin. Oncol.: Official J. Am. Soc. Clin. Oncol*. 1997. V. 15. № 2. P. 653–659.
118. Gooding M., Browne L.P., Quinteiro F.M., Selwood D.L. // *Chem. Biol. Drug Design*. 2012. V. 80. № 6. P. 787–809.
119. Venturini M., Bighin C., Puglisi F., Olmeo N., Aitini E., Colucci G., Garrone O., Paccagnella A., Marini G., Crino L., et al. // *Breast*. 2010. V. 19. № 5. P. 333–338.
120. Landen C.N., Jr., Chavez-Reyes A., Bucana C., Schmandt R., Deavers M.T., Lopez-Berestein G., Sood A.K. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. № 15. P. 6910–6918.
121. Kang S.H., Cho H.J., Shim G., Lee S., Kim S.H., Choi H.G., Kim C.W., Oh Y.K. // *Pharmaceut. Res*. 2011. V. 28. № 12. P. 3069–3078.
122. Briane D., Slimani H., Tagounits A., Naejus R., Haddad O., Coudert R., Charnaux N., Cao A. // *J. Drug Targeting*. 2012. V. 20. № 4. P. 347–354.
123. Un K., Kawakami S., Higuchi Y., Suzuki R., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc*. 2011. V. 156. № 3. P. 355–363.
124. Un K., Kawakami S., Suzuki R., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. // *Biomaterials*. 2010. V. 31. № 30. P. 7813–7826.
125. Un K., Kawakami S., Suzuki R., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. // *Mol. Pharmaceut*. 2011. V. 8. № 2. P. 543–554.
126. Un K., Kawakami S., Yoshida M., Higuchi Y., Suzuki R., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. // *Hepatology*. 2012. V. 56. № 1. P. 259–269.
127. Wu S.Y., McMillan N.A. // *AAPS J*. 2009. V. 11. № 4. P. 639–652.
128. Zimmermann T.S., Lee A.C., Akinc A., Bramlage B., Bumcrot D., Fedoruk M.N., Harborth J., Heyes J.A., Jeffs L.B., John M., et al. // *Nature*. 2006. V. 441. № 7089. P. 111–114.
129. Laufer S.D., Restle T. // *Curr. Pharmaceut. Design*. 2008. V. 14. № 34. P. 3637–3655.
130. Herce H.D., Garcia A.E. // *J. Biol. Physics*. 2007. V. 33. № 5–6. P. 345–356.
131. Fonseca S.B., Pereira M.P., Kelley S.O. // *Adv. Drug Delivery Rev*. 2009. V. 61. № 11. P. 953–964.
132. Sebbage V. // *Biosci. Horizons*. 2009. V. 2. № 1. P. 64–72.
133. Stewart K.M., Horton K.L., Kelley S.O. // *Organic Biomol. Chem*. 2008. V. 6. № 13. P. 2242–2255.
134. Trabulo S., Cardoso A.L., Mano M., De Lima M.C.P. // *Pharmaceuticals*. 2010. V. 3. № 4. P. 961–993.
135. Vives E., Schmidt J., Pelegrin A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1786. № 2. P. 126–138.
136. Finstad C.L., Wang C.Y., Kowalski J., Zhang M., Li M.L., Li X.M., Xia W.G., Bosland M.C., Murthy K.K., Walfield A.M., et al. // *Vaccine*. 2004. V. 22. № 9–10. P. 1300–1313.
137. Pooga M., Langel U. // *Meth. Mol. Biol*. 2005. V. 298. P. 77–89.
138. Muratovska A., Eccles M.R. // *FEBS Lett*. 2004. V. 558. № 1–3. P. 63–68.
139. Moschos S.A., Jones S.W., Perry M.M., Williams A.E., Erjefalt J.S., Turner J.J., Barnes P.J., Sproat B.S., Gait M.J., Lindsay M.A. // *Bioconjugate Chem*. 2007. V. 18. № 5. P. 1450–1459.
140. Morris M.C., Gros E., Aldrian-Herrada G., Choob M., Archdeacon J., Heitz F., Divita G. // *Nucl. Acids Res*. 2007. V. 35. № 7. P. e49.
141. Crombez L., Charnet A., Morris M.C., Aldrian-Herrada G., Heitz F., Divita G. // *Biochem. Soc. Transact*. 2007. V. 35. Pt 1. P. 44–46.
142. Liu B.R., Chou J.C., Lee H.J. // *J. Membrane Biol*. 2008. V. 222. № 1. P. 1–15.
143. Meade B.R., Dowdy S.F. // *Adv. Drug Delivery Rev*. 2008. V. 60. № 4–5. P. 530–536.
144. Hoyer J., Neundorff I. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc*. 2012. V. 161. № 3. P. 826–834.
145. Johnson L.N., Cashman S.M., Kumar-Singh R. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. 2008. V. 16. № 1. P. 107–114.
146. Cheung W., Pontoriero F., Taratula O., Chen A.M., He H. // *Adv. Drug Delivery Rev*. 2010. V. 62. № 6. P. 633–649.
147. Qi L., Gao X. // *ACS Nano*. 2008. V. 2. № 7. P. 1403–1410.
148. Boisselier E., Astruc D. // *Chem. Soc. Rev*. 2009. V. 38. № 6. P. 1759–1782.
149. Zhang S., Zhao Y., Zhi D. // *Bioorganic Chem*. 2012. V. 40. № 1. P. 10–18.
150. Son S.J., Bai X., Lee S.B. // *Drug Discovery Today*. 2007. V. 12. № 15–16. P. 650–656.
151. Liu G., Swierczewska M., Lee S., Chen X. // *Nano Today*. 2010. V. 5. № 6. P. 524–539.
152. Neagoe I.B., Braicu C., Matea C., Bele C., Florin G., Gabriel K., Veronica C., Irimie A. // *J. Biomed. Nanotechnol*. 2012. V. 8. № 4. P. 567–574.
153. Wang X., Ren J., Qu X. // *ChemMedChem*. 2008. V. 3. № 6. P. 940–945.
154. Gao J., Chen K., Xie R., Xie J., Yan Y., Cheng Z., Peng X., Chen X. // *Bioconjugate Chem*. 2010. V. 21. № 4. P. 604–609.
155. Jung J., Solanki A., Memoli K.A., Kamei K., Kim H., Drahl M.A., Williams L.J., Tseng H.R., Lee K. // *Angew Chem. Int. Ed. Engl*. 2010. V. 49. № 1. P. 103–107.
156. Bumcrot D., Manoharan M., Koteliansky V., Sah D.W. // *Nat. Chem. Biol*. 2006. V. 2. № 12. P. 711–719.
157. Tan W.B., Jiang S., Zhang Y. // *Biomaterials*. 2007. V. 28. № 8. P. 1565–1571.
158. Yezhelyev M.V., Qi L., O'Regan R.M., Nie S., Gao X. // *J. Am. Chem. Soc*. 2008. V. 130. № 28. P. 9006–9012.
159. Subramaniam P., Lee S.J., Shah S., Patel S., Starovoytov V., Lee K.B. // *Adv. Mater*. 2012. V. 24. № 29. P. 4014–4019.
160. Kim S.T., Chompoosor A., Yeh Y.C., Agasti S.S., Solfield D.J., Rotello V.M. // *Small*. 2012. V. 8. № 21. P. 3253–3256.
161. Duncan R. // *Curr. Opin. Biotechnol*. 2011. V. 22. № 4. P. 492–501.
162. Summers H.D., Rees P., Holton M.D., Brown M.R., Chappell

- S.C., Smith P.J., Errington R.J. // *Nat. Nanotechnol.* 2011. V. 6. № 3. P. 170–174.
163. Serda R.E., Godin B., Blanco E., Chiappini C., Ferrari M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1810. № 3. P. 317–329.
164. Ferrari M. // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 28. № 4. P. 181–188.
165. Souza G.R., Christianson D.R., Staquicini F.I., Ozawa M.G., Snyder E.Y., Sidman R.L., Miller J.H., Arap W., Pasqualini R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 5. P. 1215–1220.
166. Sengupta S., Eavarone D., Capila I., Zhao G., Watson N., Kiziltepe T., Sasisekharan R. // *Nature.* 2005. V. 436. № 7050. P. 568–572.
167. Tasciotti E., Liu X., Bhavane R., Plant K., Leonard A.D., Price B.K., Cheng M.M., Decuzzi P., Tour J.M., Robertson F., et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. V. 3. № 3. P. 151–157.

УДК 577.113.3 + 615.281.9

5'-Фосфонаты AZT: достижения и перспективы в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции

А. Л. Хандажинская*, Е. А. Широкова

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

*E-mail: khandazhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 18.02.2013

РЕФЕРАТ AZT (Зидовудин, Ретровир), несмотря на его многочисленные недостатки, остается одним из ключевых препаратов, используемых для профилактики и терапии ВИЧ-инфекции как в виде монотерапии, так и в составе ВААРТ. Стратегия поиска новых эффективных и безопасных соединений, направленная на создание латентных форм (депо-форм) на основе AZT, принесла первые положительные результаты. Так, натриевая соль 5'-Н-фосфоната AZT (Никавир, фосфазид) показала клинические преимущества перед AZT, прежде всего значительно меньшую токсичность и лучшую переносимость. Никавир может эффективно использоваться для профилактики передачи ВИЧ от матери ребенку, а также в качестве альтернативного препарата при непереносимости Зидовудина. Доклинические испытания еще одного фосфоната, 5'-аминокарбонилфосфоната AZT, показали, что при его приеме происходит высвобождение AZT, причем фармакокинетические параметры AZT указывают на пролонгированность фармакологического действия. Анализ совокупности доклинических токсикологических и фармакологических данных позволил рекомендовать 5'-аминокарбонилфосфонат AZT для клинических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА терапия ВИЧ, депо-формы, 5'-фосфонаты AZT, Никавир, доклинические исследования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОТ-ВИЧ – обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека; AZT – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; ЗТС – (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин; L-FTC – (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин; ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия; LD₅₀ – средняя летальная доза; AUC – площадь под кривой зависимости концентрации препарата в крови от времени; MRT – время удержания субстанции в тест-ткани; CL – общий клиренс; V_{ss} – стационарный объем распределения; F – биодоступность.

ВВЕДЕНИЕ

В последней четверти прошлого столетия СПИД стал одной из главных угроз здоровью человека. Многолетние усилия ученых привели к созданию множества веществ с анти-ВИЧ-активностью, которые можно разделить на несколько групп: 1) нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ (ОТ-ВИЧ); 2) ингибиторы протеазы; 3) ингибиторы интегразы и 4) ингибиторы связывания и проникновения вируса в клетку. Самую многочисленную группу анти-ВИЧ-препаратов, применяемых в медицинской практике, представляют нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ), наиболее известные из которых – 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT, Зидовудин, Ретровир), (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин (ЗТС, Ламивудин), (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин (L-FTC, Эмрицитабин), 2',3'-дидезоксиинозин (ddI, Диданозин) и др. [1]. Механизм действия этих ингибиторов включает внутриклеточное трифосфорилиро-

вание с последующим специфическим блокированием синтеза вирусной ДНК, катализируемого ОТ-ВИЧ. Однако все НИОТ имеют серьезные недостатки. Фармакокинетические свойства и низкая эффективность внутриклеточных превращений (например, только 0.3% AZT преобразуется в клетках в соответствующий трифосфат) обуславливают использование высоких доз препаратов, что, в свою очередь, приводит к росту токсичности. Кроме того, вследствие высокой изменчивости вируса происходит быстрое развитие вирусной резистентности [2, 3], что также снижает эффективность терапии.

Клинические последствия токсичности AZT включают многочисленные гематологические эффекты, подавление функционирования клеток костного мозга, заболевания печени, миопатии и др. [4, 5]. Из-за митохондриальной токсичности AZT больные СПИДом страдают от гиперлактатемии и липодистрофии [6, 7]. Быстрое выведение AZT требует ежедневного трехразового приема препарата. После

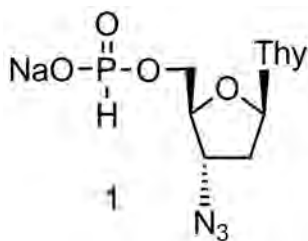
длительного курса AZT становится неэффективным из-за развития у вируса резистентности к нему [8, 9]. Тем не менее, несмотря на все побочные эффекты, AZT остается наиболее широко применяемым препаратом.

Используемые в настоящее время схемы комплексной лекарственной терапии (высокоактивная антиретровирусная терапия, ВААРТ) позволяют контролировать репликацию ВИЧ в большей степени, чем индивидуальные препараты, но и для них нужны новые эффективные и нетоксичные компоненты.

Один из способов увеличения эффективности антивирусного препарата состоит в синтезе депо-формы (латентной формы), т.е. такого производного, которое, подвергаясь химическим или ферментативным превращениям в организме, высвобождает активное соединение [10]. Создание депо-форм – это хороший способ снижения токсичности НИОТ за счет как улучшения фармакокинетических параметров, так и уменьшения сродства к митохондриальным белкам-транспортерам. Такой подход использовали во многих лабораториях мира при поиске новых анти-ВИЧ-агентов. Примерами успешного применения депо-форм НИОТ в практической медицине являются Виреад (Viread®, тенофовир дизопроксилфумарат) и Никавир (Nikavir®, натриевая соль 5'-Н-фосфоната AZT, фосфазад) [11, 12].

НИКАВИР (ФОСФАЗИД) – ПЕРВЫЙ УСПЕХ В СОЗДАНИИ ДЕПО-ФОРМ AZT

Никавир был лицензирован в Российской Федерации в 1999 году как препарат для лечения больных СПИДом и профилактики ВИЧ-инфекции [13–15]. Никавир получен в результате многолетних исследований по синтезу и изучению противовирусных агентов, проводимых под руководством А.А. Краевского в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН [16, 17]:



5'-Н-Фосфонат AZT синтезировали в 1989 году и проверили на клеточных культурах, инфицированных ВИЧ-1 [16], однако результаты тестов, проведенных в разных лабораториях, значительно отличались. Сначала сообщалось, что в культуре клеток МТ-4 фосфазад **1** показал умеренную анти-ВИЧ-активность и более низкую токсичность, чем AZT

[18, 19], при этом его индекс селективности был выше, чем у AZT. Позже, однако, фосфазад проверили на трех различных клеточных линиях (МТ-4, СЕМ-SS и СЕМ-Х 174) и обнаружили, что его активность была примерно на порядок меньше, чем у AZT [20]. В другой публикации [21] сообщалось, что в клеточных культурах С8 и JM анти-ВИЧ-активность соединения **1** была в 10–20 раз ниже, чем у AZT. Напротив, согласно [22], индексы селективности Н-фосфоната **1** были в 1.5 и 15 раз выше соответственно, чем у AZT (использовали штаммы ПИВ и НХВ2 ВИЧ в мононуклеарных клетках крови). Несмотря на эти противоречивые и несколько спорные данные, изучение фосфазида было продолжено, что позволило выявить его преимущества перед AZT в опытах на лабораторных животных [23].

Фармакокинетические исследования фосфазида показали его основное отличие от AZT: фармакокинетический профиль AZT после перорального приема фосфазида был существенно более плавным, чем при приеме самого AZT (C_{max} и t_{max} ~ 0.13 мг/л и 2 – 2.5 ч соответственно против 1.2 мг/л и 0.5–0.8 ч у AZT). Меньшая пиковая концентрация AZT, наблюдаемая после приема фосфазида, не снижала противовирусную эффективность, но могла способствовать снижению токсичности. Это отличие проявилось в клинической практике, где наблюдали устойчивый положительный терапевтический эффект (снижение вирусной нагрузки, восстановление иммунитета и уменьшение опасности развития сопутствующих заболеваний). Фосфазад хорошо переносится взрослыми и детьми. В ходе лечения фосфазидом не было выявлено побочных эффектов, обычно наблюдавшихся при приеме AZT, таких, как рвота, тошнота, головная боль, диарея, миалгия, анемия, тромбоцитопения и нейтроцитопения [17].

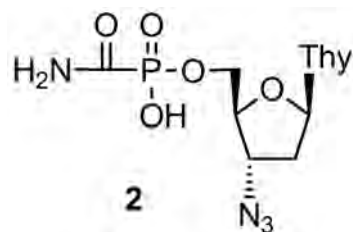
Существенная терапевтическая эффективность и безопасность фосфазида отмечена у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих ВААРТ. Хорошо показали себя различные сочетания Никавира: с Диданозином и Невирапином [24], с Диданозином и Ритонавиром/Саквинавиром [25], с Ламивудином и Эфавиренцем или ингибитором протеазы (Атазанавиром или Лопинавиром/Ритонавиром) [26] и др. Перечисленные схемы ВААРТ оказались более эффективными при сопутствующих заболеваниях – анемиях, хронических гепатитах В и С [27], циррозе печени и туберкулезе [28], чем схемы, включающие Ретровир или Комбивир. Безопасность Никавира при туберкулезе и заболеваниях печени вирусной этиологии является его существенным преимуществом, потому что большинство пациентов, зараженных ВИЧ, страдают от данных оппортунистических инфекций [27, 28].

Другое клиническое применение фосфазида – химиопрофилактика передачи ВИЧ от инфицированных женщин их детям во время беременности, родового и послеродового периодов. Фосфазид не влияет на течение беременности у ВИЧ-инфицированных женщин, на зрелость и жизнеспособность плодов. AZT из фосфазида эффективно проникает через плаценту, в результате чего в пуповине и крови матери поддерживаются его одинаковые концентрации. Использование Никавира во время беременности в сочетании с Ретровиром или Невирапином в родах и послеродовом периоде эффективно предотвращает вертикальную передачу ВИЧ [29, 30]. В некоторых случаях Ретровир был заменен на Никавир из-за низкого уровня гемоглобина в крови беременных женщин. Во всех случаях препарат хорошо переносился, а гематологические показатели восстанавливались.

Таким образом, низкая токсичность и хорошая переносимость фосфазида делают его привлекательным компонентом различных вариантов ВААРТ. Он может эффективно использоваться для профилактики передачи ВИЧ от матери ребенку, в терапии ВИЧ-инфекции, особенно при сопутствующем хроническом вирусном гепатите, а также для предотвращения заражения медперсонала. Неслучайно, в последней редакции Протоколов лечения больных ВИЧ-инфекцией [31] фосфазид рекомендован в качестве одного из компонентов предпочтительных схем антиретровирусной терапии первого ряда.

5'-АМИНОКАРБОНИЛФОСФОНАТЫ КАК НАПРАВЛЕНИЕ ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ ДЕПО-ФОРМ AZT

В продолжение работы по созданию фосфонатных депо-форм AZT были изучены соединения различного типа [32–37], но самой перспективной оказалась группа 5'-аминокарбонилфосфонатов AZT, замещенных по NH-фрагменту различными функциональными группами (C_6H_{13} , $HOCH_2CH_2$, $H_2NCH_2CH_2$, $Me_2NCH_2CH_2$, $Me_3N^+CH_2CH_2$, Me, H, C_4H_9 , $PhCH_2CH_2$) [38–40]:



Противовирусные эксперименты в клетках МТ-4, зараженных ВИЧ, показали, что 5'-аминокарбонилфосфонаты AZT ингибировали вирусную репликацию на порядок менее эффективно, чем AZT. В то же

время их токсичность, за исключением метиламидного производного, была значительно ниже, чем у AZT. Все синтезированные фосфонаты оказались устойчивыми в биологических жидкостях (сыворотка крови человека, цельная кровь собаки). Предварительная оценка фармакокинетических параметров после перорального приема собаками 5'-аминокарбонилфосфонатов AZT показала, что все соединения могли метаболизироваться до AZT. Характер кривых зависимости концентрации высвобожденного AZT в плазме крови от времени был сходным у всех изученных амидов. Пиковые концентрации C_{max} AZT для фосфонатов, несущих по NH-фрагменту остатки C_6H_{13} , C_4H_9 , $PhCH_2CH_2$, а также незамещенного амида **2** составляли 2.0, 0.8, 0.9 и 3.7 мг/л соответственно. Таким образом, в пределах этой группы 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** был самым эффективным донором AZT. Это соединение изучено более подробно.

5'-АМИНОКАРБОНИЛФОСФОНАТ AZT

Эксперименты в клеточных культурах

Изучение противовирусной активности 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **2** на культуре лимфобластоидных клеток человека МТ-4 показало, что его противовирусная активность примерно на порядок уступает активности AZT и в 3–4.5 раза ниже, чем у фосфазида. Однако его токсичность снижалась в еще большей степени (в 34–50 и 12.5–15 раз соответственно), благодаря чему фосфонат **2** обладал более высоким химиотерапевтическим индексом, чем AZT и фосфазид [38–40].

Эффективность проникновения в клетки фосфоната **2** была в 10–100 раз ниже, чем AZT, и приблизительно в 6 раз ниже, чем у фосфазида [23, 39]. Это позволяет предположить, что понижение анти-ВИЧ-активности и токсичности в культуре клеток МТ-4 по сравнению с показателями для AZT и фосфазида отражает уменьшение эффективности проникновения в клетки, т.е. существует прямая зависимость между проникновением фосфоната **2**, фосфазида и AZT в культивируемые клетки и противовирусными свойствами этих соединений. Необходимо отметить, что обе депо-формы достаточно стабильны при испытании в культуре клеток, в то время как в организме они эффективно превращаются в AZT [39].

Исследование стабильности

Стабильность фосфоната **2** в 100% сыворотке крови человека оказалась сопоставимой со стабильностью фосфазида: время полужизни ($t_{1/2}$) обоих соединений превышает 6 ч [39]. В то же время в цельной крови собаки при 37°C фосфонат **2** был существенно более устойчивым, чем фосфазид ($t_{1/2} > 24$ ч против 3 ч).

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ [41]

Беспородные собаки (средний вес 22 ± 3.4 кг)

В результате фармакокинетического изучения препарата **2** (капсулы № 2; 250, 500 и 1000 мг или 10, 20 и 40 мг/кг) установлено, что большая его часть метаболизируется до фармакологически активного AZT. Фармакокинетические параметры высвобожденного AZT после однократного перорального приема собаками фосфоната **2** приведены в *табл. 1*.

Сравнение фосфоната **2** с AZT и фосфазидом (*табл. 2*) показало, что пиковая концентрация AZT при приеме фосфоната **2** в плазме была ниже, тогда как накопление AZT и время выведения были более длительными. Фармакокинетические параметры AZT, образующегося из фосфоната **2**, были близки к параметрам фосфазиды (C_{max} в 2.5 раза меньше, AUC в 2 раза меньше, но t_{max} и другие параметры больше). Максимальная концентрация AZT после пе-

рорального приема фосфоната **2** достигалась через 4 ч, что в 2 раза больше, чем при приеме AZT, и на 1 ч больше, чем у фосфазиды (*табл. 2*).

Заслуживает внимания, что значения $t_{1/2}$ и t_{max} AZT у собак увеличивались в следующем порядке: AZT < фосфазид < 5'-аминокарбонилфосфонат AZT, что позволяет рассматривать 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** как депо-форму AZT пролонгированного действия.

В плазме крови собак после внутривенного введения субстанции фосфоната **2** в дозе 50 мг (2–5 мг/кг веса тела) AZT не был зафиксирован. Фармакокинетические параметры исходного **2** составляли: $AUC_t = 2.19$ мг·ч/л, $t_{1/2} = 0.35$ ч, MRT = 0.74 ч, CL = 16.8 л/ч, $V_{ss} = 12.4$ л.

Биодоступность 5'-аминокарбонилфосфоната **2** после перорального приема в использованных дозах составляла 4.7%, а биодоступность AZT после перорального приема 2–8%, что в 2 раза меньше, чем у фосфазиды. Биодоступность AZT при пероральном

Таблица 1. Фармакокинетические параметры 5'-аминокарбонилфосфоната **2** и его основного метаболита AZT после однократного перорального приема собаками капсул 5'-аминокарбонилфосфоната **2** в дозах 10, 20 и 40 мг/кг массы тела

Доза 2 , мг	Тестируемое вещество	Фармакокинетические параметры					
		C_{max} , мг/л	t_{max} , ч	AUC_t , мг·ч/л	$t_{1/2}$, ч	MRT, ч	C_{max}/AUC , 1/ч
10	2	0.31 ± 0.09	1.5 ± 0.25	0.47 ± 0.15	0.62 ± 0.1	2.43 ± 0.04	0.662 ± 0.066
	AZT	0.36 ± 0.24	4.7 ± 1.0	2.87 ± 1.56	4.57 ± 1.46	8.90 ± 5.34	0.119 ± 0.033
20	2	0.51 ± 0.18	1.6 ± 0.2	0.98 ± 0.44	0.81 ± 0.2	2.65 ± 0.16	0.561 ± 0.122
	AZT	0.69 ± 0.49	5.0 ± 1.7	6.0 ± 3.3	9.7 ± 4.3	12.0 ± 2.6	0.107 ± 0.023
40	2	0.51 ± 0.26	1.75 ± 0.27	1.25 ± 0.86	0.59 ± 0.2	2.87 ± 0.49	0.478 ± 0.117
	AZT	0.98 ± 0.56	6.0 ± 1.3	10.4 ± 6.1	7.0 ± 2.5	12.2 ± 1.4	0.100 ± 0.016

Примечание. Здесь и в *табл. 2* и *3*: AUC_t – площадь под кривой «концентрация–время»; MRT – время удержания субстанции в тест-ткани; t_{max} – время достижения максимальной концентрации; C_{max} – максимальная концентрация субстанции; $t_{1/2}$ – период полувыведения.

Таблица 2. Сравнение фармакокинетических параметров AZT после однократного перорального приема собаками 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **2**, фосфазиды **1** или AZT в дозах, эквивалентных 20 мг AZT/кг массы тела

Соединение	C_{max} , мг/л	t_{max} , ч	AUC_t , мг·ч/л	$t_{1/2}$, ч	MRT, ч	CL, л/ч
2	0.74 ± 0.03	5	9.2 ± 0.2	9.6 ± 0.2	13.9 ± 0.2	27 ± 2.6
1	1.89 ± 0.07	4	16.6 ± 0.3	7.2 ± 0.3	10.4 ± 0.5	15 ± 0.7
AZT	9.77 ± 0.3	2.5	58.8 ± 1.1	5.2 ± 0.5	7.5 ± 0.4	4.2 ± 0.3

приеме самого AZT была в 6 раз выше, чем в случае фосфоната **2**. Однако высокое значение AUC при приеме AZT связано с избыточной пиковой концентрацией в плазме, которая очень быстро понижается. Это вызывает токсичность и быстрое появление штаммов вируса, устойчивых к воздействию препарата. Напротив, при приеме фосфоната **2** перепад между максимальной и минимальной концентрацией AZT в крови существенно менее выражен, что может способствовать снижению токсичности и замедлению возникновения резистентности.

Кролики породы шиншилла (средний вес 3 ± 0.4 кг) [41]

Изучение фармакокинетики фосфоната **2**, водный раствор которого вводили в желудок кроликов, также подтвердило, что он является депо-формой AZT. AZT не найден в периферической крови кроликов (как и собак), которым фосфонат **2** вводили внутривенно, – единственным обнаруженным продуктом был исходный фосфонат **2** [17]. Это подтверждает гипотезу о том, что AZT образуется во время абсорбции исходного соединения [17].

Сравнение фармакокинетических параметров AZT и фосфоната **2** после однократного перорального приема кроликами фосфоната **2** в дозах 7, 70 и 200 мг/кг веса показало, что AZT присутствовал в крови во всех случаях. При этом характер кривых «концентрация–время» и соотношения AZT и исходного **2** практически не менялись при изменении дозы [39].

Результаты сравнения фармакокинетических свойств AZT после перорального приема кроликами однократной дозы AZT, фосфазида **1** или фосфоната **2** приведены в табл. 3. Следует отметить, что форма кривой зависимости концентрации AZT, высвобожденного из фосфоната **2**, была существенно более гладкой, величины C_{max} AZT, высвобожденного из фосфазида **1** или фосфоната **2**, отличались только в 2 раза, а величины AUC обоих фосфонатов были довольно близкими.

Крысы линии Вистар и мыши линии BALB/c

При пероральном введении крысам (масса тела 200 ± 7 г) фосфоната **2** в дозе 20 мг/кг исходный фосфонат **2** в плазме крови не определялся. Доступным для определения был только его метаболит – AZT, имеющий следующие фармакокинетические параметры: $AUC_{0-t} = 2.27$ мг·ч/л, $MRT = 6.54$ ч, $t_{max} = 4$ ч, $C_{max} = 0.4$ мг/л, $t_{1/2} = 2.45$ ч и $C_{max}/AUC_t = 0.176$ ч⁻¹.

При внутрибрюшинном введении крысам (масса тела 250 ± 10 г) фосфоната **2** в дозе 20 мг/кг, наоборот, в плазме определялся главным образом сам фосфонат **2** и следовые количества его метаболита AZT. Фармакокинетические параметры фосфоната **2** составляли: $AUC_{0-t} = 8.02$ мг·ч/л, $MRT = 0.82$ ч, $CL = 0.45$ л/ч, $t_{1/2} = 0.42$ ч и $V_{ss} = 0.37$ л. Заслуживает внимания тот факт, что после внутрибрюшинного введения мышам фосфоната **2** в дозе 6 г/кг веса в крови выявлен не только исходный фосфонат **2**, но и 3.5% AZT.

Таким образом, 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** высвобождает AZT после введения различными способами (перорально, внутрижелудочно или внутрибрюшинно) экспериментальным животным (мыши, крысы, кролики и собаки) в широком диапазоне доз (7–6000 мг/кг веса) [17]. Фармакокинетические параметры фосфоната **2** и высвобождаемого из него AZT различаются в плазме крови разных видов животных. Эти различия могут быть связаны с особенностями метаболизма у различных животных и/или способами введения препарата.

Линейность фармакокинетики фосфоната **2** по его основному метаболиту AZT позволяет приблизительно рассчитать дозу для человека по результатам, полученным на животных. Так, при однократном пероральном приеме 600 мг фосфоната **2** можно ожидать, что концентрация AZT в плазме крови человека составит 100–115 нг/мл при достаточно пологой фармакокинетической кривой, что существенно превосходит минимальную концентрацию AZT при регулярном (трижды в день по 200 мг) пероральном приеме Зидовудина [42].

Таблица 3. Сравнение фармакокинетических параметров AZT после однократного перорального приема кроликами 5'-аминокарбонилфосфоната AZT **2**, фосфазида **1** или AZT в дозах, эквивалентных 200 мг AZT/кг массы тела

Соединение	C_{max} , мг/л	t_{max} , ч	AUC_t , мг·ч/л	$t_{1/2}$, ч	MRT, ч	CL/F, л/ч
2	3.75 ± 0.01	3.5	25.12 ± 1.08	3.66 ± 0.74	4.72 ± 0.08	44.22 ± 1.95
1	7.38 ± 3.08	2.0	22.99 ± 10.17	1.42 ± 0.12	3.02 ± 0.12	54.95 ± 22.85
AZT	39.64 ± 4.24	1.0	88.5 ± 25.5	2.13 ± 0.71	2.10 ± 0.30	9.40 ± 2.70

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ 5'-АМИНОКАРБОНИЛФОСФОНАТА AZT [41]

Результаты многократного приема 5'-аминокарбонилфосфоната AZT также выглядят многообещающими.

Эксперименты на кроликах показали, что после курсового перорального введения (раствор – 1 г в 4–5 мл воды, прием через 6 и 18 ч в течение 5 дней) фосфоната 2 AZT постепенно накапливается в крови (рисунк). Кроме того, после последней дозы (96 ч после начала эксперимента) AZT детектировался в крови через 66 ч (162 ч от начала эксперимента) [17].

Собакам (средний вес 10.2 ± 1 кг) препарат 2 вводили перорально (600 мг натошак в течение 7 дней с интервалом 24 ч). AZT определялся в плазме на протяжении всего интервала между приемами фосфоната 2. Одинаковые значения C_0 (0.17 ± 0.07 мг/л) и C_{\min} (0.17 ± 0.07 мг/л) на 7-й день курсового введения препарата говорят о достижении равновесного состояния. Значение квазистационарной концентрации составило 0.96 мг/л. Флуктуация уровней AZT в плазме в равновесной стадии (2.82 ± 0.26) была вполне приемлемой.

На 7-й день курсового перорального введения капсул фосфоната 2 отмечалось накопление AZT в организме собак, что выражалось в увеличении значений AUC (в 1.3 раза по сравнению с первым днем приема) и C_{\min} (в 1.7 раза по сравнению с первым днем), а также в удлинении t_{\max} (с 2.7 до 4 ч) и возрастании C_{\max} (с 2.45 до 2.75 мг/л плазмы крови).

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ТКАНЯХ [41]

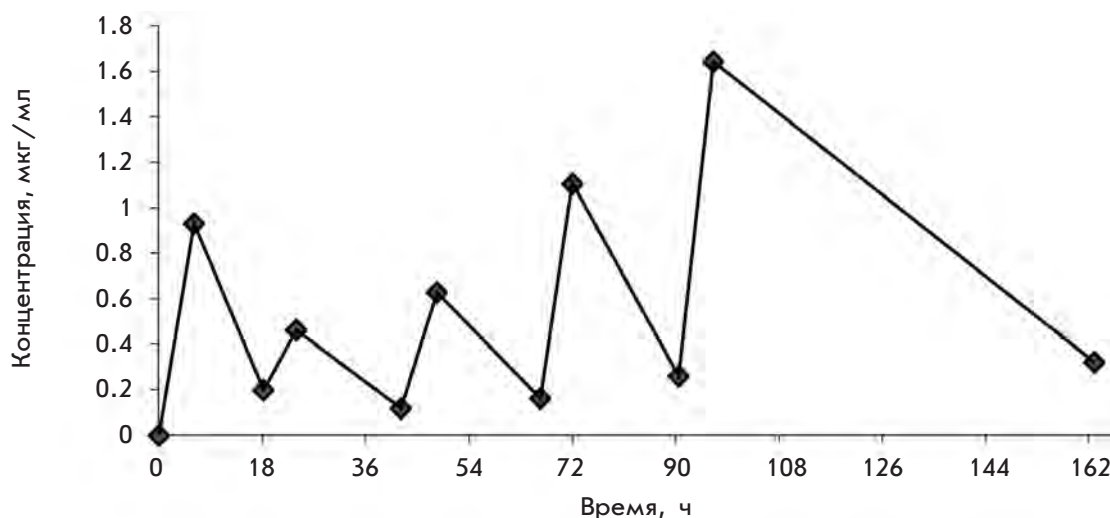
Важный этап фармакокинетических исследований – изучение тканевой доступности новых лекарствен-

ных средств. В результате процессов распределения лекарственное средство транспортируется в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект препарата. Определение величины тканевой доступности позволяет количественно оценить интенсивность проникновения действующего вещества в периферические ткани и орган-мишень.

Распределение AZT, метаболита фосфоната 2, изучали в органах и тканях, отличавшихся степенью кровоснабжения, в органах, обеспечивающих выведение, и в органе – зоне потенциального действия. Были исследованы хорошо васкуляризированные (печень, почки, селезенка, легкие), умеренно васкуляризированные (скелетные мышцы) и слабо васкуляризированные ткани (брыжейка). AZT обнаружили во всех этих органах и тканях, причем его распределение по органам характеризовалось значительной гетерогенностью. Предел количественного определения составлял 10 нг/мл. После однократного перорального введения фосфоната 2 в дозе 100 мг/кг тела AZT определялся в плазме крови и органах крыс в течение 12 ч. При этом тканевая доступность AZT в сильно васкуляризированных органах (печень, селезенка, легкие, почки) была значительно выше, чем в скелетной мускулатуре и брыжейке.

Снижение концентрации AZT в основном носило монофазный характер. Полупериод выведения после перорального введения составил 3.9 ч (плазма крови).

После однократного перорального введения фосфоната 2 в дозе 200 мг/кг исходное соединение не определялось в суточной моче и кале, что может быть обусловлено интенсивной биотрансформацией препарата на фазе всасывания. Обнаружен только



Высвобождение AZT после многократного приема фосфоната 2 кроликами [17]

основной метаболит AZT, который выводится в незначительных количествах (4.11 и 0.04% соответственно от введенной дозы препарата).

ТОКСИЧНОСТЬ [41]

Результаты исследования токсичности на мышах подтвердили предположение о том, что медленное накопление в крови и более медленное выведение AZT, высвобожденного из фосфоната **2**, по сравнению с AZT, введенным непосредственно и высвобожденным при введении фосфазида, может привести к уменьшению токсичности. Действительно, фосфонат **2** является малотоксичным препаратом, что подтверждается результатами опытов по определению острой токсичности (мыши линии BALB/c и крысы Вистар) и хронических экспериментов (крысы Вистар, беспородные собаки). Однократное введение препарата мышам и крысам в испытанных токсических дозах (2000–50000 мг/кг) сопровождалось кратковременным возбуждением животных, сменявшимся угнетенным состоянием, вялостью и адинамией. Средняя летальная доза (LD₅₀) фосфоната **2** при внутрибрюшинном введении мышам составила ≥ 5 г/кг по сравнению с 1.5 и 2.3 г/кг для AZT и фосфазида соответственно. LD₅₀ при однократном введении в желудок крысам превысила 40 г/кг.

Токсичность фосфоната **2** изучали в условиях хронического эксперимента на крысах, которым ежедневно в течение 3 мес. внутрижелудочно вводили этот препарат в дозе 133 и 266 мг/кг. Испытанные дозы препарата превышали высшую суточную терапевтическую дозу для человека в 10 и 20 раз (13.3 мг/кг веса). Оказалось, что соединение **2** в испытанных дозах хорошо переносится животными и не влияет на функциональное состояние основных органов и систем организма (по данным биохимических тестов), а также на гематологические показатели. Отсутствие токсических повреждений внутренних органов и местного раздражающего действия подтверждено при патоморфологическом исследовании, проведенном после окончания эксперимента.

Токсичность лекарственной формы фосфоната **2** (капсулы для приема внутрь по 200 мг) оценивали на собаках, которым в течение 4 нед. ежедневно внутрижелудочно вводили препарат в дозе 166 мг/кг (12.5-кратная высшая терапевтическая доза, рекомендованная для человека). Установлено, что данная лекарственная форма хорошо переносится животными и по данным биохимических тестов не влияет на функциональное состояние внутренних органов, а также на их гематологические показатели. Отсутствие токсических повреждений внутренних органов и местного раздражающего действия фосфоната **2** в виде капсул при длительном введении в желудок

собакам подтверждено результатами патоморфологических исследований.

Для оценки мутагенных свойств фосфоната **2** изучили его способность вызывать генные мутации в индикаторных штаммах *Salmonella typhimurium* в тесте Эймса, вызывать хромосомные aberrации в клетках костного мозга гибридных мышей F1(CBAxС57Bl6) и влиять на количество доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей. Показано, что фосфонат **2** в концентрации до 1 мг на чашку не вызывает статистически значимого увеличения числа ревертантов в тесте Эймса. В дозах, более чем в 50 раз превосходящих высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для человека, фосфонат **2** не показал мутагенности в тестах *in vivo*: он не вызывал увеличения числа хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей и не влиял на количество доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей.

При ежедневном внутрижелудочном введении соединения **2** в дозе 133 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза, рекомендованная для человека) крысам Вистар (самцам в течение 10 нед., самкам – в течение 2 нед.) не установлено влияния препарата на репродуктивную функцию животных.

При ежедневном введении в желудок беременным крысам с 1 по 19 день гестации в дозе 133 мг/кг фосфонат **2** не влиял на увеличение массы тела беременных крыс, продолжительность беременности, количество желтых тел, мест имплантации, массу тела эмбрионов, их кранио-каудальный размер, показатели пред- и постимплантационной гибели плодов, а также постнатальное развитие крысят. Прием соединения **2** не вызывал каких-либо уродств или пороков развития эмбрионов, иными словами, оно не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действием.

Аллергизирующие свойства фосфоната **2** были изучены на морских свинках. Установлено, что при 5-кратном внутрижелудочном введении препарата в сенсibilизирующих дозах, 133 и 266 мг/кг, и внутрижелудочном введении разрешающей дозы препарата 266 мг/кг на 14 и 21 день после сенсibilизации фосфонат **2** не вызывает анафилактического шока. Препарат в испытанных дозах и схемах сенсibilизации не проявляет аллергизирующего действия в реакции гиперчувствительности типа III у морских свинок. Кроме того, показано, что фосфонат **2** не влияет на реакцию подколенного лимфоузла у мышей.

В дозах 166 и 332 мг/кг (12.5- и 25-кратные высшие терапевтические дозы, рекомендованные для человека) фосфонат **2** не влияет на число ядросодержащих клеток в селезенке, а также на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей. В наи-

большей из испытанных доз (332 мг/кг) фосфонат **2** несколько снижает первичный иммунный ответ у мышей F1(CВАхС57В16).

Таким образом, доказано, что 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** значительно менее токсичен, чем утвержденные лекарственные препараты Ретровир и Никавир, не обладает мутагенными и алергизирующими свойствами, а также иммунотоксичностью, эмбриотоксичностью и тератогенностью, и не влияет на репродуктивную функцию животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Усилия многочисленных исследователей привели к тому, что были синтезированы более 100 новых потенциальных депо-форм, основанных на 5'-фосфонатной модификации AZT, и проверена их анти-ВИЧ-активность. Никавир® является первым 5'-фосфонатом AZT, который стал использоваться в качестве анти-ВИЧ-препарата. В настоящее время закончены доклинические испытания еще одного фосфоната, 5'-аминокарбонилфосфоната AZT, и получены обнадеживающие результаты. Фармакокинетические исследования, проведенные на животных, показали, что при приеме внутрь фосфонат **2** в значительной степени превращается в AZT, причем

фармакокинетические параметры AZT указывают на пролонгацию его фармакологического действия.

Анализ совокупности доклинических токсикологических и фармакологических данных позволяет рекомендовать фосфонат **2** для клинических исследований. Фармакокинетические свойства этого соединения, по-видимому, позволяют использовать созданный на его основе препарат раз в сутки, в отличие от Зидовудина, который применяется 2–3 раза в сутки. Из-за меньшей токсичности фосфонат **2** может применяться не только для профилактики вертикальной передачи ВИЧ, но также у детей и ВИЧ-инфицированных пациентов с нарушенной функцией печени.

Таким образом, 5'-аминокарбонилфосфонат AZT **2** имеет превосходный потенциал как альтернатива AZT и заслуживает дальнейшего исследования. ●

Авторы благодарны М.К. Кухановой и С.Н. Кочеткову за полезные дискуссии и помощь в работе.

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-00581) и Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Clercq E. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1587. P. 258–275.
- Groschel B., Cinatl J.H., Cinatl J., Jr. // Intervirology. 1997. V. 40. P. 400–407.
- Antonelli G., Turriziani O., Verri A., Narcisco P., Ferri F., D'Offizi G., Dianzani F. // AIDS Res. Hum. Retrovir. 1996. V. 12. P. 223–228.
- Chariot P., Drogou I., De Lacroix-Szmania I., Eliezer-Vanerot M.C., Chazaud B., Lombès A., Schaeffer A., Zafrani E.S. // J. Hepatol. 1999. V. 30. P. 156–160.
- Gelmon K., Montaner J.S.G., Fanning M., Smith J.R.M., Falutz J., Tsoukas C., Gill J., Wells G., O'Shaughnessy M., Wainberg M., Ruedy J. // AIDS. 1989. V. 3. № 9. P. 555–561.
- Pan-Zhou X.-R., Cui L., Zhou X.-J., Sommadossi J.-P., Darley-Usmar V.M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 496–503.
- Chiao S.K., Romero D.L., Johnson D.E. // Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2009. V. 12. № 1. P. 53–60.
- Kellam P., Boucher C.A., Larder B.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 1934–1938.
- Ren J., Esnouf R.M., Hopkins A.L., Jones E.Y., Kirby I., Keeling J., Ross C.K., Larder B.A., Stuart D.I., Stammers D.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 9518–9523.
- Stanczak A., Ferra A. // Pharmacol. Rept. 2006. V. 58. № 5. P. 599–613.
- Beaumont K., Webster R., Gardner I., Dack K. // Curr. Drug Metab. 2003. V. 4. № 6. P. 461–485.
- Calogeropoulou T., Detsi A., Lekkas E., Koufaki M. // Curr. Top. Med. Chem. 2003. V. 3. № 13. P. 1467–1495.
- Khorlin A.A., Tarusova N.B., Dyatkina N.B., Kraevsky A.A., Bibilashvili R.Sh., Galegov G.A., Korneeva M.N., Nosik D.N., Maiorova S.N., Shobukhov V.M., Zhdanov V.V. 5'-Phosphonates of 2',3'-dideoxynucleosides. RF1548182, 1992; US5043437, 1991; EP0354246, 1994; Japan 0354246 B1, 1995; Korean 106957, 1996.
- Yurin O., Kravtchenko A., Serebrovskaya L., Golochvastova E., Burova N., Voronin E., Pokrovsky V. The phase 1 of the clinical trial of 'Phosphazid', the new reverse transcriptase inhibitor. 4th Intern. Congress on drug therapy in HIV-infection. Glasgow, UK, 1998. V. 12. № 4. P. 240.
- Юрин О.Г., Краевский А.А., Афонина Л.Ю., Балаганин В.А., Бурова Н.В., Воронин Е.Е., Колесник А.Н., Молодов И.Б., Мошкочич Г.Ф., Покровский В.В. // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2001. № 1. С. 43–45.
- Тарусова Н.Б., Хорлин А.А., Краевский А.А. Корнилаева М.Н., Носик Д.Н., Круглов Н.Б., Галегов Г.А., Бибилашвили Р.Ш. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. № 6. С. 1716–1724.
- Khandazhinskaya A., Matyugina E., Shirokova E. // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2010. V. 6. № 6. P. 1–14.
- Krayevsky A.A., Tarusova N.B., Zhu Q.Y., Vidal P., Chou T.C., Baron P., Polsky B., Jiang X.J., Matulic-Adamic J., Rosenberg I., Watanabe K.A. // Nucleosides & Nucleotides. 1992. V. 11. № 2–4. P. 177–196.
- Tarusova N.B., Kukhanova M.K., Krayevsky A.A., Karamov E.V., Lukashov V.V., Kornyalayeva G.V., Rodina M.A., Galegov G.A. // Nucleosides & Nucleotides. 1991. V. 10. № 1–3. P. 351–354.
- Gosselin G., Perigaud C., Lefebvre I., Pompou A., Aubertin A.M., Kern A., Azabo T., Stawinski J., Imbach J.L. // Antiviral. Res. 1993. V. 22. № 2–3. P. 143–153.
- McGuigan C., Bellevergue P., Jones B.C.N.M., Mahmood N., Hay A.J., Petrik J., Karpas A. // Antivir. Chem.

- Chemother. 1994. V. 5. P. 271–277.
22. Machado J., Salomon H., Olivera M., Tsoukas C., Kravetsky A., Wainberg M. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1999. V. 18. № 4–5. P. 901–906.
23. Skoblov Yu., Karpenko I., Shirokova E., Popov K., Andronova V., Galegov G., Kukhanova M. // *Antiviral Res.* 2004. V. 63. № 2. P. 107–113.
24. Кравченко А.В., Саламов Г.Г., Богословская Е.Г., Сергиенко О.Г., Покровский В.В. // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2001. № 4. С. 32–35.
25. Кравченко А.В., Ситдыкова Ю.Р., Серебровская Л.В., Богословская Е.В., Иванова Л.А., Покровский В.В. // *Инфекционные болезни*. 2003. Т. 1. № 1. С. 14–19.
26. Кравченко А.В., Канестри В.Г., Ганкина Н.Ю. // *Инфекционные болезни*. 2011. Т. 9. № 4. С. 64–69.
27. Ганкина Н.Ю., Кравченко А.В., Куимова У.А., Канестри В.Г. // *Инфекционные болезни*. 2010. Т. 8. № 1. С. 14–18.
28. Пантелеев А.М., Голиусова М.Ю., Кабанов В.И. // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия*. 2010. № 2. С. 75–79.
29. Иванова Э.С., Шмагель Н.Г., Воробьева Н.Н. // *Вопр. вирусологии*. 2010. Т. 55. № 2. С. 31–34.
30. Ivanova E.S., Shmagel N.G., Vorobyova N.N. // *Nikavir in Chemoprevention Regimens of Vertical HIV Transmission* / Ed. Fyson Hanania Kasenga, Publ.: InTech, DOI: 10.5772/24428.
31. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Афонина Л.Ю., Ермак Т.Н., Буравцова Е.В., Шахгильдян В.И., Козырина Н.В., Нарсия Р.С. и др. // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. Приложение*. 2012. № 6. С. 1–28.
32. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Karpenko I.L., Zakirova N.F., Tarussova N.B., Kravetsky A.A. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2000. V. 19. № 10–12. P. 1795–1804.
33. Pokrovsky A.G., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Tarussova N.B., Karpenko I.L., Kravetsky A.A. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2001. V. 20. № 4–7. P. 767–769.
34. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Jasko M.V., Yanvarev D.V., Ivanov A.V., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., Pokrovsky A.G., Kukhanova M.K. // *Collection Symp. Ser.* 2002. V. 5. P. 93–98.
35. Shirokova E.A., Jasko M.V., Khandazhinskaya A.L., Yanvarev D.V., Skoblov Y.S., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., Pokrovsky A.G., Kukhanova M.K. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2003. V. 22. № 5–8. P. 981–985.
36. Shirokova E.A., Jasko M.V., Khandazhinskaya A.L., Ivanov A.V., Yanvarev D.V., Skoblov Yu.S., Mitkevich V.A., Bocharov E.V., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., et al. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. № 14. P. 3606–3614.
37. Куханова М.К. // *Молекуляр. биология*. 2012. Т. 46. № 6. С. 860–873.
38. Shirokova E.A., Khandazhinskaya A.L., Jasko M.V., Kukhanova M.K., Shipitsyn A.V., Pokrovsky A.G. Modified 5'-phosphonate azidothymidine – potential anti-viral preparations. US Pat. 7,999,099. EP1829885A1.
39. Khandazhinskaya A.L., Yanvarev D.V., Jasko M.V., Shipitsyn A.V., Khalizev V.A., Shram S.I., Skoblov Y.S., Shirokova E.A., Kukhanova M.K. // *Drug Metab. Dispos.* 2009. V. 37. № 3. P. 494–501.
40. Kukhanova M.K., Jasko M.V., Yanvarev D., Karpenko I., Shipitsyn A.V., Khandazhinskaya A.L. // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)*. 2008. V. 52. P. 597–598.
41. Результаты доклинических испытаний представлены ЗАО «Производственно-коммерческая ассоциация АЗТ». Досье на регистрацию лекарственного препарата 6НР. Вх. № 421549 от 23.12.2011.
42. Cato A. 3rd, Qian J., Hsu A., Levy B., Leonard J., Gran-neman R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. V. 42. № 7. P. 1788–1793.

УДК 577.29

Клатрин-зависимый эндоцитоз и белки-адаптеры

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

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

*E-mail: n.popova@gmail.com

Поступила в редакцию 18.10.2012

РЕФЕРАТ Поступление в цитоплазму эукариотических клеток макромолекул реализуется несколькими способами, из которых наиболее хорошо изучен клатрин-зависимый эндоцитоз. Хотя механизм клатрин-зависимого эндоцитоза в общих чертах понятен, постоянно обнаруживаются новые адаптерные белки, играющие различные роли в обеспечении специфической регуляции этого процесса. В обзоре рассмотрен механизм клатрин-зависимой интернализации активированных рецепторов, сопряженных с G-белками, а также приведено описание основных белков, участвующих в этом процессе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белки-адаптеры, клатрин, эндоцитоз.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EEA1 (Early Endosome Antigen 1) – антиген ранних эндосом 1; GPCR (G-Protein-Coupled Receptor) – рецептор, сопряженный с G-белками; GRK (G-protein-coupled Receptor Kinase) – киназа GPCR; LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor) – рецептор липопротеинов низкой плотности; PtdIns(4,5)P₂ (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат.

ВВЕДЕНИЕ

Эндоцитоз – фундаментальный процесс, обеспечивающий поступление в цитоплазму внеклеточных или расположенных на мембране макромолекул. Эндоцитоз необходим и для поступления в клетку питательных веществ, регуляции активности трансмембранных рецепторов, а также рециркуляции синаптических пузырьков. Клатрин-зависимый эндоцитоз – это вхождение фрагментов цитоплазматической мембраны вместе со всем содержимым в клетку в виде пузырьков, покрытых снаружи решеткой из полимеризованного клатрина. В частности, по клатрин-зависимому механизму осуществляется эндоцитоз активированных рецепторов, находящихся на поверхности клетки. После связывания молекулы рецептора с лигандом и его активации возможным становится связывание внутриклеточной части рецептора с белками-адаптерами, которые опосредуют взаимодействие рецепторов с молекулами клатрина, образующими впоследствии оболочку пузырька. В настоящее время известно несколько классов адаптерных белков.

ЭНДОЦИТОЗ РЕЦЕПТОРОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С G-БЕЛКАМИ, КАК ПРИМЕР КЛАТРИН-ЗАВИСИМОГО ЭНДОЦИТОЗА

Суперсемейство рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), считается самым большим семейством мембранных белков, участвующих в пере-

даче сигналов внутрь клетки [1]. Общая структурная особенность GPCR – наличие семи α -спиральных трансмембранных гидрофобных сегментов, каждый из которых образован 25–35 аминокислотными остатками [2]. N-Концевая часть GPCR и три петли между трансмембранными сегментами находятся снаружи клетки, а C-концевая часть и три другие петли обращены в цитоплазму.

Лигандами различных GPCR служат ионы, органические одоранты, амины, пептиды, белки, липиды, нуклеотиды и фотоны. Активация рецепторов лигандом приводит к образованию комплексов рецепторов с трехсубъединичными (гетеротримерными) G-белками и обмену связанного с ними GDP на GTP. Этот обмен вызывает диссоциацию G-белка на α -субъединицу, связанную с GTP, и комплекс из β - и γ -субъединиц, а также отделение всех трех субъединиц G-белка от рецептора. В настоящее время доказано, что как α -субъединица, так и комплекс $\beta\gamma$ служат передатчиками сигналов, активируя или ингибируя ферменты и ионные каналы [3]. После взаимодействия с эффектором происходит гидролиз связанного GTP и воссоединение α -субъединицы с $\beta\gamma$ в трехсубъединичный комплекс со связанным GDP, способный вновь взаимодействовать с активированным рецептором [4].

Взаимодействие лиганда с рецептором приводит к конформационным изменениям, которые дают начало не только опосредованной G-белками передаче сигнала, но также превращают рецептор

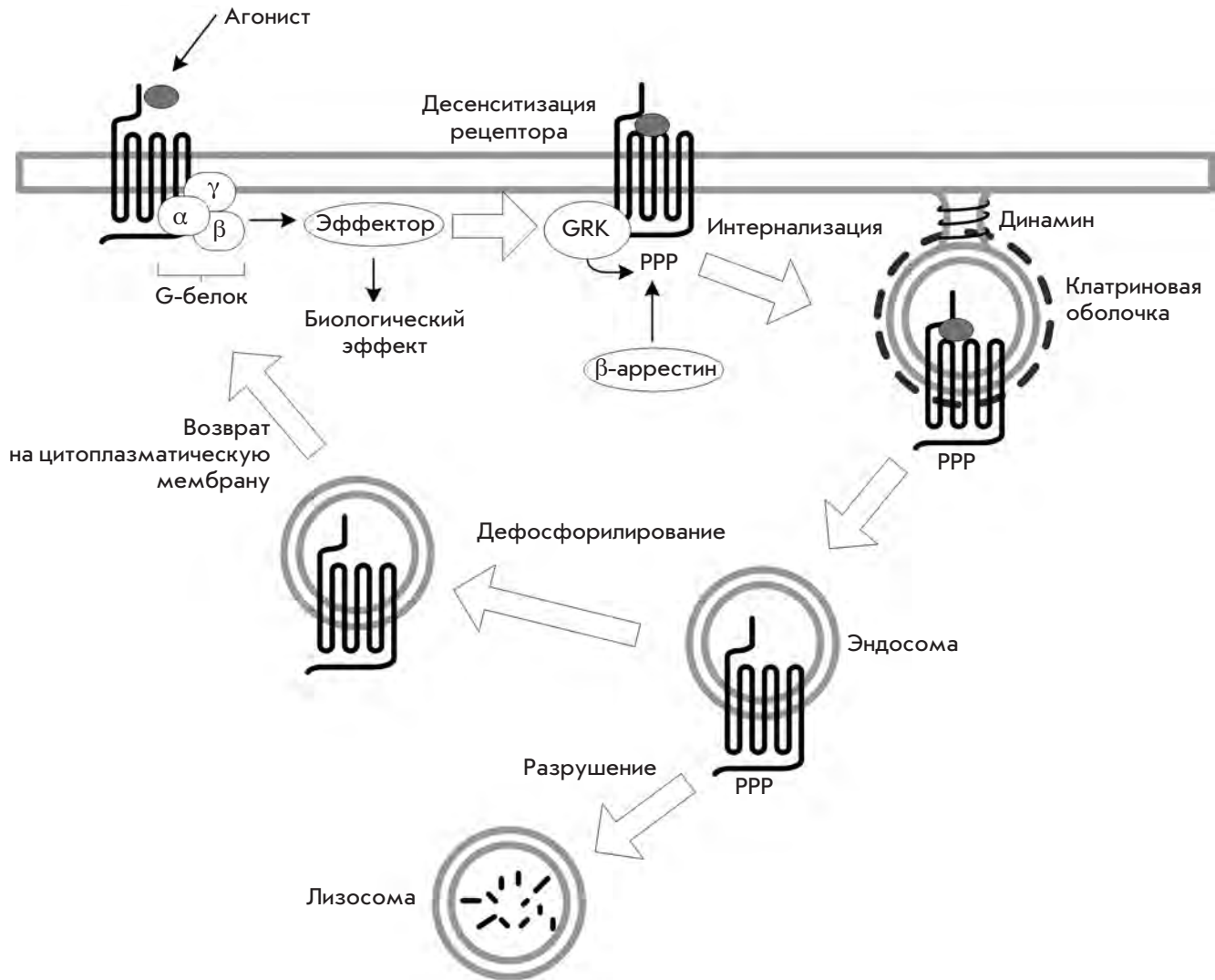


Рис. 1. Схема клатрин-зависимой интернализации рецептора после активации

в субстрат для протеинкиназы GRK (киназы рецепторов, сопряженных с G-белками). Активированный лигандом рецептор фосфорилируется по остаткам серина или треонина, расположенным в цитоплазматической части и/или в третьей цитоплазматической петле. Затем с активированным и фосфорилированным рецептором связываются β-аррестины [5]. β-Аррестины играют существенную роль в процессе интернализации GPCR, так как их связывание приводит к клатрин-зависимому эндоцитозу рецептора за счет взаимодействия с компонентами эндоцитозного механизма – клатрином и адаптерным белковым комплексом AP-2 [6, 7].

Сформировавшиеся покрытые клатрином пузырьки, содержащие рецептор, отсоединяются от цитоплазматической мембраны при помощи белка динамина, стягивающего горлышко формирующихся

пузырьков [8]. Интернализованный комплекс рецептора с лигандом, отделившийся в составе пузырьков, подвергается далее внутриклеточному транспорту. Первая стадия на этом пути – образование ранних эндосом. Считается, что канонические ранние эндосомы содержат малую GTP-азу Rab5 и антиген ранних эндосом EEA1. Во многих случаях интернализованный рецептор все еще остается доступным для молекул внутриклеточного сигнального каскада и, следовательно, может продолжать передавать сигнал так же, как и при локализации на мембране [9]. Далее в зависимости от типа рецептора возможен один из двух вариантов. Рецептор либо избавляется от связанного лиганда и повторно направляется к поверхности клетки (ресенситизация), либо переходит в поздние эндосомы и далее подвергается деградации в лизосомах (рис. 1). Может наблюдаться также смена маршрута

отдельных рецепторов в зависимости от того, была ли активация кратковременной или длительной/повторной [10]. Так, например, β 2-адренорецептор после краткосрочной активации агонистом преимущественно возвращается на цитоплазматическую мембрану (рециклирует), но в результате длительной активации может направляться для деградации в лизосомы, что приведет к уменьшению числа рецепторов на мембране (downregulation) [10].

Возвращение на цитоплазматическую мембрану может происходить как по быстрому маршруту через Rab4-содержащие эндосомы, так и по медленному, через Rab11-содержащие рециклирующие эндосомы [11]. Принято считать, что в поздние эндосомы попадают рецепторы, предназначенные для деградации. Переход от ранних эндосом к поздним сопровождается заменой белка Rab5 белком Rab7 – так называемой «Rab-конверсией» [12].

МЕХАНИЗМ КЛАТРИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ

Клатрин-покрытый пузырек – трехслойная структура, внешний слой которой образован клатрином (клатриновая решетка), внутренний – это липидная мембрана с белковыми включениями, а между ними находятся адаптерные белки. Адаптерные белковые комплексы взаимодействуют непосредственно с липидным бислоем, а клатрин, в свою очередь, связывается с адаптерами [13].

Предполагается, что эндоцитоз начинается с образования на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны «ямки», содержащих клатрин, адаптерный белковый комплекс AP-2 и вспомогательные белки [14]. Субъединицы адаптерного комплекса вызывают образование клатриновой решетки в определенных участках цитоплазматической мембраны и опосредуют взаимодействие клатрина с белком-грузом, предназначенным для эндоцитоза [15]. AP-2 играет важную роль в выборе мишени для эндоцитоза, связываясь либо непосредственно с трансмембранным белком-грузом, содержащим необходимые последовательности, либо через вспомогательные белки, например β -аррестины [16]. Связывание AP-2 с мембраной представляет собой двухступенчатый процесс. Сначала α -субъединица AP-2 слабо связывается с фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатом (PtdIns(4,5)P₂). Аффинность AP-2 к соответствующим эндоцитозным мотивам увеличивается при фосфорилировании остатка треонина в μ 2-субъединице AP-2 [17] киназой 1, ассоциированной с адаптером [18, 19]. Это фосфорилирование позволяет μ 2-субъединице связаться с мотивами эндоцитируемого белка-груза и PtdIns(4,5)P₂ в мембране, создавая основу для формирования покрытого

клатрином пузырька. Далее с адаптерным комплексом могут связаться другие вспомогательные белки, например CALM, необходимые для образования правильной клатриновой решетки. Удаление этого белка из клетки приводит к формированию крупных несимметричных клатрин-покрытых «ямок» [20]. Одновременно с полимеризацией клатрина в процесс вовлекается множество других белков, требуемых для контроля впячивания цитоплазматической мембраны и образования на ней «ямки». Считается, что искривление мембраны обеспечивается несколькими белками, содержащими BAR-домены (Bin/amphiphysin/Rvs) [21], такими, как амфифизин [22] и эндофилин [23]. Белок эпсин также способен стимулировать искривление мембраны [24]. Полимеризующийся клатрин образует решетку (состоящую из гексагонов и пентагонов) вокруг формирующейся «ямки» и таким образом стабилизирует искривление мембраны [25].

Дальнейшая деформация мембраны и полимеризация клатрина приводят к тому, что клатрин-покрытый пузырек остается связанным с основной частью мембраны только посредством узкого перешейка, и для полного отсоединения пузырька необходима GTP-аза динамин. Амфифизин, уже входящий в состав пузырька, имеет сайты связывания как с клатрином, так и с динамином. Предполагается, что он «привлекает» к формирующемуся пузырьку динамин и облегчает его олигомеризацию [26]. Согласно двум предложенным моделям, после полимеризации динамина вокруг перешейка пузырька изменение его структуры, зависимое от гидролиза GTP, приводит к стягиванию (первая модель) или удлинению (вторая модель) перешейка и отделению пузырька от остальной мембраны [27].

Удаление клатриновой оболочки с поверхности пузырька необходимо для дальнейшего слияния пузырька с целевой мембраной и доставки эндоцитированного «груза» к месту назначения. Основные участники процесса деполимеризации клатриновой оболочки – белки Hsc70 и ауксилилин. Ауксилилин, гомолог Hsp40, связывает клатрин и притягивает Hsc70, который взаимодействует с его J-доменом. В результате взаимодействия с ауксилилином возрастает АТФ-азная активность Hsc70, и он сильнее связывается с клатрином, искажая при этом конформацию и способствуя разборке клатриновой решетки на отдельные молекулы [28, 29]. Слой, образованный адаптерным комплексом, удаляется в результате дефосфорилирования AP-белков фосфатазами, как показано для μ 1-субъединицы AP-1 [30]. Белки синаптоянин и эндофилин дефосфорилируют фосфолипиды мембраны, уменьшая таким образом сродство адаптеров к пузырькам [31].

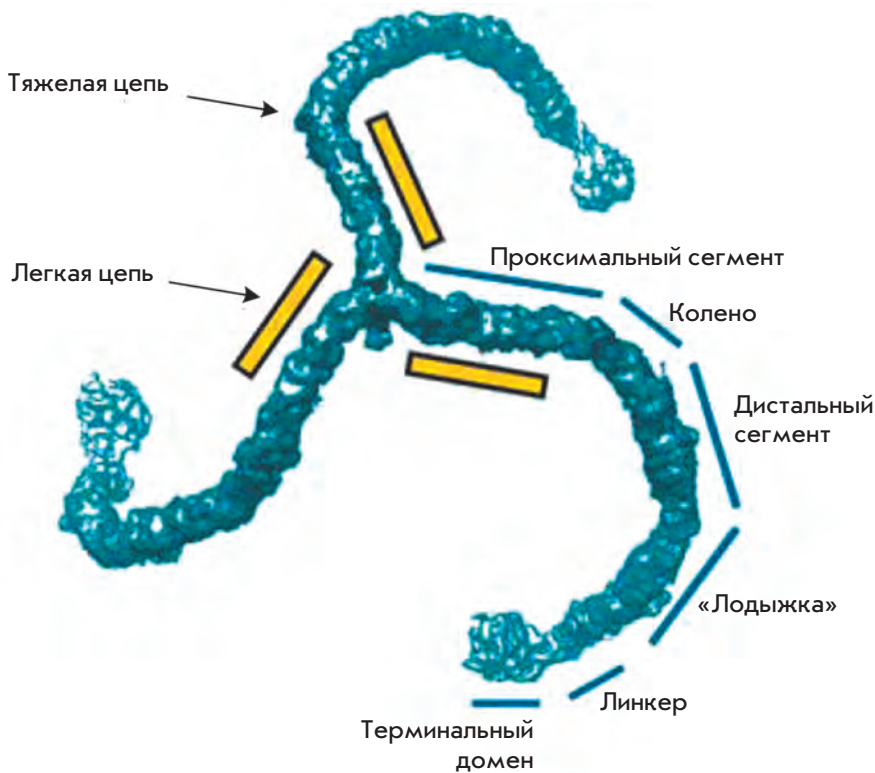


Рис. 2. Молекула клатрина (трискелион). Обозначены сегменты тяжелой цепи клатрина. N-Концевым доменом является терминальный домен, а С-концевые домены располагаются в центре молекулы. Положение легких цепей указано схематично. Рисунок из [40]

ОСНОВНЫЕ БЕЛКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В КЛАТРИН-ОПОСРЕДОВАННОМ ЭНДОЦИТОЗЕ

Киназы рецепторов, сопряженных с G-белками, и β -аррестины

Описано большое количество белков, способных прямо взаимодействовать с GPCR [32]. Однако, кроме G-белков, известно только два класса белков, специфически взаимодействующих с рецепторами, активированными лигандом: протеинкиназы GPCR (GRK) и β -аррестины [33].

Семейство GRK включает продукты семи различных генов. Экспрессия GRK1 и -7 ограничена палочками и колбочками сетчатки соответственно. GRK4 экспрессируется только в мозжечке, семенниках и почках. GRK2, -3, -5 и -6, напротив, широко представлены в тканях млекопитающих. По гомологии аминокислотных последовательностей семь киназ подразделяют на три подсемейства. GRK1 и -7; GRK2 и -3 содержат домен, гомологичный плекстрину, а локализация этих киназ на клеточной мембране зависит от взаимодействия с $G_{\beta\gamma}$ -субъединицей G-белков и PtdIns(4,5)P₂; белки GRK4–6 постоянно ассоциированы с мембраной [34].

К аррестинам относятся четыре белка. Аррестины 1 и 4 (α -аррестин) экспрессируются в палочках и колбочках сетчатки соответственно. Аррестины 2 и 3 (известные так же, как β -аррестины 1 и 2) представлены

во всех тканях [5]. GRK и аррестины управляют активностью GPCR на трех уровнях: (1) сайленсинга – функционального отделения рецептора от его G-белка; (2) регуляции транспорта – удаления рецептора с цитоплазматической мембраны (интернализация), повторного возвращения на мембрану и/или деградации; и (3) проведения сигнала – активации или ингибирования внутриклеточных сигнальных путей независимо от G-белков. N-Концевая часть аррестина 1 [35], а также аррестин 2 и 3 [36, 37] содержит области, отвечающие за узнавание активированных агонистами фосфорилированных GPCR. Согласно предложенной модели, заряженные фосфатные группы рецептора разрушают полярное ядро аррестина, что в результате приводит к высвобождению его С-концевой части, которая отвечает за связывание с белками эндоцитоза – клатрином и AP-2 [38].

Клатрин

Клатрином назван основной (мажорный) белок клатрин-покрытых пузырьков, выделенных Пирс [39], поскольку он обладал способностью формировать структуры с упорядоченной сеткой или «клатратами». Молекула клатрина напоминает трискелион (образовано от греч. τρισκελης – трехногий – символического знака, представляющего собой три бегущие ноги, выходящие из одной точки), она состоит из трех тяжелых и трех легких цепей [40] (рис. 2).

Тяжелая цепь клатрина (heavy chain, HC), выделенного из головного мозга крысы, состоит из 1675 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу чуть более 191 кДа (приблизительно 180 кДа по данным денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-ПААГ)). Аминокислотные последовательности тяжелой цепи клатрина из головного мозга человека, крысы и быка высококонсервативны (~99%) [41]. Тяжелые цепи клатрина выделены также из клатрин-покрытых пузырьков дрожжей [42] и растений [43].

Каждая тяжелая цепь клатрина находится в комплексе с одной из легких цепей: LC_a или LC_b, кодируемых разными генами. Аминокислотные последовательности легких цепей очень консервативны у разных видов (95–98%). Электрофоретическая подвижность легких цепей, состоящих из 230–250 аминокислотных остатков, в SDS-ПААГ соответствует молекулярной массе приблизительно 30–40 кДа. В легкой цепи выделяют три домена: консервативный C-концевой, центральный α -спиральный и кислый N-концевой. Гомология обеих цепей на уровне аминокислотных последовательностей достигает 60% [41]. Наибольшей консервативностью характеризуются участок из 22 аминокислотных остатков, расположенный на N-конце молекулы, сайт связывания с тяжелой цепью клатрина, остатки цистеина вблизи C-концевой части, а также обогащенный остатками серина сайт фосфорилирования казеинкиназой II в легкой цепи LC_b [44]. Легкие цепи связываются с проксимальными доменами тяжелых цепей клатрина [45], основное связывание обеспечивают аминокислотные остатки 1267–1522 тяжелой цепи, остатки 93–160 легкой цепи LC_a и 90–157 LC_b [46].

На пересечении тяжелых цепей клатрина находятся области, необходимые для тримеризации тяжелых цепей, связывания легких цепей и образования клатриновой решетки [47, 48]. Домен, обеспечивающий тримеризацию тяжелых цепей, локализован между аминокислотными остатками 1488 и 1587.

Два сайта связывания клатрина с адаптерными белками находятся в N-концевом домене. С первым сайтом взаимодействуют пептиды, содержащие «клатриновый бокс» (LØXØ[D/E], где Ø – крупная гидрофобная аминокислота). В качестве примера белков, содержащих такой мотив, можно привести β -адаптины (последовательность LLNLD найдена в β -адаптинах 1 и 2, LLDLD – в β -адаптиве 3), β -аррестины 1 (LIELD) и 2 (LIEFE) и амфифизины 1 и 2 (LLDLD) [49]. Со вторым сайтом связываются белки, содержащие мотив W-бокс (PWXXW, где X – любая аминокислота), как, например, в молекулах уже упомянутых амфифизинов 1 и 2 [50].



Рис. 3. Модель гексагонального клатринового пузырька (разрешение 7.9 Å). Указаны только тяжелые цепи клатрина. Рисунок из [40]

В слабокислых Ca²⁺-содержащих буферах с низкой ионной силой молекулы клатрина спонтанно самоорганизуются, образуя гетерогенную популяцию замкнутых многогранных структур, напоминающих решетку [51, 52]. Вершина каждого трискелиона располагается в вершине решетки. «Ноги» тяжелых цепей и связанные с ними легкие цепи отходят наружу от вершины, образуя ребра решетки (рис. 3).

Все тяжелые цепи образуют два смежных ребра многогранной решетки. «Ноги», по всей видимости, взаимодействуют через проксимальные и дистальные домены. Каждое ребро состоит из двух антипараллельных проксимальных доменов, под которыми лежат два антипараллельных дистальных домена [53]. Фрагменты клатрина, полученные экспрессией в гетерологичной системе и состоящие из проксимального домена и участка, необходимого для тримеризации, способны самостоятельно формировать тримеры, но не могут образовывать решетки. Для образования клатриновой решетки необходимы дистальные домены, правильно ориентируемые посредством связывания терминальных доменов с адаптерными белками [54]. В решетке терминаль-

ные домены направлены внутрь по направлению к центру и находятся под вершиной, расположенной на расстоянии двух вершин от центра трискелиона. Терминальные домены здесь принимают вид крюков-выступов, обеспечивающих точки контакта с внутренним слоем, образованным адаптерными белками [55].

Интересно, что клатрин участвует не только в эндоцитозе, но и в митозе. Предполагается, что он необходим для стабилизации микротрубочек, крепящихся к кинетохору (так называемые К-пучки) [56].

Адаптерные белковые комплексы AP

Второй основной белок клатрин-покрытых пузырьков – адаптерный белковый комплекс. Он был открыт благодаря своей способности стимулировать сборку клатриновой решетки в физиологических условиях [57]. Хорошо изучены как минимум два адаптерных комплекса – AP-1 и AP-2. Эти комплексы обладают структурным сходством и состоят из двух различных высокомолекулярных субъединиц с молекулярной массой ~100 кДа (обычно их называют адаптинами), двух субъединиц среднего размера (47–50 кДа) и двух низкомолекулярных субъединиц (17–19 кДа). В комплекс AP-2 входят следующие субъединицы: α и $\beta 2$ (или β) адаптины, субъединица $\mu 2$ (50 кДа), или AP50 и субъединица $\sigma 2$ (17 кДа), или AP17. Комплекс AP-1 содержит γ и $\beta 1$ (или β') адаптины, AP47 (или $\mu 1$) и AP19 (или $\sigma 1$) [58].

Обозначение одинаковыми буквами греческого алфавита отражает структурное и, предположительно, функциональное сходство субъединиц комплексов AP-1 и AP-2 [59, 60]. α - и γ -Адаптины различаются наиболее существенно (~30% гомологии аминокислотных последовательностей), в то время как μ - и σ -субъединицы комплекса AP-1 в значительной степени (~50%) гомологичны соответствующим μ - и σ -субъединицам комплекса AP-2, а $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адаптины высокогомологичны (> 90%). Известны также комплексы AP-3 и AP-4, сходные по составу субъединиц: δ и $\beta 3$, $\mu 3$, $\sigma 3$ – в комплексе AP-3, ϵ и $\beta 4$, $\mu 4$, $\sigma 4$ – в комплексе AP-4 [61, 62].

Комплекс субъединиц образует структуру, напоминающую голову Микки Мауса (рис. 4), где центр образован субъединицами μ и δ , а два «уха» состоят из С-концевых доменов двух больших субъединиц α и β , соединенных с «головой» гибким перешейком [63].

Хотя сборка клатриновой решетки происходит на мембране, известно, что сам клатрин не имеет сродства к липидам. Поэтому считается, что привлечение клатрина к мембране обеспечивается белками-адаптерами [64, 65].

AP-2 является основным белковым адаптером на цитоплазматической мембране, участвующим

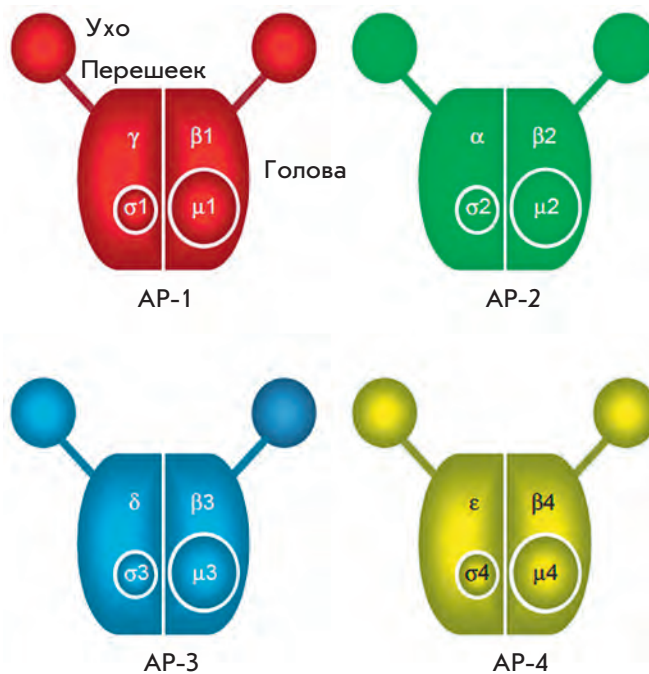


Рис. 4. Схематическое изображение AP-комплексов. Все комплексы состоят из двух больших субъединиц, одной средней и одной малой субъединицы. Рисунок из [63]

в образовании клатрин-покрытых пузырьков при эндоцитозе. С помощью иммуноэлектронной и иммунофлуоресцентной микроскопии показано, что AP-1, -3 и -4 локализуются в эндосомах и комплексе Гольджи [66]. AP-1 опосредует транспорт белков из комплекса Гольджи в ранние или поздние эндосомы.

AP-1 и AP-2 прямо взаимодействуют с N-концевым доменом тяжелой цепи клатрина при помощи сайта связывания с клатрином, который находится в β -цепи. В 1998 г. методом криоэлектронной микроскопии получено представление о структуре комплекса AP-2 с клатрином [55]. Оказалось, что AP-2 образует плотную оболочку в центре решетки. На основании полученных изображений также сделан вывод о том, что AP-2 образует контакты с терминальными доменами клатриновой решетки. Впоследствии рентгеноструктурный анализ подтвердил, что β -субъединицы AP-1, -2 и -3, содержащие клатринсвязывающий мотив, взаимодействуют с терминальным доменом тяжелой цепи клатрина [49].

Комплексы AP взаимодействуют не только с клатрином, но и с интегральными мембранными белками. Последовательность YXXØ, расположенная во внутриклеточных доменах многих рецепторов, узнается μ -субъединицей всех AP-комплексов [67]. С мотивами [DE]XXXL[LI], которые также находятся в цито-

плазматическом домене рецепторов, связываются β -субъединицы AP-комплексов, причем эти субъединицы проявляют разное сродство к разным мотивам [DE]XXXL[L]. Например, AP-1 и AP-2, но не AP-3, взаимодействуют с сайтами DDQRDLI и NEQLPML [68]. А с сигналами DERAPLI и EEKQPLL взаимодействует AP-3, но не AP-1 и AP-2 [69].

Адаптерные белковые комплексы способны связываться с липидами клеточной мембраны. Описаны два сайта связывания липидов [70]. Первый сайт находится в N-концевой части α -субъединицы AP-2, а второй локализуется на поверхности субъединицы μ 2 [71]. Связывание с мембраной определяется взаимодействием фосфатов PtdIns(4,5)P2 и боковых цепей остатков основных аминокислот белка-адаптера.

Ауксилилин

Ауксилилин – многодоменный белок с молекулярной массой 100 кДа, содержащий клатринсвязывающий домен, J-домен и область гомологии с фосфоинозитидфосфатазой PTEN (рис. 5А) [72, 73]. N-Концевой домен связывается с производными фосфоинозитола и (PtdIns(4,5)P2) [74, 75]. Центральный домен ауксилилина взаимодействует с клатрином, комплексом AP-2 [76] и динамином [77].

Криоэлектронной микроскопией с разрешением 20 Å получено изображение полноразмерного ауксилилина [78], а также его фрагмента (549–910) [79] с клатриновой решеткой. Ауксилилин формирует оболочку внутри решетки с точками соприкосновения с терминальными доменами клатрина. Ауксилилин способен взаимодействовать с терминальным доменом тяжелой цепи клатрина посредством мотива (LLGLE), включающего аминокислотные остатки 496–500. Оказалось, что фрагмент, содержащий J-домен и клатринсвязывающий домен ауксилилина, контактирует

с двумя «лодыжками» тяжелой цепи клатрина в точке их пересечения и с дальнейшим терминальным доменом. Связывание ауксилилина с клатриновой решеткой приводит к тому, что терминальные домены выворачиваются наружу вследствие изменения положения «лодыжки». Это изменение положения терминальных доменов вызывает глобальные изменения во всей решетке, увеличивая ее диаметр. Считается, что к этим областям, важным для взаимодействия внутри решетки, ауксилилин привлекает Hsc70 [55, 79].

Hsc70

Hsc70 – конститутивно экспрессируемый шаперон, участвующий во многих клеточных процессах: фолдинге белков, их деградации и транслокации. Другая интересная функция Hsc70 – способность «демонтировать» клатриновую решетку. Так, добавление Hsc70 и АТР к клатриновым пузырькам *in vitro* вызывает разборку клатриновой решетки [80]. Это стехиометрическая реакция, в которой для диссоциации 1 моль клатриновых трискелионов требуется по 3 моль Hsc70 и АТР [80–82].

Как и всем членам семейства Hsp70, Hsc70 для «работы» с конкретным субстратом требуется белок, содержащий J-домен [83]. В качестве такого белка, связанного с клатрином и содержащего J-домен, выступает ауксилилин. J-домен в молекуле ауксилилина располагается таким образом, что мотив, необходимый для взаимодействия с белком Hsc70, экспонирован наружу от решетки. Необходима также расположенная в С-концевой части тяжелой цепи клатрина последовательность QLMLT (1638–1642) [84] (рис. 5Б). Предложена следующая модель разборки решетки: искривление в месте пересечения «лодыжек», вызванное взаимодействием ауксили-

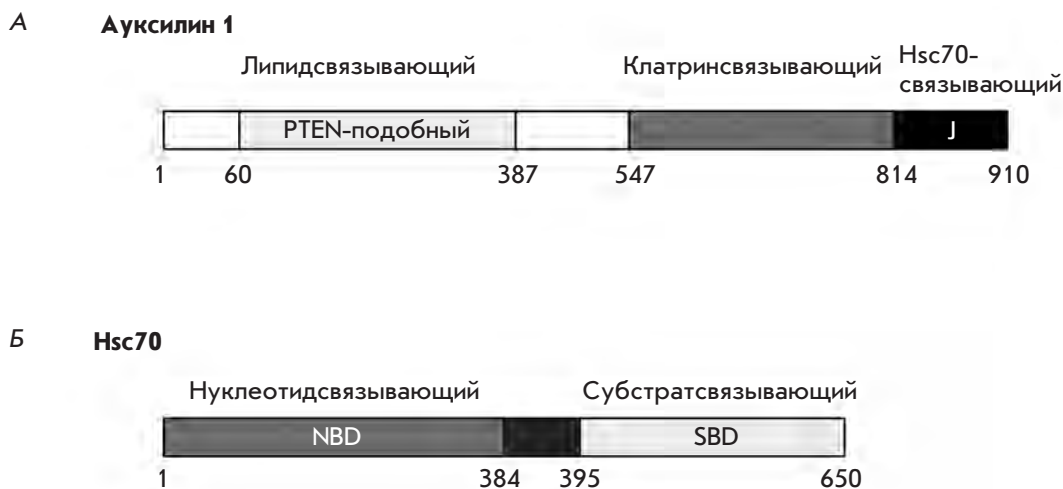


Рис. 5. Доменная организация ауксилилина (А) и Hsc70 (Б). Цифрами обозначены границы различных доменов. Рисунок адаптирован из [85]

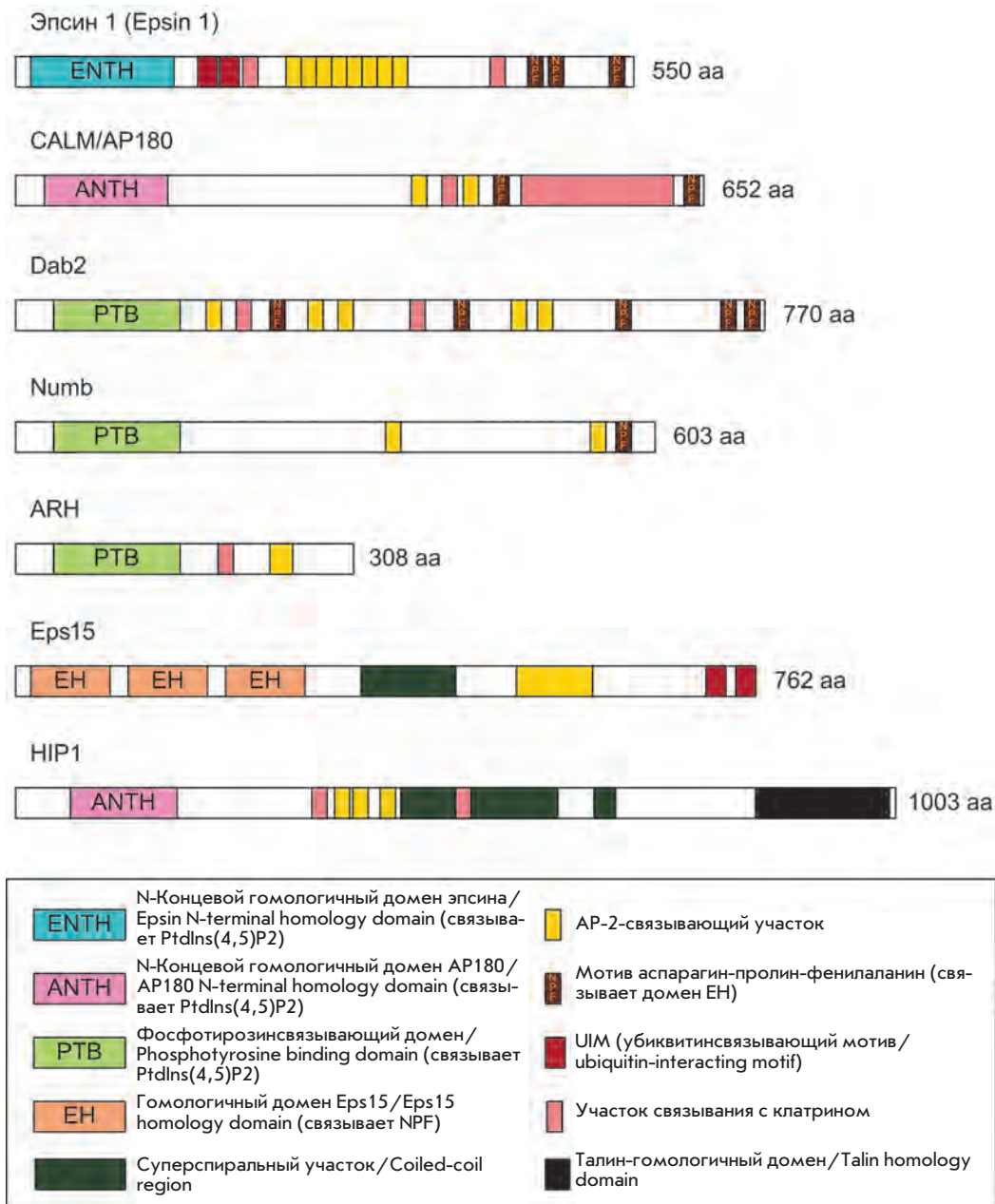


Рис. 6. Мономерные клатринсвязывающие адаптеры. Схематичное представление доменной структуры. aa – аминокислотные остатки. Рисунок адаптирован из [70]

на, позволяет Hsc70 связаться со своим сайтом вблизи С-конца молекулы клатрина. Предполагается, что с одной вершиной трискелиона связывается одна молекула Hsc70, причем для прочного взаимодействия необходим гидролиз АТФ. Таким образом, усиливается деформация клатриновой решетки, которая началась после связывания ауксина [85].

Другие белки, взаимодействующие с клатрином

Помимо адаптерного комплекса AP-2 клатрин-покрытые пузырьки содержат и другие белки. Найдены многие мономерные адаптеры, связывающие

клатрин, а также способные взаимодействовать с интегральными мембранными белками, PtdIns(4,5)P2 и AP-2, для обеспечения клатрин-зависимого эндоцитоза трансмембранных белков (рис. 6). В качестве примера таких адаптеров можно привести эпсины, белок CALM/AP180, а также HIP1 и HIP1R. Содержащийся в этих белках N-концевой домен, связывающий PtdIns(4,5)P2, называется ENTH (epsin N-terminal homology) или ANTH (AP180 N-terminal homology domain). Другая группа мономерных белков включает Dab2, ARH и Numb. Эти белки связывают AP-2, а некоторые из них взаимодействуют

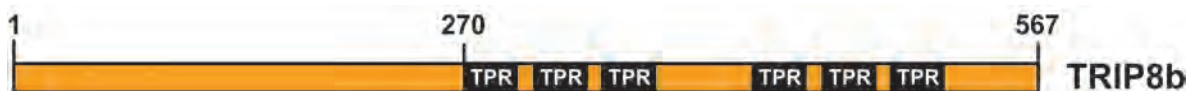


Рис. 7. Схематическое представление доменной организации белка TRIP8b

и с клатрином. Все они содержат фосфотирозинсвязывающий домен (РТВ), отвечающий за взаимодействие с липидами мембраны и за узнавание мотива FXNPXY, локализованного в цитоплазматической части рецепторов LDLR. Показано, что фосфорилирование тирозина в этом мотиве не является условием, необходимым для связывания мономерных адаптеров [71].

Кроме связывания с липидами клеточной мембраны адаптеры узнают сигналы, локализованные в цитоплазматической части рецепторов. Это могут быть посттрансляционные модификации (фосфорилирование, убиквитинирование), короткие пептидные мотивы или и то и другое [86]. Предполагается, что связывание адаптера с цитоплазматической мембраной стабилизируется при одновременном взаимодействии адаптера с PtdIns(4,5)P₂ и рецептором [70, 87].

Функция всех упомянутых белков-адаптеров изучена слабо. Возможно, использование разных белков позволяет избежать одновременного накопления различных GPCR в одном и том же клатрин-покрытом пузырьке [88].

Наиболее изученная роль адаптеров заключается в специфичном узнавании рецептора для его последующего удаления с мембраны. Это узнавание приводит к нарушению поступления рецептора к активному его лиганду, а часто и к перемещению рецептора в лизосомы для деградации. Интернализация рецептора с участием определенного адаптера также может привести к тому, что рецептор будет направлен в другой клеточный компартмент со своим набором сигнальных молекул [89]. Другим следствием избирательного удаления рецептора с поверхности клетки может быть такое клеточное развитие, при котором одна из дочерних клеток получает отличающийся набор адаптеров, отвечающих за эндоцитоз определенных рецепторов. Например, при развитии органов чувств дрозофилы адаптер Numb переходит только в одну из двух дочерних клеток. Numb отвечает за корректировку развития клетки, в которой он оказался, путем ингибирования передачи сигнала по Notch-пути. Ингибирование происходит за счет эндоцитоза рецептора, однако не ясно, контролирует ли белок Numb эндоцитоз Notch пря-

мо или через трансмембранный регулятор Notch – Sandopo [90, 91].

Как уже упоминалось, белки Numb, Dab2 и ARH содержат домен, специфически узнающий последовательность FXNPXY в цитоплазматической части рецепторов. Показано, что белки ARH и Dab2 участвуют в эндоцитозе рецептора LDL, а белок Numb регулирует эндоцитоз интегральных мембранных белков, включая рецепторы EGFR и Notch [88].

Белок эпсин участвует в клатрин-опосредованном эндоцитозе в клетках млекопитающих, где он играет важную роль в изгибании цитоплазматической мембраны за счет домена ENTH. При этом С-концевая часть белка связывается с компонентами клатриновой оболочки (N-концевым доменом клатрина, AP-2 и EN-доменом белка Eps15), что приводит к сборке клатриновой решетки. Посредством UIM-повторов эпсин способен узнавать убиквитинированный «груз», в частности трансмембранные белки, действуя как адаптерный белок [88, 92].

Белки AP180 и CALM облегчают сборку клатрин-покрытых пузырьков и регулируют их размер [20, 93, 94]. Предполагается, что AP180 и CALM играют важную роль в обеспечении полярности и контроле роста аксонов и дендритов нейронов гиппокампа [95].

TRIP8b – новый клатринсвязывающий белок и потенциальный адаптер эндоцитоза

TRIP8b (TPR-containing Rab8b interacting protein, взаимодействующий с Rab8b белок с доменом TPR) – один из недавно обнаруженных белков, потенциальных адаптеров эндоцитоза, вовлеченных в его регуляцию. Экспрессирующийся преимущественно в головном мозге TRIP8b идентифицировали сначала как белок, взаимодействующий с малой GTP-азой Rab8b [96]. В С-концевой части TRIP8b находятся шесть TPR-мотивов, которые образуют TPR-домен (рис. 7). TPR-мотивы представляют собой повторы, состоящие из 34 аминокислот. Эти мотивы встречаются во многих белках, они вовлечены в белок-белковые взаимодействия [97]. Данные повторы часто расположены друг за другом, в результате чего образуется пространственная структура из двух антипараллельных α -спиралей, соединенных короткой петлей [98]. N-Концевая часть TRIP8b не содержит гомологичных

последовательностей с другими известными белками и подвергается альтернативному сплайсингу [99].

Известно, что TRIP8b на 40% идентичен белку Pex5 (peroxin protein, пероксин 5), а их С-концевые части, содержащие TPR-домены, идентичны на 57% (другое название TRIP8b – Pex5Rp, Pex5p related protein, белок, родственник Pex5p) [100]. Белок Pex5 найден у многих организмов, начиная с дрожжей и заканчивая млекопитающими, он отвечает за узнавание и импорт пероксисомных белков, содержащих С-концевой мотив SKL (peroxisome-targeting signal type 1, PTS1), из цитоплазмы в пероксисомы. Но, как оказалось, TRIP8b, хотя и узнает последовательность PTS1, в процессе импорта в пероксисомы не участвует [100].

TRIP8b взаимодействует с белком Rab8b, а также непосредственно с белком, образующим HCN-канал (Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-regulated channel, активируемый гиперполяризацией канал, регулируемый циклонуклеотидами) [99, 101]. Обнаружено, что TRIP8b связывается с рецептором C1RL1 [102], который принадлежит к классу GPCR, и трансмембранным белком Caspr [103].

Каналы HCN входят в семейство потенциал-зависимых каналов [104–106]. Эти каналы вовлечены в управление работой пейсмейкеров сердца и мозга, обеспечение мембранного потенциала покоя, синаптическую передачу (см. обзоры [107] и [108]). Изучение взаимодействия TRIP8b с каналом HCN показало, что TRIP8b регулирует функции и поверхностную экспрессию канала [99, 101, 109, 110]. Предполагается, что TRIP8b действует как вспомогательный адаптер для HCN, причем взаимодействие обеспечивается как минимум двумя разными участками в молекулах TRIP8b и HCN [111, 112].

Все ранее обнаруженные взаимодействия TRIP8b с другими белками опосредовались TPR-доменами, локализованными в С-концевой части TRIP8b [96, 99, 100], или участком, расположенным в консервативной центральной части белка [109, 111, 112].

Как уже упоминалось, N-концевая часть TRIP8b подвергается альтернативному сплайсингу. Образующиеся в результате сплайсинга формы белка по-разному влияют на транспорт HCN и его локализацию на цитоплазматической мембране: одни формы усиливают поверхностную экспрессию HCN1, а другие – уменьшают [109, 110]. Обнаружено, что TRIP8b взаимодействует с клатрином, причем в этом взаимодействии участвует N-концевая часть белка TRIP8b [103, 113]. Сайт связывания с клатрином в молекуле TRIP8b представляет собой два коротких мотива, напоминающих мотив «клатринового бокса».

Для изучения функций TRIP8b получены два типа нокаутных мышей. Фенотип мышей, у которых отсутствуют некоторые изоформы TRIP8b, был таким же, как у мышей дикого типа [114]. При полном отсутствии белка (TRIP8b^{-/-}) у мышей наблюдалось нарушение моторного научения и повышение устойчивости в тесте поведенческого отчаяния [115].

Необходимость изучения клатрин-зависимого эндоцитоза не вызывает сомнений. Большой интерес вызывают интернализация рецепторов после активации лигандом, а также функции различных вспомогательных белков. В настоящее время активно исследуются взаимодействия клатрина с многочисленными белками-адаптерами. Клатрин участвует в различных процессах: эндоцитозе, внутриклеточном трафике, сегрегации хромосом. Предполагается, что нарушения функционирования клатрина могут приводить к развитию некоторых заболеваний. В связи с этим изучение структуры и функций клатрин-покрытых пузырьков, а также белков, участвующих в образовании этих пузырьков, представляет интерес как для молекулярной биологии, так и для биомедицины. ●

*Работа поддержана РФФИ
(гранты № 11-04-12151-офи-м-2011, 12-04-01817-а,
12-04-32099 мол_а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pierce K.L., Premont R.T., Lefkowitz R.J. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 3. P. 639–650.
- Ovchinnikov Yu.A. // *FEBS Lett.* 1982. V. 148. P. 179–191.
- Clapham D.E., Neer E.J. // *Nature.* 1993. V. 365. P. 403–406.
- Oldham W.M., Hamm H.E. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 9. P. 60–71.
- Shenoy S.K., Lefkowitz R.J. // *Biochem. J.* 2003. V. 375. P. 503–515.
- Goodman O.B., Jr., Krupnick J.G., Santini F., Gurevich V.V., Penn R.B., Gagnon A.W., Keen J.H., Benovic J.L. // *Nature.* 1996. V. 383. P. 447–450.
- Laporte S.A., Oakley R.H., Zhang J., Holt J.A., Ferguson S.S., Caron M.G., Barak L.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 3712–3717.
- Doherty G.J., McMahon H.T. // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. V. 78. P. 857–902.
- Calebiro D., Nikolaev V.O., Persani L., Lohse M.J. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2010. V. 31. P. 221–228.
- Hanyaloglu A.C., von Zastrow M. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008. V. 48. P. 537–568.
- Stenmark H. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 10. P. 513–525.
- Poteryaev D., Datta S., Ackema K., Zerial M., Spang A. // *Cell.* 2010. V. 141. P. 497–508.
- Young A. // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2007. V. 18. P. 448–458.

14. Ehrlich M., Boll W., van Oijen A., Hariharan R., Chandran K., Nibert M.L., Kirchhausen T. // *Cell*. 2004. V. 118. P. 591–605.
15. Ohno H., Stewart J., Fournier M.C., Bosshart H., Rhee I., Miyatake S., Saito T., Gallusser A., Kirchhausen T., Bonifacino J.S. // *Science*. 1995. V. 269. P. 1872–1875.
16. Edeling M.A., Mishra S.K., Keyel P.A., Steinhauser A.L., Collins B.M., Roth R., Heuser J.E., Owen D.J., Traub L.M. // *Dev. Cell*. 2006. V. 10. P. 329–342.
17. Honing S., Ricotta D., Krauss M., Spate K., Spolaore B., Motley A., Robinson M., Robinson C., Haucke V., Owen D.J. // *Mol. Cell*. 2005. V. 18. P. 519–531.
18. Lauritsen J.P., Menne C., Kastrop J., Dietrich J., Odum N., Geisler C. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1497. P. 297–307.
19. Ricotta D., Conner S.D., Schmid S.L., von Figura K., Honing S. // *J. Cell. Biol.* 2002. V. 156. P. 791–795.
20. Meyerholz A., Hinrichsen L., Groos S., Esk P.C., Brandes G., Ungewickell E.J. // *Traffic*. 2005. V. 6. P. 1225–1234.
21. Blood P.D., Voth G.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 15068–15072.
22. Takei K., Slepnev V.I., Haucke V., De Camilli P. // *Nat. Cell. Biol.* 1999. V. 1. P. 33–39.
23. Farsad K., Ringstad N., Takei K., Floyd S.R., Rose K., De Camilli P. // *J. Cell. Biol.* 2001. V. 155. P. 193–200.
24. Castillo P.E., Schoch S., Schmitz F., Sudhof T.C., Malenka R.C. // *Nature*. 2002. V. 415. P. 327–330.
25. McMahon H.T., Boucrot E. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 12. P. 517–533.
26. Yoshida Y., Kinuta M., Abe T., Liang S., Araki K., Cremona O., Di Paolo G., Moriyama Y., Yasuda T., De Camilli P., et al. // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 3483–3491.
27. Ferguson S.M., De Camilli P. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2012. V. 13. P. 75–88.
28. Barouch W., Prasad K., Greene L., Eisenberg E. // *Biochemistry (Mosc.)*. 1997. V. 36. P. 4303–4308.
29. Ungewickell E., Ungewickell H., Holstein S.E., Lindner R., Prasad K., Barouch W., Martin B., Greene L.E., Eisenberg E. // *Nature*. 1995. V. 378. P. 632–635.
30. Ghosh P., Kornfeld S. // *J. Cell. Biol.* 2003. V. 160. P. 699–708.
31. Verstreken P., Koh T.W., Schulte K.L., Zhai R.G., Hiesinger P.R., Zhou Y., Mehta S.Q., Cao Y., Roos J., Bellen H.J. // *Neuron*. 2003. V. 40. P. 733–748.
32. Bockaert J., Fagni L., Dumuis A., Marin P. // *Pharmacol Ther.* 2004. V. 103. P. 203–221.
33. Lefkowitz R.J., Shenoy S.K. // *Science*. 2005. V. 308. P. 512–517.
34. Pitcher J.A., Freedman N.J., Lefkowitz R.J. // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 653–692.
35. Gurevich V.V., Benovic J.L. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 11628–11638.
36. Gurevich V.V., Richardson R.M., Kim C.M., Hosey M.M., Benovic J.L. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 16879–16882.
37. Gurevich V.V., Dion S.B., Onorato J.J., Ptasiński J., Kim C.M., Sterne-Marr R., Hosey M.M., Benovic J.L. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 720–731.
38. Gurevich V.V., Gurevich E.V. // *Pharmacol. Ther.* 2006. V. 110. P. 465–502.
39. Pearse B.M. // *J. Mol. Biol.* 1975. V. 97. P. 93–98.
40. Fotin A., Cheng Y., Sliz P., Grigorieff N., Harrison S.C., Kirchhausen T., Walz T. // *Nature*. 2004. V. 432. P. 573–579.
41. Keen J.H. // *Annu. Rev. Biochem.* 1990. V. 59. P. 415–438.
42. Mueller S.C., Branton D. // *J. Cell. Biol.* 1984. V. 98. P. 341–346.
43. Wiedenhoef R.E., Schmidt G.W., Palevitz B.A. // *Plant Physiol.* 1988. V. 86. P. 412–416.
44. Jackson A.P., Parham P. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 16688–16695.
45. Ungewickell E. // *EMBO J.* 1983. V. 2. P. 1401–1408.
46. Chen C.Y., Reese M.L., Hwang P.K., Ota N., Agard D., Brodsky F.M. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 6072–6082.
47. Blank G.S., Brodsky F.M. // *EMBO J.* 1986. V. 5. P. 2087–2095.
48. Blank G.S., Brodsky F.M. // *J. Cell. Biol.* 1987. V. 105. P. 2011–2019.
49. ter Haar E., Harrison S.C., Kirchhausen T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 1096–1100.
50. Ramjaun A.R., McPherson P.S. // *J. Neurochem.* 1998. V. 70. P. 2369–2376.
51. Crowther R.A., Finch J.T., Pearse B.M. // *J. Mol. Biol.* 1976. V. 103. P. 785–798.
52. Kartenbeck J. // *Cell Biol. Int. Rep.* 1978. V. 2. P. 457–464.
53. Wakeham D.E., Chen C.Y., Greene B., Hwang P.K., Brodsky F.M. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 4980–4990.
54. Greene B., Liu S.H., Wilde A., Brodsky F.M. // *Traffic*. 2000. V. 1. P. 69–75.
55. Smith C.J., Grigorieff N., Pearse B.M. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 4943–4953.
56. Royle S.J. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. P. 19–28.
57. Keen J.H., Willingham M.C., Pastan I.H. // *Cell*. 1979. V. 16. P. 303–312.
58. Schmid S.L. // *Annu. Rev. Biochem.* 1997. V. 66. P. 511–548.
59. Gallusser A., Kirchhausen T. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 5237–5244.
60. Stepp J.D., Pellicena-Palle A., Hamilton S., Kirchhausen T., Lemmon S.K. // *Mol. Biol. Cell*. 1995. V. 6. P. 41–58.
61. Simpson F., Peden A.A., Christopoulou L., Robinson M.S. // *J. Cell. Biol.* 1997. V. 137. P. 835–845.
62. Dell'Angelica E.C., Mullins C., Bonifacino J.S. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 7278–7285.
63. Robinson M.S., Bonifacino J.S. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2001. V. 13. P. 444–453.
64. Aridor M., Traub L.M. // *Traffic*. 2002. V. 3. P. 537–546.
65. Wilbur J.D., Hwang P.K., Brodsky F.M. // *Traffic*. 2005. V. 6. P. 346–350.
66. Peden A.A., Oorschot V., Hesser B.A., Austin C.D., Scheller R.H., Klumperman J. // *J. Cell. Biol.* 2004. V. 164. P. 1065–1076.
67. Bonifacino J.S., Traub L.M. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 395–447.
68. Hofmann M.W., Honing S., Rodionov D., Dobberstein B., von Figura K., Bakke O. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 36153–36158.
69. Honing S., Sandoval I.V., von Figura K. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 1304–1314.
70. Maldonado-Baez L., Wendland B. // *Trends Cell Biol.* 2006. V. 16. P. 505–513.
71. Owen D.J., Collins B.M., Evans P.R. // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2004. V. 20. P. 153–191.
72. Ahle S., Ungewickell E. // *J. Cell. Biol.* 1990. V. 111. P. 19–29.
73. Ungewickell E., Ungewickell H., Holstein S.E. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 19594–19600.
74. Lee D.W., Wu X., Eisenberg E., Greene L.E. // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. P. 3502–3512.
75. Massol R.H., Boll W., Griffin A.M., Kirchhausen T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 10265–10270.
76. Scheele U., Kalthoff C., Ungewickell E. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 36131–36138.
77. Newmyer S.L., Christensen A., Sever S. // *Dev. Cell*. 2003. V. 4. P. 929–940.
78. Smith C.J., Dafforn T.R., Kent H., Sims C.A., Khubchandani-Aswani K., Zhang L., Saibil H.R., Pearse B.M. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 336. P. 461–471.
79. Fotin A., Cheng Y., Grigorieff N., Walz T., Harrison S.C., Kirchhausen T. // *Nature*. 2004. V. 432. P. 649–653.

80. Greene L.E., Eisenberg E. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 6682–6687.
81. Barouch W., Prasad K., Greene L.E., Eisenberg E. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 28563–28568.
82. Ma Y., Greener T., Pacold M.E., Kaushal S., Greene L.E., Eisenberg E. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 49267–49274.
83. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. // *Science.* 2002. V. 295. P. 1852–1858.
84. Rapoport I., Boll W., Yu A., Bocking T., Kirchhausen T. // *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19. P. 405–413.
85. Xing Y., Bocking T., Wolf M., Grigorieff N., Kirchhausen T., Harrison S.C. // *EMBO J.* 2010. V. 29. P. 655–665.
86. Robinson M.S. // *Trends Cell Biol.* 2004. V. 14. P. 167–174.
87. Aguilar R.C., Watson H.A., Wendland B. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 10737–10743.
88. Wolfe B.L., Trejo J. // *Traffic.* 2007. V. 8. P. 462–470.
89. Polo S., Di Fiore P.P. // *Cell.* 2006. V. 124. P. 897–900.
90. Le Borgne R. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2006. V. 18. P. 213–222.
91. Hutterer A., Knoblich J.A. // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. P. 836–842.
92. Horvath C.A., Vanden Broeck D., Boulet G.A., Bogers J., De Wolf M.J. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2007. V. 39. P. 1765–1770.
93. Morgan J.R., Zhao X., Womack M., Prasad K., Augustine G.J., Lafer E.M. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 10201–10212.
94. Zhang B., Koh Y.H., Beckstead R.B., Budnik V., Ganetzky B., Bellen H.J. // *Neuron.* 1998. V. 21. P. 1465–1475.
95. Bushlin I., Petralia R.S., Wu F., Harel A., Mughal M.R., Mattson M.P., Yao P.J. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 10257–10271.
96. Chen S., Liang M.C., Chia J.N., Ngsee J.K., Ting A.E. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 13209–13216.
97. Blatch G.L., Lassle M. // *Bioessays.* 1999. V. 21. P. 932–939.
98. D'Andrea L.D., Regan L. // *Trends Biochem. Sci.* 2003. V. 28. P. 655–662.
99. Santoro B., Wainger B.J., Siegelbaum S.A. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. P. 10750–10762.
100. Amery L., Sano H., Mannaerts G.P., Snider J., van Looy J., Fransen M., van Veldhoven P.P. // *Biochem. J.* 2001. V. 357. P. 635–646.
101. Zolles G., Wenzel D., Bildl W., Schulte U., Hofmann A., Muller C.S., Thumfart J.O., Vlachos A., Deller T., Pfeifer A., et al. // *Neuron.* 2009. V. 62. P. 814–825.
102. Popova N.V., Plotnikov A., Deev I.E., Petrenko A.G. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007. V. 414. P. 149–151.
103. Popova N.V., Plotnikov A.N., Ziganshin R., Deyev I.E., Petrenko A.G. // *Biochemistry (Mosc.).* 2008. V. 73. P. 644–651.
104. Santoro B., Grant S.G., Bartsch D., Kandel E.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 14815–14820.
105. Ludwig A., Zong X., Jeglitsch M., Hofmann F., Biel M. // *Nature.* 1998. V. 393. P. 587–591.
106. Santoro B., Liu D.T., Yao H., Bartsch D., Kandel E.R., Siegelbaum S.A., Tibbs G.R. // *Cell.* 1998. V. 93. P. 717–729.
107. DiFrancesco D. // *Annu. Rev. Physiol.* 1993. V. 55. P. 455–472.
108. Robinson R.B., Siegelbaum S.A. // *Annu. Rev. Physiol.* 2003. V. 65. P. 453–480.
109. Lewis A.S., Schwartz E., Chan C.S., Noam Y., Shin M., Wadman W.J., Surmeier D.J., Baram T.Z., Macdonald R.L., Chetkovich D.M. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. P. 6250–6265.
110. Santoro B., Piskorowski R.A., Pian P., Hu L., Liu H., Siegelbaum S.A. // *Neuron.* 2009. V. 62. P. 802–813.
111. Han Y., Noam Y., Lewis A.S., Gallagher J.J., Wadman W.J., Baram T.Z., Chetkovich D.M. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 20823–20834.
112. Santoro B., Hu L., Liu H., Saponaro A., Pian P., Piskorowski R.A., Moroni A., Siegelbaum S.A. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. P. 4074–4086.
113. Popova N.V., Deyev I.E., Petrenko A.G. // *J. Neurochem.* 2011. V. 118. P. 988–998.
114. Piskorowski R., Santoro B., Siegelbaum S.A. // *Neuron.* 2011. V. 70. P. 495–509.
115. Lewis A.S., Vaidya S.P., Blaiss C.A., Liu Z., Stoub T.R., Brager D.H., Chen X., Bender R.A., Estep C.M., Popov A.B., et al. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. P. 7424–7440.

УДК 577.15:576.367

Акадезин вызывает неапоптотическую гибель опухолевых клеток

В. А. Глазунова^{1*}, К. В. Лобанов², Р. С. Шакулов², А. С. Миронов², А. А. Штиль¹¹Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское ш., 24²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, Дорожный пр-д, 1

*E-mail: gav-83@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.2012

РЕФЕРАТ Изучено действие акадезина (5-аминоимдазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид) на опухолевые и неопухолевые клетки различного видового и тканевого происхождения. Установлено, что акадезин вызывает неапоптотическую гибель опухолевых клеток; чувствительность неопухолевых клеток к действию этого соединения существенно ниже. Акадезин вызывает гибель опухолевых клеток с фенотипом лекарственной устойчивости, обусловленной экспрессией транспортера Р-гликопротеина и инактивацией проапоптотического белка p53. Необходимым условием гибели клеток является активность транспортеров аденозина, тогда как функция АМР-активируемой протеинкиназы не требуется. Преимущественная гибель опухолевых клеток под действием акадезина и особенности механизма его цитотоксичности обуславливают перспективность этого соединения в качестве противоопухолевого средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА акадезин, гибель клеток, опухолевые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Акадезин (5-аминоимдазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид, АИКАР) проходит клинические испытания в качестве препарата для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза [1, 2]. Важное свойство акадезина – его преимущественная токсичность для опухолевых клеток при менее выраженном повреждении неопухолевых [2, 3]. Ранее показали, что акадезин способен стимулировать АМР-активируемую протеинкиназу (АМРК) – важный регулятор энергетического баланса клетки, контролирующей окисление жирных кислот, метаболизм глюкозы, синтез белков, жирных кислот и холестерина [4–10]. Механизм действия акадезина обусловлен его фосфорилированием аденозинкиназой с образованием ZMP (5-амино-4-имидазолкарбоксамидриботида) – промежуточного продукта *de novo*-синтеза пуриновых оснований [1, 4, 5, 8]. ZMP, имитируя метаболические эффекты АМР, способен активировать АМРК. Противоопухолевое действие акадезина связывают с индукцией апоптоза [7, 9, 11, 12]. Вместе с тем имеются данные о неапоптотической гибели клеток и АМРК-независимом механизме действия акадезина на опухолевые клетки [12, 13].

В настоящей работе изучено действие акадезина на клетки млекопитающих. Показано, что акадезин вызывает гибель опухолевых клеток различного тка-

невого происхождения, в том числе клеток, устойчивых к ряду противоопухолевых средств. Механизмы гибели клеток отличаются от апоптоза; их важной особенностью оказывается необходимость транспорта аденозина. Неопухолевые клетки менее чувствительны к действию акадезина. Избирательность цитотоксического действия и особенности механизмов гибели опухолевых клеток могут быть важными факторами, определяющими перспективность использования акадезина в терапии опухолей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах использовали следующие линии клеток человека: НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки), НСТ116p53KO (изогенная сублиния, в которой не функционирует p53), К562 (промиелоцитарный лейкоз), К562/4 (сублиния, полученная после селекции на выживание в присутствии доксорубина; экспрессирован белок множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) Р-гликопротеин; Pgp), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), MCF-7Dox (сублиния после селекции на выживание в присутствии доксорубина; фенотип Pgp-опосредованной МЛУ), культуру фибробластов ПФЧ-2, лимфоциты крови здоровых доноров, а также клетки мыши: P388 (лимфоцитарный лейкоз) и Sp2/0 (миелома). Реактивы приобретены в фирме «ПанЭко», Россия (кроме особо оговоренных случаев). Клетки культивировали в мо-

дифицированной Дульбекко среде Игла с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Bio-Whittaker, Австрия), 2 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста. Лимфоциты выделяли из периферической крови доноров центрифугированием в градиенте плотности фиколла-урографина ($d = 1.077 \text{ г/см}^3$).

Акадезин получали в ГосНИИГенетика микробиологическим способом с использованием оригинального рекомбинантного штамма [14]. Кроме того, оценивали цитотоксичность акадезина фирмы Sigma. В этой же фирме приобретены дипиридамо́л – ингибитор рецепторов аденозина [8], 5-йодтуберцидин – ингибитор аденозинкиназы, препятствующий превращению акадезина в ZMP, и zVAD-fmk (карбобензоксивалилаланил-аспартил-[O-метил]-фторметилкетон) – пан-каспазный ингибитор. Все соединения растворяли в диметилсульфоксиде или воде (10–20 mM) и хранили при –20°C. В день опыта готовили разведения препарата в культуральной среде. Для оценки цитотоксичности акадезина использовали МТТ-тест, окраску клеток йодидом пропидия и аннексином V, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), определение

клеточного цикла в проточной цитофлуориметрии и электрофоретический анализ целостности геномной ДНК [15, 16]. В отдельных опытах препаратом сравнения служил алкильный катионный глицеролипид *rac*-N-{4-[(2-этокси-3-октадецилокси)проп-1-илоксикарбонил]бутил}-N'-метилимидазолиййодид, индуктор апоптоза [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Преимущественная чувствительность опухолевых клеток к акадезину

В предварительных экспериментах мы установили, что препарат акадезина, полученный микробиологическим способом, и коммерческий акадезин идентичны по физико-химическим свойствам, чистоте, стабильности при хранении и цитотоксичности (данные не приведены). Для дальнейших исследований использовали акадезин, полученный авторским способом. В *табл. 1* представлена цитотоксичность акадезина для трансформированных и нетрансформированных клеток (культивируемых или свежeweделенных) различного видового и тканевого происхождения.

Из данных, представленных в *табл. 1*, следует, что к действию акадезина наиболее чувствительны

Таблица 1. Цитотоксичность акадезина для клеток млекопитающих

Клетки	Акадезин, mM					
	0	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0
K562	100*	100	70	46	9	0
P388	100	36	30	20	9	0
Sp2/0	100	34	29	14	0	0
K562/4	100	100	72	42	8	0
MCF-7	100	100	82	50	15	2
MCF-7Dox	100	100	86	48	17	1
HCT116	100	100	50	36	23	0
HCT116p53KO	100	100	54	34	25	0
ПФЧ-2, пролиферирующие	100	100	100	96	96	86
ПФЧ-2, непролиферирующие**	100	100	100	100	95	92
Донорские лимфоциты	100	100	100	98	94	90

Примечание. Представлены результаты МТТ-теста после 72-часовой инкубации клеток. *Выживаемость клеток, инкубированных без акадезина, принимали за 100%. Каждое значение – среднее пяти независимых опытов, стандартное отклонение ≤ 0%. **Пролиферацию фибробластов останавливали культивированием клеток до монослоя (контактное торможение деления клеток).

клетки P388 (лейкоз мыши) и Sp2/0 (миелома мыши): при концентрации акадезина, равной 0.125 мМ, выживает ~1/3 клеточной популяции. Другие исследованные линии трансформированных клеток также гибнут под действием субмиллимолярных концентраций акадезина. Важно, что цитотоксичность акадезина практически одинакова в случае лейкозной линии K562 и ее сублинии с Pgr-опосредованной МЛУ (K562/4). То же верно для линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 и сублинии с МЛУ (табл. 1). Сравнение цитотоксичности акадезина в отношении линии НСТ116 и сублинии НСТ116p53КО (устойчивой к ряду ДНК-повреждающих противоопухолевых соединений) [18] показало, что инактивация проапоптотического белка p53 не приводит к увеличению выживания клеток в присутствии акадезина.

Столь же важна существенно более высокая выживаемость неопухолевых клеток в присутствии акадезина: гибель донорских лимфоцитов и нетрансформированных фибробластов практически отсутствовала даже при действии акадезина в миллимолярных концентрациях в течение 72 ч непрерывного воздействия (табл. 1). Таким образом, акадезин вызывает преимущественную гибель трансформированных клеток (сuspensionных и эпителиальных), в том числе сублиний, устойчивых к другим противоопухолевым соединениям. Неопухолевые клетки повреждаются акадезином в значительно меньшей степени. Эти особенности обуславливают перспективность использования акадезина в качестве противоопухолевого средства. Однако для этого важно установление механизмов токсичности акадезина для опухолевых клеток.

Акадезин вызывает неапоптотическую гибель клеток

Влияние акадезина на распределение плоидности клеток линии аденокарциномы толстой кишки НСТ116 изучено методом проточной цитофлуориметрии. Через 24 ч после внесения акадезина (0.25 мМ) определяли накопление клеток в фазе S, а через 48 ч (рис. 1) – массовую гибель клеток (область слева от пика G1; гиподиплоидные ядра).

Накопление фрагментированной ДНК может быть признаком апоптотической гибели клеток, если расщепление ДНК происходит в межнуклеосомных промежутках, что видно по образованию набора фрагментов длиной 140–170 п.н. при электрофорезе. Для проверки этой возможности определяли целостность ДНК в клетках НСТ116, обработанных акадезином. Оказалось, что акадезин, в отличие от препарата сравнения – алкильного катионного глицеролипида [17], не приводит к появлению характерной для апоптоза «лестницы» фрагментов ДНК (рис. 2).

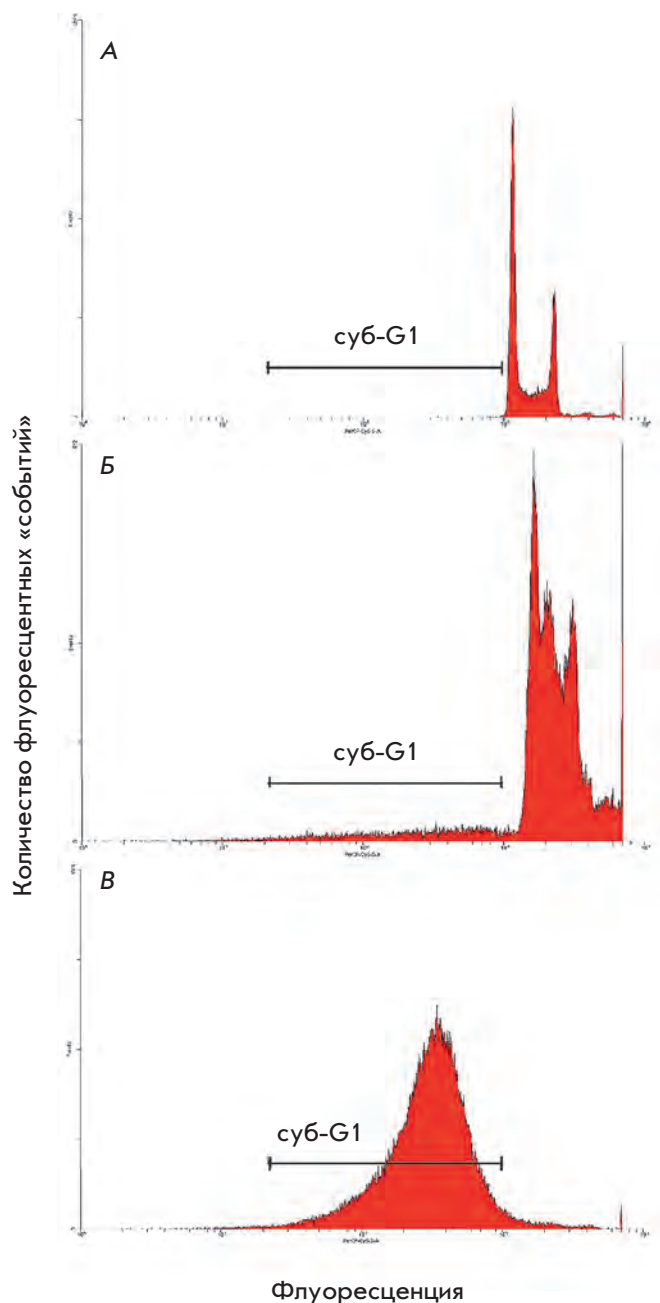


Рис. 1. Распределение клеток линии НСТ116 по фазам цикла при действии 0.4 мМ акадезина. А – интактные клетки; Б – накопление в фазе S через 24 ч; В – накопление в области суб-G1 через 48 ч

Аргументом в пользу неапоптотического механизма гибели клеток НСТ116 при действии акадезина служат результаты окрашивания клеток аннексином V-ФИТЦ и йодидом пропидия (рис. 3). Аннексин V связывает фосфатидилсерин на плазматической мембране (транслокация фосфатидилсерина из внутреннего липидного слоя мембраны

Рис. 2. Целостность ДНК в клетках линии НСТ116.
1 – Интактные клетки;
2 – акадезин, 0.4 мМ, 24 ч;
3 – алкильный катионный глицеролипид, 6 мкМ, 24 ч [17] (контроль метода)

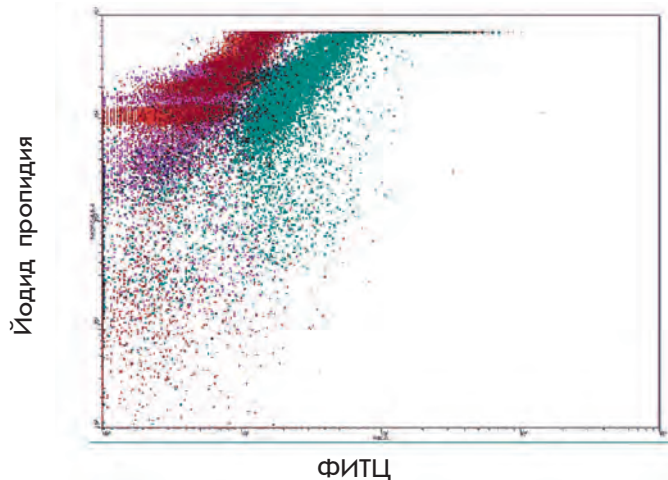
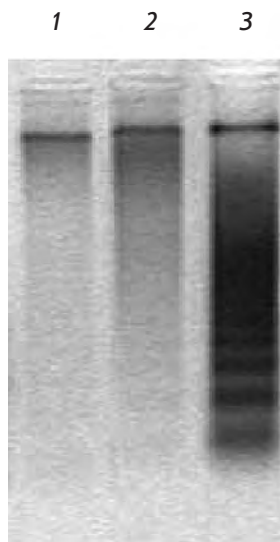


Рис. 3. Окраска клеток линии НСТ116 аннексином V-ФИТЦ и йодидом пропидия. Псевдоцвета: красный – интактные клетки; фиолетовый – акадезин (0.4 мМ, 24 ч); синий – алкильный катионный глицеролипид (контроль метода; см. подпись к рис. 2)

в наружный считается признаком апоптоза). Йодид пропидия способен проникать в клетки, подвергающиеся некрозу (нарушение целостности плазматической мембраны). Клетки линии НСТ116, обработанные акадезином (0.4 мМ, 24 ч), не окрашивались аннексином V-ФИТЦ; напротив, клетки накапливали йодид пропидия (рис. 3), что позволяет предположить некротический компонент механизма гибели. Сходные результаты получены при регистрации некротических клеток с помощью трипанового синего (данные не представлены). Вероятно, нарушение целостности плазматической мембраны – позднее событие при индуцированной акадезином гибели клеток. Препарат сравнения – алкильный катионный глицеролипид – вызывал характерное для апоптоза увеличение аннексин V-положительных клеток (рис. 3).

Поскольку апоптотическая гибель клеток предполагает активную роль каспаз, изучено действие пан-каспазного ингибитора zVAD-fmk на цитотоксичность акадезина. Клетки линии НСТ116 инкубировали с 200 мкМ zVAD-fmk в течение 30 мин, после чего в культуры вносили акадезин и продолжали инкубацию в течение 24 ч. Присутствие zVAD-fmk не снизило гибель клеток, что подтверждает заключение о неапоптотическом механизме цитотоксичности акадезина.

Взаимодействие с рецепторами аденозина необходимо для гибели опухолевых клеток под действием акадезина

Перенос акадезина из внеклеточной среды в клетки может осуществляться транспортерами аденозина [19]. Мы изучили эффект дипиридамола – ингибитора этих транспортеров, на цитотоксичность акадезина в линии клеток Р388. Оказалось, что в присутствии дипиридамола клетки нечувствительны даже к относительно высоким (до 0.8 мМ) концентрациям акадезина (табл. 2).

Для выяснения роли метаболического пути акадезин-ZMP-АМРК в цитотоксичности акадезина

Таблица 2. Цитотоксичность акадезина в комбинациях с дипиридамолом или 5-йодтуберцидином

Воздействие	Акадезин, мМ					
	0	0.08	0.1	0.2	0.4	0.8
Акадезин	100*	79	38	33	20	18
Акадезин + дипиридамол, 5 мкМ	100	100	99	99	100	101
Акадезин + 5-йодтуберцидин, 0.05 мкМ	100	76	39	31	22	16

*Выживаемость (%) клеток лейкоза Р388 по данным МТТ-теста после инкубации в течение 72 ч.

(его фосфорилирование аденозинкиназой с образованием ZMP и активации АМРК) клетки инкубировали с акадезином и ингибитором аденозинкиназы 5-йодтуберцидином. Ингибитор не влиял на цитотоксичность акадезина (табл. 2). Из этого следует, что гибель клеток в ответ на акадезин не обусловлена образованием ZMP и активацией АМРК.

Таким образом, изучение механизмов цитотоксичности акадезина выявило ряд особенностей, указывающих на нетривиальный характер фармакологических эффектов этого соединения. Акадезин вызывает гибель культивируемых опухолевых клеток при существенно менее выраженном действии на неопухолевые. Акадезин токсичен для клеток с молекулярными детерминантами лекарственной устойчивости – экспрессией Pgp и нефункционирующим p53. Важно подчеркнуть неапоптотический характер гибели опухолевых клеток под действием акадезина. Эти результаты позволяют расценивать акадезин как своеобразный реагент для изучения механизмов гибели опухолевых клеток и перспективный кандидат в лекарственные средства.

Открытым остается вопрос о внутриклеточной мишени акадезина, взаимодействие с которой обуславливает гибель опухолевых клеток. Мы показали, что условием гибели клеток является функционирование транспортеров аденозина, тогда как активация АМРК не требуется. Правомерно предположить, что опухоли, экспрессирующие указанные транспортеры и рецепторы аденозина, будут наиболее чувствительны к акадезину. Роль транспорта пуриновых оснований в гибели клеток изучена недостаточно; требуется анализ дифференциальной экспрессии переносчиков и рецепторов аденозина в опухолях разного типа. Вероятно, повышенная экспрессия этих молекул окажется новым молекулярным маркером чувствительности опухолей к акадезину и критерием отбора больных для соответствующей терапии. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.N08.12.1010), а также частично поддержана Фондом некоммерческих программ «Династия».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acadesine. AICA Riboside, ARA 100, Arasine, GP 1 110. Drugs R D. 2008. V. 9. № 3. P. 169–175.
2. Jose C., Bellance N., Chatelain E.H., Benard G., Nouette-Gaulain K., Rossignol R. // Mitochondrion. 2012. V. 12. P. 100–109.
3. Jose C., Hébert-Chatelain E., Bellance N., Larendra A., Su M., Nouette-Gaulain K., Rossignol R. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1807. P. 707–718.
4. van den Neste E., van den Berghe G., Bontemps F. // Expert Opin. Invest. Drugs. 2010. V. 19. № 4. P. 571–578.
5. Javaux F., Vincent M.F., Wagner D.R., van den Berghe G. // Biochem. J. 1995. V. 305. P. 913–919.
6. Merrill G.F., Kurth E.J., Hardie D.G., Winder W.W. // Endocrinol. Metab. 1997. V. 273. № 6. P. 1107–1112.
7. Su R.Y., Chao Y., Chen T.Y., Huang D.Y., Lin W.W. // Mol. Cancer Therapy. 2007. V. 6. № 5. P. 1562–1571.
8. Theodoropoulou S., Kolovou P.E., Morizane Y., Kayama M., Nicolaou F., Miller J.W., Gragoudas E., Ksander B.R., Vavvas D.G. // FASEB. 2010. V. 24. P. 2620–2630.
9. The Handbook of Metabolomics. Methods in Pharmacology and Toxicology / Eds Whei-Mei Fan T. et al. 2012. V. 17. P. 439–480.
10. Walker J., Jijon H.B., Diaz H., Salehi P., Churchill T., Madsen K.L. // Biochem. J. 2005. V. 385. P. 485–491.
11. Campàs C., Santidrián A.F., Domingo A., Gil J. // Leukemia. 2005. V. 19. P. 292–294.
12. López J.M., Santidrián A.F., Campàs C., Gil J. // Biochem. J. 2003. V. 70. P. 1027–1032.
13. Guigas B., Sakamoto K., Taleux N., Reyna S.M., Musi N., Viollet B., Hue L. // IUBMB Life. 2009. V. 61. № 1. P. 18–26.
14. Лобанов К.В., Эрраис Лопес Л., Королькова Н.В., Тяглов Б.В., Глазунов А.В., Шакулов Р.С., Миронов А.С. // Acta Naturae. 2011. Т. 3. № 2 (9). С. 83–93.
15. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M., Bykov E.E., Danilenko V.N., Bekker O.B., Trenin A.S., Elizarov S.M., Dezhenkova L.G., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. // J. Antibiotics. (Tokyo). 2012. V. 65. № 8. P. 405–411.
16. Симонова В.С., Самусенко А.В., Филиппова Н.А., Тявешова А.Н., Лынив Л.С., Кулик Г.И., Чехун В.Ф., Штиль А.А. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2005. Т. 4. С. 451–455.
17. Маркова А.А., Плявник Н.В., Плетнева М.В., Серебrenникова Г.А., Штиль А.А. // Клин. онкогематол. 2012. Т. 5. № 2. С. 141–143.
18. Shchekotikhin A.E., Glazunova V.A., Dezhenkova L.G., Shevtsova E.K., Traven' V.F., Balzarini J., Huang H.-S., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. // Eur. J. Med. Chem. 2011. V. 46. P. 213–218.
19. Gadalla A.E., Pearson T., Currie A.J., Dale N., Hawley S.A., Sheehan M., Hirst W., Michel A.D., Randall A., Hardie D.G., Frenguelli B.G. // J. Neurochem. 2004. V. 88. P. 1272–1282.

УДК 577.214.625

Опухолевая специфичность промоторов генов, участвующих в контроле клеточной пролиферации

К. Н. Кашкин*, И. П. Чернов, Е. А. Стукачева, Е. П. Копанцев, Г. С. Монастырская, Н. Я. Успенская, Е. Д. Свердлов

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

*E-mail: kachkine@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.02.2013

РЕФЕРАТ В представленной работе изучена опухолевая специфичность промоторов генов *CDC6*, *POLD1*, *CKS1B*, *MCM2*, *PLK1* человека. С этой целью промоторные области указанных генов, включающие кор-промотор и примыкающую (дистально по отношению к точке начала транскрипции) потенциальную регуляторную область, клонировали в вектор pGL3 перед репортерным геном люциферазы *Photinus pyralis*. Сравнили способность всех клонированных фрагментов ДНК направлять экспрессию гена люциферазы в серии опухолевых клеток и в нормальных фибробластах человека. Активность всех промоторов оказалась существенно выше в опухолевых клетках, чем в нормальных фибробластах. При этом специфичность промоторов в отношении опухолевых клеток снижалась в ряду *PLK1*, *CKS1B*, *POLD1*, *MCM2*, *CDC6*. Показано, что клонированный промотор гена *CKS1B* является двунаправленным и, по-видимому, направляет транскрипцию соседнего гена *SHC1*, ориентированного «голова к голове». Клонированные промоторы могут быть использованы для создания генно-инженерных противоопухолевых препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА промотор, клонирование, опухолеспецифичность, генная терапия опухолей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТНТ – точка начала транскрипции.

ВВЕДЕНИЕ

Среди актуальных направлений разработки противоопухолевых препаратов важное место занимает создание генно-инженерных векторов, экспрессирующих токсичные для опухолевых клеток продукты. Эти векторы должны содержать опухолеспецифичные регуляторные элементы, способные обеспечить экспрессию терапевтического гена в максимально возможном наборе опухолей и отсутствие его экспрессии в нормальных тканях. В настоящее время круг известных промоторов с такими свойствами ограничен.

В поиске новых опухолеспецифичных промоторов мы предположили, что опухолевой специфичностью могут обладать промоторы генов, участвующих в репликации ДНК, поскольку нарушение регуляции деления клеток считается общим свойством опухолей. Чтобы проверить правильность этой гипотезы, мы клонировали промоторы некоторых генов, вовлеченных в процессы синтеза ДНК и деления клетки, и оценили способность этих промоторов направлять экспрессию репортерного гена в нормальных и опухолевых клетках различного происхождения. Для клонирования мы выбрали промоторы генов *CDC6*, *POLD1*, *CKS1B*, *MCM2*, *PLK1*.

Продукт гена *CDC6* – гомолог белка *CDC6* *Saccharomyces cerevisiae*, необходимого для инициации репликации ДНК. *CDC6* служит регулятором ранних стадий репликации ДНК, а также участвует в контроле сверточной точки (check-point), определяющей завершение репликации ДНК перед началом митоза. Нарушение регуляции экспрессии *CDC6* ассоциировано с высоким риском развития рака [1, 2]. Ген *POLD1* кодирует каталитическую субъединицу ДНК-полимеразы δ , участвующей в репликации и репарации геномной ДНК человека. Эта субъединица обладает полимеразной (синтез ДНК) и экзонуклеазной (в направлении 3'→5') активностями. Кроме того, *POLD1* участвует в достройке фрагментов Оказаки, иницируемых комплексом ДНК-полимеразы α /праймазы. У мышей, дефектных по экзонуклеазной функции ДНК-полимеразы δ , чаще развиваются спонтанные опухоли [3]. Белок *CKS1B* представляет собой компонент протеинкиназы *CDC28*, необходимый для эмбриогенеза и правильного чередования фаз цикла соматических клеток [4]. *CKS1B* образует комплекс с белком *CDC2* и регулирует транскрипцию гена *CDC20*. Взаимодействие *CKS1B* с комплексом *SKP2*–циклин E-p27^{KIP} обеспечивает убиквитиниро-

Праймеры, использованные для амплификации промоторов

Промотор	Праймер (5'→3')
<i>POLD1</i> (-1338; +66)*	GGTACCTGAATACAATCCAGCCCGGAG GGTACCCCTCTACTCACCCGCTCAAAAC
<i>CDC6</i> (-1539; +238)	GCTAGCGATCATGGCAGGCACTCA GCTAGCTCAGACSTCCAGCGAGTCA
<i>CKS1B</i> (-910; +106)	GGTACCGGTCCCAAAAGATAAAGCTCC GGTACCTATGATCGCTCGGTTTGCTAG
<i>MCM2</i> (-1949; +57)	ATCCGAGGTGCATCCTTCCAC AGCAGTACCACGATCCTCTCC
<i>PLK1</i> (-2338; +35)	GCAAGACTCCATCTCAACAACA CAGACSTCGATCCGAGCAG

*Координаты промотора относительно точки начала транскрипции гена.

вание и деградацию p27 – блокатора клеток в фазе G0/G1 в ответ на различные сигналы и неблагоприятные воздействия, а также регулятора подвижности клеток и апоптоза [5]. Ген *CKS1B* расположен «голова к голове» с геном *SHC1* и, вероятно, использует общий с ним двунаправленный промотор [6]. Известно, что продукты гена *SHC1* регулируют передачу митогенных сигналов в клетке, участвуют в р53-зависимом апоптозе в условиях окислительного стресса и регуляции продолжительности жизни. Белок p66Shc играет важную роль в канцерогенезе и метастазировании опухолей [7]. Ген *MCM2* кодирует одну из субъединиц белкового комплекса MCM2-7, необходимого для инициации репликации ДНК, формирования репликативной вилки и привлечения других белков, участвующих в репликации ДНК. Взаимодействуя с другими белками инициаторного комплекса, MCM2 регулирует его хеликазную активность [8]. Промоторы генов *SHC1* и *MCM2* не охарактеризованы подробно. PLK1 (Polo-like kinase 1) – серин/треониновая протеинкиназа 1, выполняет несколько важнейших функций в ходе M-фазы клеточного цикла, включая регуляцию созревания centrosомы и сборки веретена деления, а также регуляцию завершения митоза и цитокинеза. Белок PLK1 необходим для восстановления клетки после повреждений ДНК и вхождения в митоз [9]. Перечисленные свойства шести генов и их повышенная экспрессия во многих опухолях человека (GeneHub GEPIS, [10]) позволяют надеяться, что выбранные промоторы будут обладать как опухолевой специфичностью, так и универсальностью в отношении опухолей, и смогут служить регуляторными элементами в составе противоопухолевых генно-инженерных конструкций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Промоторы амплифицировали из геномной ДНК человека с помощью Tersus и Encyclo ДНК-полимераз («Евроген», Россия). Промоторы клонировали в указанных координатах по отношению к точке начала транскрипции (ТНТ) и с использованием праймеров, приведенных в таблице. Все праймеры были синтезированы на синтезаторе Applied Biosystems ABI 3900. Амплифицированные фрагменты ДНК клонировали в вектор в pAL-TA («Евроген», Россия) и переклонировали в вектор pGL3 Basic Vector (Promega, WI, США) по соответствующим сайтам рестрикции перед геном люциферазы *Photinus pyralis*. Плазмидные клоны с промоторами в нужной ориентации отбирали с помощью рестрикционного анализа и секвенирования ДНК. Итоговые клоны с промоторами генов *CDC6*, *CKS1B*, *PLK1* не содержали замен нуклеотидов, а клоны с промоторами *POLD1* и *MCM2* содержали соответственно одну и две замены по отношению к нуклеотидным последовательностям, представленным в NCBI GenBank. Плазмидными клонами, содержащими клонированные промоторы, мы трансфицировали клетки следующих линий: A375 (злокачественная меланома, ATCC), A431 (эпидермоидная карцинома кожи, ATCC), A549 (рак легкого, ATCC), Calu1 (эпидермоидный рак легкого, ECACC), HepG2 (гепатоклеточный рак, ATCC), HT1080 (фибросаркома, ATCC), Panc-1 (эпителиоидный рак поджелудочной железы, ATCC), а также нормальные фибробласты IVL-7C. Фибробласты IVL-7C получены из морфологически нормальной ткани легкого от больного, оперированного по поводу рака легкого в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, с использованием методики, описанной ранее [11]. В качестве внутреннего контроля трансфекции применяли котрансфекцию с плазмидой pRL-TK (Promega, WI), экспрессирующей ген *Rluc*. Для нормирования результатов экспериментов использовали параллельную трансфекцию клеток векторами pGL3 Basic Vector, pGL3 Promoter Vector (Promega, WI) и pGL3-CMV Pr/Enh, содержащим перед геном *Luc* фрагмент AseI/BglII промотора ранних генов цитомегаловируса из плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Inc.). Для сравнения опухолевой специфичности промоторов клетки трансфицировали плазмидой на основе pGL3, содержащей промотор гена сурвивина (*BIRC5*) длиной 1500 п.н. [12]. Трансфекцию клеток проводили в 24-луночных планшетах с помощью Липофектамина 2000 (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Активность промоторов оценивали по хемилюминесценции клеточных экстрактов. Хемилюминесценцию измеряли с помощью набора Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, США) на планшетном люцинометре GENios Pro (Tecan, Швейцария). Значения

люминесценции для люциферазы *P. pyralis* нормировали по люминесценции для люциферазы *Renilla reinformis* в каждом измерении, вводили поправку на фоновую активность люциферазы по плазмиде pGL3 Basic Vector. Полученные значения усредняли по двум повторам в каждом эксперименте и по трем повторным экспериментам. Данные нормировали по активности люциферазы *P. pyralis* под контролем промотора SV40 в составе pGL3 Promoter Vector.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В опытах по трансфекции показано, что клонированные промоторы проявляют активность во всех использованных клетках. Следует отметить, что цитомегаловирусный промотор (CMV) в составе конструкции pGL3-CMV Promotor/Enhancer Vector работал в 100–1000 раз сильнее всех остальных промоторов. Активность промоторов генов *POLD1*, *CDC6*, *CKS1B*, *PLK1* и *MCM2* во всех опухолевых клетках человека оказалась выше, чем у промотора SV40, и была сопоставима с активностью промотора гена *BIRC5* (рис. 1А). В то же время в нормальных фибробластах исследуемые промоторы (за исключением промотора CMV) обеспечивали значительно более низкий уровень активности люциферазы, чем промотор SV40. Чтобы оценить опухолевую специфичность каждого клонированного промотора, мы рассчитали отношение уровней хемилюминесценции лизатов опухолевых клеток и фибробластов, трансфицированных плазмидами с соответствующими промоторами, и медиану этих отношений в качестве обобщенного показателя опухолевой специфичности промотора (рис. 1Б). Промотор гена *BIRC5*, как и в предыдущем исследовании [12], во всех опухолевых клетках был более активен, чем в нормальных фибробластах. Активность пяти клонированных промоторов в опухолевых клетках также превышала их активность в нормальных фибробластах ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). Опухолевая специфичность промоторов *POLD1*, *CDC6*, *CKS1B* и *MCM2* незначительно превышала этот показатель для промотора *BIRC5*. Промотор *PLK1* оказался намного специфичнее промотора *BIRC5* ($p < 0.01$ в тесте Манна–Уитни). Промотор CMV не проявил специфичности: он функционировал в одних опухолевых клетках сильнее, а в других слабее, чем в фибробластах.

Как отмечено выше, гены *CKS1B* и *SHC1* расположены в направлении «голова к голове» и, вероятно, используют общий двунаправленный промотор [6]. Поэтому при клонировании промотора *CKS1B* мы дополнительно отобрали плазмидный клон pGL3, содержащий этот промотор в противоположной ориентации. Координаты клонированного фрагмента ДНК по отношению к ТНТ гена *SHC1* соответство-

вали (–264; +751). Чтобы проверить промоторную активность клонированного фрагмента, мы трансфицировали этим клоном клетки А549 и нормальные фибробласты и измерили хемилюминесценцию клеточных лизатов. Результаты представлены на рис. 2. Здесь же для сравнения показаны результаты определения активности промотора *CDC6*, встроенного в противоположной ориентации (*CDC6-rev*), активность которого была такой же, как у контрольного вектора pGL3-BV, и промотора *BIRC5* в прямой ориентации. Оказалось, что активность клонированного промотора *SHC1* превышает активность промотора *CKS1B* как в опухолевых клетках, так и в нормальных фибробластах. Активность промотора *SHC1* в клетках аденокарциномы А549 примерно в 8 раз больше, чем в нормальных фибробластах, что меньше этого показателя для промотора *CKS1B*, но сопоставимо с опухолевой специфичностью промотора *BIRC5* (не показано). Поскольку спектр опухолей, в которых повышена экспрессия гена *SHC1*, меньше, чем опухолей с повышенной экспрессией других генов, использованных в нашей работе (GeneHub GEPIS, [10]), мы не изучали промотор *SHC1* на других клетках.

Таким образом, мы клонировали промоторы пяти генов, которые регулируют репликацию ДНК и деление клеток, проявляют опухолеспецифичную экспрессию и играют важные роли в процессах канцерогенеза. При трансфекции клеток плазмидными векторами, экспрессирующими ген люциферазы под управлением данных промоторов, эти промоторы проявили заметно большую активность в опухолевых клетках различного происхождения, чем в нормальных фибробластах. Активность и опухолевая специфичность клонированных промоторов, за исключением промотора *PLK1*, была сопоставима с показателями для ранее изученного промотора *BIRC5*, причем специфичность промоторов незначительно снижалась в ряду *CKS1B*, *POLD1*, *MCM2*, *CDC6*. Промотор *PLK1* обладал существенно большей опухолевой специфичностью при том, что уровни экспрессии репортерного гена под управлением промоторов *PLK1* и *BIRC5* в опухолевых клетках были примерно одинаковыми. Это выгодно отличает промотор *PLK1* от остальных промоторов и позволяет считать его наиболее перспективным для создания противоопухолевых генно-инженерных конструкций.

Мы также показали двунаправленную активность и высокую опухолевую специфичность клонированного промотора *CKS1B/SHC1*. Эти особенности следует учитывать при создании генно-инженерных векторов с данным промотором, так как его двунаправленная активность может приводить к нежелательной транскрипции последовательностей вектора

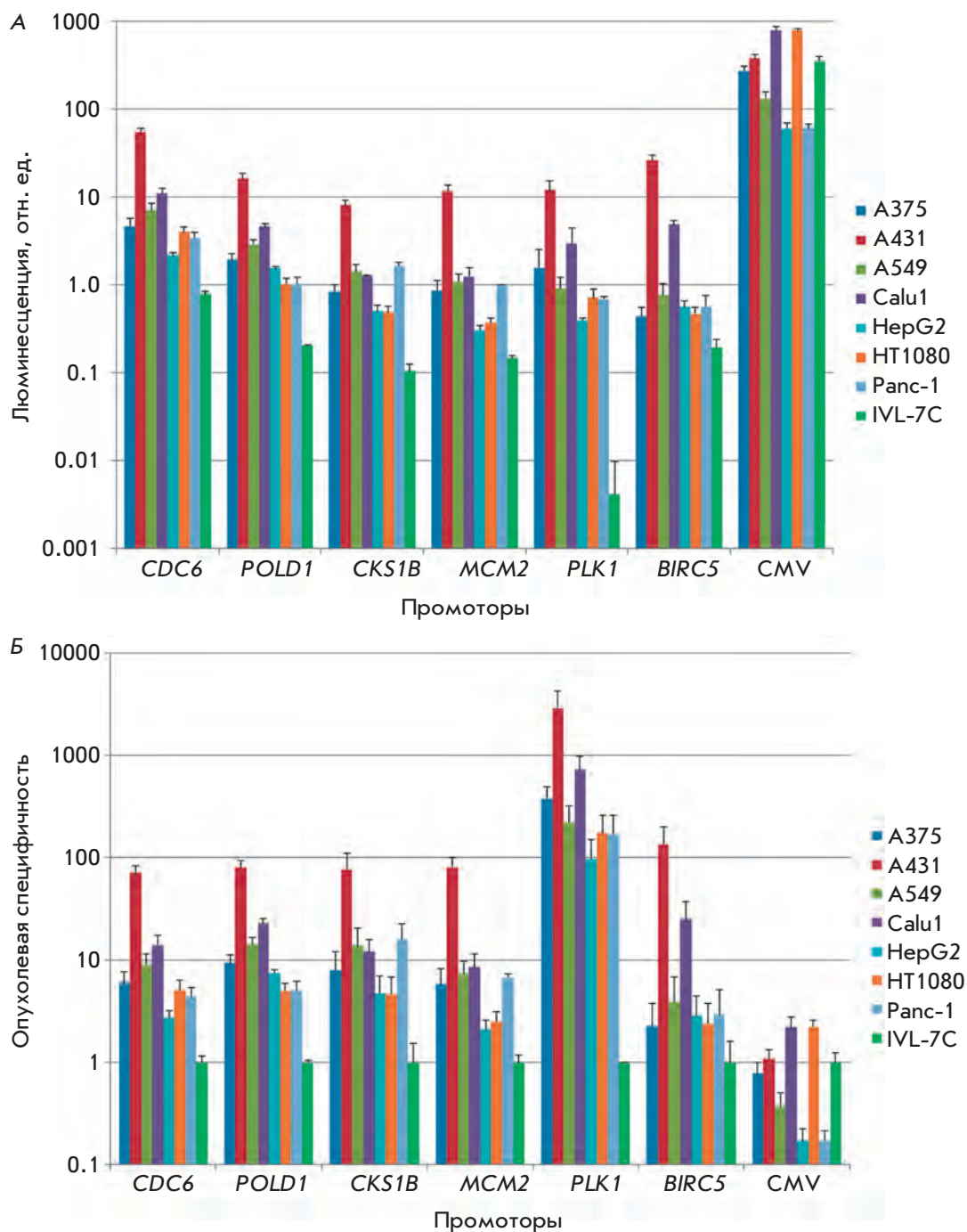


Рис. 1. Активность и опухолевая специфичность промоторов. А – Хемилюминесценция лизатов клеток, трансфицированных плазмидами с соответствующими промоторами (логарифмическая шкала). Представлены средние значения и стандартная ошибка среднего (SEM). Б – Опухолевая специфичность промоторов как отношение уровней хемилюминесценции лизатов опухолевых клеток и фибробластов для каждого промотора. М – медиана отношений уровней хемилюминесценции, обобщенный показатель опухолевой специфичности промотора

Промотор	<i>CDC6</i>	<i>POLD1</i>	<i>CKS1B</i>	<i>MCM2</i>	<i>PLK1</i>	<i>BIRC5</i>	<i>CMV</i>
М	5.95	9.37	12.19	6.80	220.00	2.94	0.78

в направлении, противоположном терапевтическому гену. С другой стороны, данный промотор, вероятно, можно использовать для одновременной экспрессии в опухолях двух терапевтических генов либо для создания противоопухолевых конструкций бинарного действия с более сложной регуляцией. Необходимо

дальнейшее изучение промотора *CKS1B/SHC1* и генов, экспрессию которых он направляет, в различных тканях и опухолях.

Следует отметить, что в работе использовали всего один неопухолевый контроль – нормальные фибробласты легкого. Учитывая источник клеток (нормаль-

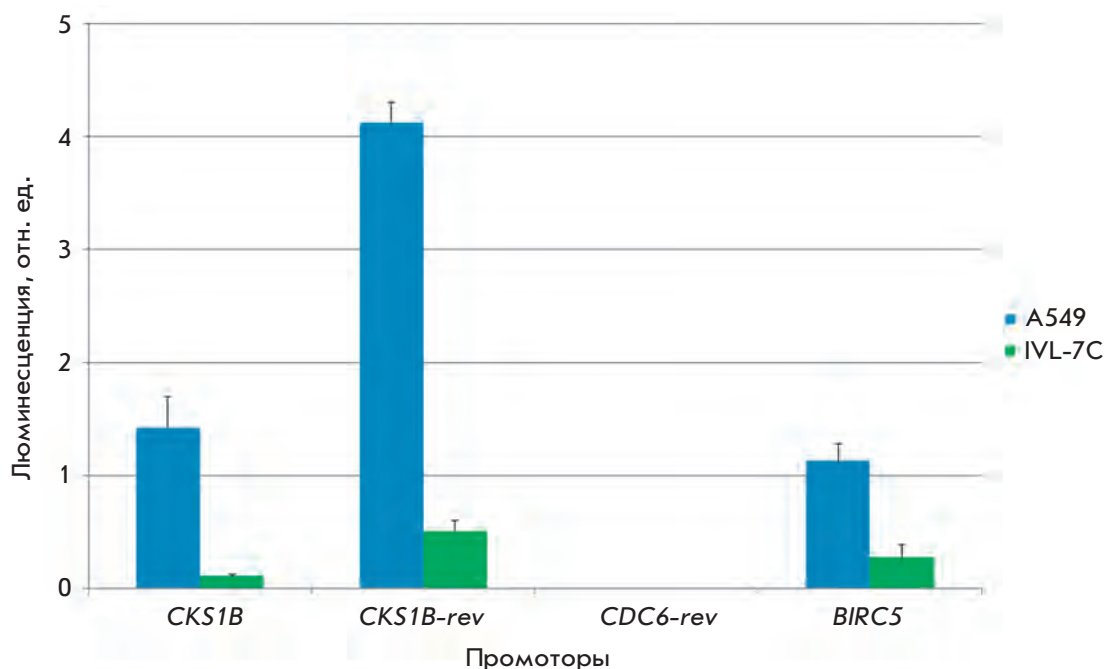


Рис. 2. Хемилюминесценция лизатов клеток A549 и IVL-7C, трансфицированных плазмидами на основе pGL3 с промоторами в прямой и обратной (rev) ориентациях. Показаны средние значения и стандартная ошибка среднего (SEM). Объяснения в тексте

ная ткань больного раком легкого), а также тот факт, что свойства клеток, делящихся в культуре, могут отличаться от их свойств в живом организме, клонированные промоторы необходимо изучить на моделях *in vivo*, чтобы получить однозначные выводы об опухолевой специфичности промоторов.

Значительная длина клонированных промоторов (от 1016 до 2373 п.н.) позволяет предположить, что они содержат наиболее важные элементы регуляции транскрипции, включающие кор-промотор и проксимальные регуляторные элементы. Однако нельзя исключить, что существуют дополнительные удаленные регуляторные элементы такие, как энхансеры, сайленсеры или другие элементы, которые также уча-

ствуют в регуляции активности данных промоторов. Сопоставление эндогенной активности соответствующих генов в различных клеточных линиях и тканях с полученными в нашей работе результатами позволит оценить относительный вклад собственно промотора и дополнительных регуляторных элементов. ●

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», программой «Ведущие научные школы РФ» (НШ1674.2012.4), а также Министерством промышленности и торговли РФ (Государственный контракт № 11411.1008700.13.084, 2011-2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kawakami H., Katayama T. // *Biochem. Cell Biol.* 2010. V. 88. P. 49–62.
- Borlado L.R., Mendez J. // *Carcinogenesis.* 2008. V. 29. P. 237–243.
- Lange S.S., Takata K., Wood R.D. // *Nat. Rev. Cancer.* 2011. V. 11. P. 96–110.
- Martinsson-Ahlzen H.S., Liberal V., Grunenfelder B., Chaves S.R., Spruck C.H., Reed S.I. // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 28. P. 5698–5709.
- Krishnan A., Nair S.A., Pillai M.R. // *J. Cell Mol. Med.* 2010. V. 14. P. 154–164.
- Davila Lopez M., Martinez Guerra J.J., Samuelsson T. // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e10654.
- Rajendran M., Thomes P., Zhang L., Veeramani S., Lin M.F. // *Cancer Metastasis Rev.* 2010. V. 29. P. 207–222.
- Masai H., You Z., Arai K. // *IUBMB Life.* 2005. V. 57. P. 323–335.
- Song B., Liu X.S., Liu X. // *Cell. Div.* 2012. V. 7. P. 3.
- Zhang Y., Luoh S.M., Hon L.S., Baertsch R., Wood W.I., Zhang Z. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. W152–158.
- Kopantzev E.P., Vayshlya N.A., Kopantseva M.R., Egorov V.I., Pikunov M., Zinovyeva M.V., Vinogradova T.V., Zborovskaya I.B., Sverdlov E.D. // *Br. J. Cancer.* 2010. V. 102. P. 1533–1540.
- Mityaev M.V., Kopantzev E.P., Buzdin A.A., Vinogradova T.V., Sverdlov E.D. // *Biochemistry (Mosc.).* 2010. V. 75. P. 182–191.

УДК 577.112.6:615.214.31

Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции в крысиных моделях болезни Альцгеймера

П. Ю. Поварнина*, О. Н. Воронцова, Т. А. Гудашева, Р. У. Островская, С. Б. Середенин
НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8
*E-mail: povarnina@gmail.com
Поступила в редакцию 12.01.2013

РЕФЕРАТ В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН синтезирован дипептидный миметик четвертой петли фактора роста нервов (NGF), гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинилглутамиллизина) (ГК-2). Этот миметик проявлял нейропротективную активность *in vitro* в наномолярных концентрациях, был эффективен *in vivo* в дозах 0.01–5 мг/кг при внутрибрюшинном (в/б) и 10 мг/кг при пероральном введении на моделях болезни Паркинсона, ишемического и геморрагического инсульта, глобальной ишемии головного мозга. В представленной работе изучены мнемотропные эффекты ГК-2 при субхроническом в/б введении в дозах 0.5 и 1 мг/кг на моделях болезни Альцгеймера (БА) у крыс. Установлено, что дипептид ГК-2 значительно препятствует нарушению негативного обучения (*habituation*), вызванному септо-гиппокампальной перерезкой. На стрептозотоциновой модели БА показано, что ГК-2 выражено противодействует дефициту пространственной памяти в водном лабиринте Морриса. Таким образом, ГК-2, оригинальный димерный дипептидный миметик NGF, проявляет активность на моделях БА при системном введении.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА низкомолекулярный миметик NGF, ГК-2, септо-гиппокампальная перерезка, стрептозотоциновая модель болезни Альцгеймера, негативное обучение (*habituation*), водный лабиринт Морриса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – болезнь Альцгеймера; NGF – фактор роста нервов (*nerve growth factor*); APP – белок-предшественник амилоида (*amyloid precursor protein*); в/б – внутрибрюшинно; ЛП – латентный период; ИОР – исследовательско-ориентировочная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенная причина деменции. Предполагается, что к 2050 году число больных БА удвоится [1]. В настоящее время не существует фармакологических препаратов, обеспечивающих длительную нейропротекцию при БА и ограничивающих развитие когнитивных нарушений [2].

Вовлеченность фактора роста нервов (NGF) в патогенез БА хорошо известна. Прогрессирующее снижение когнитивных функций при БА связано с дегенерацией холинергических нейронов базальных отделов переднего мозга [3], которые в центральной нервной системе являются основной мишенью данного нейротрофина, обеспечивающего сохранение их биохимического и морфологического фенотипа, выживаемость в присутствии повреждающих факторов [4]. NGF тормозит формирование в головном

мозге амилоидных бляшек и нейрофибриллярных сплетений – основных патоморфологических признаков БА, путем ингибирования амилоидогенного процессинга APP [5] и гиперфосфорилирования тау-белка, образующего нейрофибриллярные клубки [6].

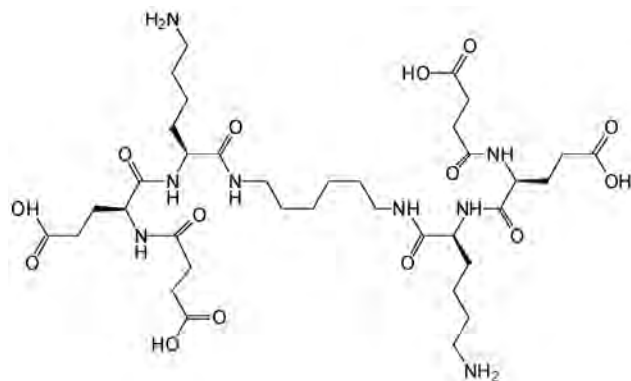
Точные причины возникновения sporadicческой БА до сих пор неизвестны, однако все больше подтверждений находит гипотеза об ухудшении трофической поддержки NGF холинергических нейронов базальных отделов переднего мозга как пусковом механизме заболевания [7, 8]. На трансгенных мышах линии AD11 (у этих мышей в постнатальном периоде вырабатываются антитела к NGF) было показано, что хроническая депривация NGF вызывает холинергический дефицит, потерю нейронов и синапсов, образование амилоидных бляшек и нейрофибриллярных сплетений, снижение си-

наптической пластичности и дефицит памяти [8]. Интраназальное введение NGF мышам линии AD11 препятствовало нарушению холинергической передачи, накоплению β -амилоида и гиперфосфорилированного тау-белка, развитию дефицита памяти [9].

На различных экспериментальных моделях БА, таких, как разрушение базальных ядер Мейнerta иботеновой кислотой, септо-гиппокампальная перерезка и естественное старение, было показано, что NGF при внутримозговом терапевтическом введении противодействует дегенерации холинергических нейронов, а также восстанавливает нарушенные когнитивные функции [10–12].

Неудовлетворительные фармакокинетические свойства, ограниченная способность проникать через гематоэнцефалический барьер и плеiotропность ограничивают применение нативного NGF в клинике. Поэтому в настоящее время ряд фармацевтических компаний и научных групп ведут разработку низкомолекулярных миметиков NGF [13–15].

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН на основе структуры β -изгиба четвертой петли NGF создан димерный дипептидный миметик ГК-2 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глутамиллизина)) [16]. ГК-2, как и NGF, вызывает фосфорилирование специфических рецепторов TrkA и Akt-киназ, вовлеченных в реализацию нейропротективных эффектов, опосредуемых данными рецепторами [17]. В экспериментах *in vitro* ГК-2 в наномолярных концентрациях проявлял высокую NGF-подобную нейропротективную активность, не обладая, в отличие от нативного белка, дифференцирующей активностью [18]. ГК-2 предотвращал вызванную H_2O_2 или глутаминовой кислотой гибель иммортилизованных нейронов гиппокампа мыши в культуре (линия HT-22), а также защищал клетки линии PC-12 феохромоцитомы крысы от действия нейротоксина МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) [19]. В экспериментальных моделях острой и хронической ишемии головного мозга у крыс дипептид ГК-2 проявлял нейропротективные свойства и улучшал когнитивные функции [20–22], снижал выраженность поведенческих симптомов на ряде моделей паркинсонического синдрома [23]. Дипептид ГК-2 малотоксичен ($LD_{50} = 714$ мг/кг при внутривенном введении беспородным мышам-самцам) и лишен основных побочных эффектов NGF. Он не снижает болевой порог (в дозах 0.5–2 мг/кг в/б в тесте «отдергивание хвоста» при термическом раздражении, температура воды 55°C) [24] и не вызывает потери веса при хроническом введении крысам (0.5 мг/кг, в/б) [25].



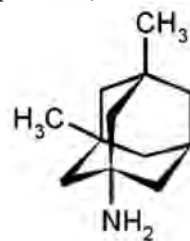
ГК-2

Цель данной работы состояла в изучении мнемоторных эффектов ГК-2 на моделях БА. Существуют два основных подхода к моделированию нарушений, характерных для БА, – хирургический и нейротоксический. В качестве первого подхода мы применяли перерезку септо-гиппокампального пути – хорошо изученную и широко используемую модель БА. Деафферентация гиппокампа вследствие септо-гиппокампальной перерезки приводит к развитию холинергического дефицита и связанного с ним нарушения когнитивных функций [26, 27]. На этой модели разные исследователи изучали эффекты NGF [28, 29], поэтому мы использовали ее для оценки активности миметика NGF ГК-2. В качестве нейротоксической модели применяли стрептозотоциновую модель БА, которая воспроизводит основные патологические процессы в головном мозге, включая накопление β -амилоида, гиперфосфорилированного тау-белка, а также нарушение пространственной памяти [30], характерное и для больных БА [31].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вещества

Дипептид ГК-2 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глутамиллизина), мол. масса 835 Да) синтезирован в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН [16]. Для наркоза применяли нембутал (Sigma, США). Мемантин (1-амино-3,5-диметиладмантана гидрохлорид, мол. масса 215 Да) получен в фирме Merck KGaA (Германия).



Мемантин

Нембутал вводили в виде взвеси в физрастворе, дипептид ГК-2 растворяли в дистиллированной воде, мемантин вводили в виде взвеси в дистиллированной воде. Все вещества (кроме стрептозотоцина) вводили в/б из расчета 2 мл/кг массы.

Дозы ГК-2 (0.5 и 1 мг/кг) были выбраны как наиболее эффективные *in vivo* на основании данных, полученных при изучении зависимости эффекта от дозы этого соединения на модели галоперидоловой каталепсии у крыс, используемой для скрининга соединений с потенциальной антипаркинсонической активностью [23]. Эффективность этих доз подтверждена также на различных моделях ишемии головного мозга [20–22].

Животные

Эксперименты проводили на 32 самцах беспородных белых крыс и 24 самцах крыс линии Вистар, полученных из питомника «Столбовая» РАМН. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и при естественной смене светового режима. Поведенческие эксперименты выполняли в зимний период в интервале 10.00–14.00 по местному времени. При работе с крысами соблюдали требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Изучение эффектов ГК-2 на модели БА с перерезкой септо-гиппокампального пути [26]

Дизайн исследования. Крысы линии Вистар массой 280–400 г были разделены случайным образом на три группы: ложнооперированные ($n=6$); оперированные ($n=10$); оперированные и получавшие дипептид ГК-2 ($n=8$). Дипептид ГК-2 (1 мг/кг) вводили через 2 ч после операции, а затем каждые 48 ч (всего семь инъекций). Группам «ложная операция» и «операция» вводили вместо ГК-2 дистиллированную воду по той же схеме в эквивалентных объемах. Через 48 ч после последней инъекции ГК-2 (или дистиллированной воды) животных тестировали в установке «Открытое поле».

Операция. Наркотизированное нембуталом (60 мг/кг) и осяльпированное животное помещали в стереотаксис. В кости черепа делали косые надрезы шириной 1 мм: начальная точка надреза находилась на уровне брегмы ($AP = 0.0$) и латеральнее ее на 2 мм ($L = \pm 2.0$); конечная точка надреза находилась на 2 мм каудальнее брегмы и на 1 мм латеральнее ее ($AP = -2.0$; $L = \pm 1.0$). После пропила кости твердую мозговую оболочку надрезали в области пропилов. В надрез опускали стерильную загнутую иглу на глубину 6.2 мм от поверх-

ности кости ($DV = +6.2$). С помощью одновременной работы двух винтов стереотаксиса иглу медленно перемещали почти до конечной точки косого разреза. Затем иглу медленно поднимали из надреза. Процедуру повторяли 2 раза на каждом полушарии. Процедура «ложной» операции была сходна с процедурой перерезки, за исключением того, что иглу опускали на глубину 3 мм от поверхности кости ($DV = +3.0$).

«Открытое поле». Этот тест широко используется для оценки общей двигательной и исследовательской активности [32]. Установка представляла собой круглую арену из белого поливинилхлорида. Диаметр арены 90 см, высота стенок 40 см. Пол арены расчерчен на 19 квадратов примерно одинаковой площади. Животное аккуратно помещали на пол в центре арены и на протяжении 4 мин регистрировали число пересеченных им квадратов и вертикальных стоек. Регистрацию проводили с помощью программы RealTimer (НПК «Открытая наука», Россия). Известно, что при перерезке септо-гиппокампального пути у крыс нарушается угасание исследовательско-ориентировочной реакции (ИОР) в тесте «Открытое поле» [33, 34]. Коэффициент угасания ИОР, отражающий способность крыс к негативному обучению (*habituation*), рассчитывали по формуле: $K_y = a/b$, где a – число пересеченных квадратов в группе в первую минуту наблюдения, а b – число пересеченных квадратов в группе в последнюю минуту наблюдения.

Изучение эффектов ГК-2 на модели БА с введением стрептозотоцина в желудочки головного мозга [30]

Дизайн исследования. Беспородных самцов крыс массой 330–380 г разделяли случайным образом на четыре группы: ложнооперированные ($n=6$); оперированные ($n=9$); оперированные и получавшие дипептид ГК-2 ($n=7$); оперированные и получавшие препарат сравнения мемантин ($n=6$). Дипептид ГК-2 (0.5 мг/кг или 6×10^{-7} моль/кг) вводили через 4 ч после операции, а затем 1 раз в сутки в течение 2 нед. (всего 14 инъекций). Мемантин вводили по той же схеме в дозе 10 мг/кг (4.6×10^{-5} моль/кг). Эта доза была выбрана как наиболее эффективная согласно литературным данным [35]. Группам «ложная операция» и «операция» вместо ГК-2 или мемантина вводили дистиллированную воду по той же схеме в эквивалентных объемах. Через 3 нед. после операции крыс в течение 5 дней обучали нахождению затопленной платформы в установке «Водный лабиринт Морриса», а через 1 нед. после окончания обучения тестировали на сохранение навыка.

Операция. Крысу под нембуталовым наркозом (60 мг/кг) помещали в стереотаксис и вводили ей билатерально в желудочки мозга стрептозотоцин в растворе Рингера (5 мкл в каждый желудочек) в дозе 3 мг/кг, по координатам $AP = -1$; $L = \pm 1.5$; $DV = +3.5$. Ложнооперированным животным в желудочки мозга вводили по 5 мкл раствора Рингера. Введение осуществляли со скоростью 1 мкл/мин, при этом после каждого микролитра делали паузы (1 мин), по окончании введения иглу оставляли на месте в течение еще 3 мин, а затем вынимали.

Водный лабиринт Морриса. Этот тест, предложенный впервые Р. Моррисом [36], применяется в основном для оценки пространственной памяти. Экспериментальная установка представляла собой бассейн из серого пластика (диаметр 150 см, высота 60 см). Бассейн наполняли водой (24–25°C) на 40 см. Бассейн был условно разделен на четыре сектора, в центре одного из которых располагалась платформа диаметром 10 см, на 2 см покрытая водой. Различные визуальные стимулы были размещены на стенах комнаты напротив каждого из условных секторов. Обучение навыку нахождения затопленной платформы осуществляли в течение 5 дней. В этот период ежедневно животных 4 раза помещали в воду из четырех разных стартовых точек у стенки бассейна (стартовые точки располагались в центре условных секторов). Последовательность стартовых точек была одинаковой для всех животных в течение дня и менялась каждый день. Интервал между посадками – 30 с. После достижения крысой платформы ее оставляли на ней в течение 5 с. Если животное в течение 60 с не находило затопленную платформу, его мягко направляли к ней. Через 1 нед. проводили тест на сохранение приобретенного навыка нахождения платформы. Для этого животных снова 4 раза помещали в воду из четырех разных стартовых точек. В каждой пробе регистрировали латентный период (ЛП) достижения затопленной платформы.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. В качестве критерия способности к пространственному обучению в установке «Водный лабиринт Морриса» использовали снижение среднего за день ЛП достижения платформы на протяжении периода обучения. В качестве критерия сохранности и эффективности воспроизведения полученного навыка использовали средний ЛП достижения платформы в день теста, а также ЛП достижения платформы в последнюю, четвертую тестовую посадку. Для анализа межгрупповых различий в установке «Водный лабиринт Морриса» использовали одно-

вариантный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с дальнейшим методом множественных сравнений по Фишеру. Для парных сравнений связанных выборок применяли критерий Вилкоксона. Данные представляли в виде медиан выборок, нижнего и верхнего квартилей. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Терапевтический эффект (T_s) дипептида ГК-2 рассчитывали по формуле:

$$T_s = [(c-d)/(e-d)] \times 100\%,$$

где c – значение параметра в группе «операция + лечение», d – значение параметра в группе «операция», e – значение параметра в группе «ложная операция».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дипептид ГК-2 противодействует вызванному перерезкой септо-гиппокампального пути нарушению когнитивных функций у крыс

Статистически значимых межгрупповых различий в интенсивности горизонтальной и вертикальной двигательной активности выявлено не было. Анализ динамики горизонтальной двигательной активности (число пересеченных квадратов) показал, что у ложнооперированных животных этот параметр выражено снижался и в 4-ю мин теста был значимо ниже, чем в первую ($K_y = 2.3$). Для грызунов характерно постепенное угасание ИОР при попадании в новую обстановку, оно обусловлено привыканием или негативным обучением. Перерезка септо-гиппокампального пути приводила к нарушению угасания ИОР с течением времени, что выражалось в почти неизменном уровне горизонтальной двигательной активности у оперированных крыс на протяжении всего времени тестирования ($K_y = 1$). Аналогичные результаты на данной модели получены и другими исследователями [33, 34]. Нарушение угасания ИОР в новой обстановке, вызванное септо-гиппокампальной перерезкой, вероятно, связано с нарушением пространственной памяти [33]. У оперированных животных, получавших ГК-2, наблюдалось восстановление способности к негативному обучению ($K_y = 1.9$) (табл. 1). Терапевтический эффект ГК-2 составлял около 70%.

Дипептид ГК-2 полностью восстанавливает нарушение пространственной памяти, вызванное введением стрептозотоцина в желудочки мозга крыс

Известно, что внутримозговое введение стрептозотоцина приводит к развитию когнитивного дефицита, который может быть зарегистрирован через 2 нед.

Таблица 1. Влияние ГК-2 на нарушение угасания ИОР в тесте «Открытое поле», вызванное перерезкой септо-гиппокампального пути

Группа	1-я мин	2-я мин	3-я мин	4-я мин	Коэффициент угасания
Ложная операция	21(15–32)	14(11–25)	9.5(7–16)*	9(8–13)*	2.3
Операция	11.5(8–35)	12(9–32)	19(11–24)	11.5(9–29)	1
Операция + ГК-2	12.5(9–21)	11.5(7–14)	15.5(8–17)	6.5(3–8)*	1.9

* $p < 0.05$ по сравнению с двигательной активностью в той же группе в первую минуту теста.

Примечание. Данные представлены в виде медиан соответствующих выборок. Коэффициент угасания (K_y) ИОР, отражающий способность крыс к негативному обучению, рассчитывали по формуле $K_y = a/b$, где a – число пересеченных квадратов в группе в первую минуту наблюдения, b – число пересеченных квадратов в группе в последнюю минуту наблюдения.

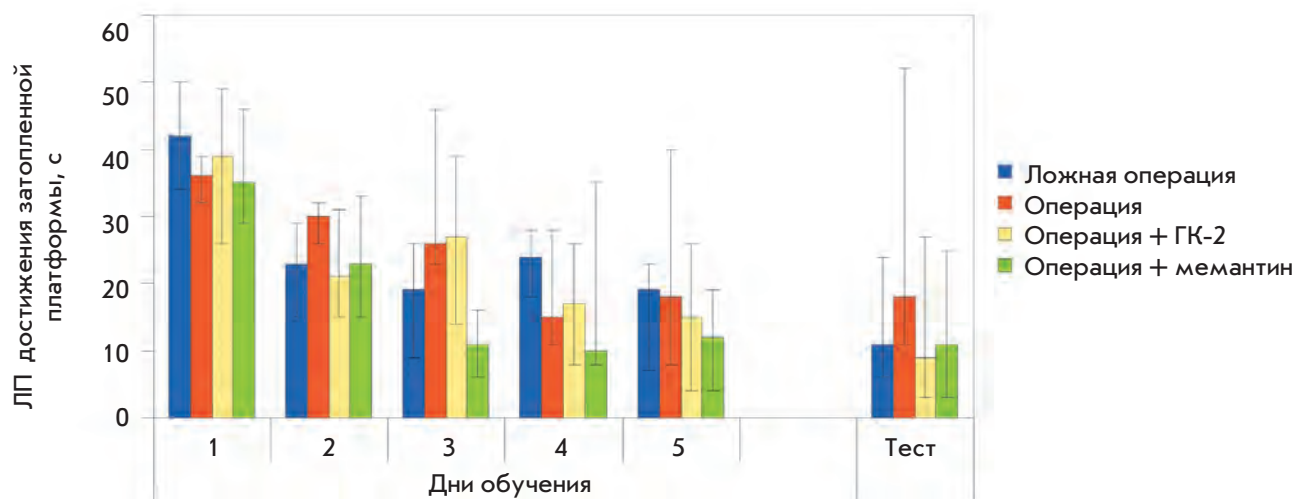


Рис. 1. Пространственное обучение и тест на сохранение навыка в водном лабиринте Морриса. Ложная операция – двустороннее введение раствора Рингера в желудочки мозга крысам плюс субхроническое внутрибрюшинное введение дистиллированной воды.

Операция – двустороннее введение стрептозотоцина, разведенного в растворе Рингера, в желудочки мозга крысам плюс субхроническое внутрибрюшинное введение дистиллированной воды.

Операция + ГК-2 – двустороннее введение стрептозотоцина, разведенного в растворе Рингера, в желудочки мозга крысам плюс субхроническое внутрибрюшинное введение дипептида ГК-2.

Операция + мемантин – двустороннее введение стрептозотоцина, разведенного в растворе Рингера, в желудочки мозга крысам плюс субхроническое внутрибрюшинное введение мемантина.

Для каждого животного усреднялись ЛП за четыре посадки в течение 1 дня. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных разбросов

после операции и прогрессирует на протяжении месяцев [30]. В частности, внутримозговое введение стрептозотоцина приводит к нарушению пространственной памяти в водном лабиринте Морриса. Данное нарушение коррелирует с биохимическими изменениями в гиппокампе – снижением активности ацетилхолинтрансферазы [30], а также со значительным снижением иммунореактивности транскрипци-

онного фактора CREB, который играет важную роль в регуляции процессов обучения и памяти, участвуя в трансформации кратковременной памяти в долговременную [37].

В нашей работе ЛП достижения платформы снижался во всех группах в процессе обучения; статистически значимых внутригрупповых различий в данный период не выявлено (рис. 1). Таким образом,

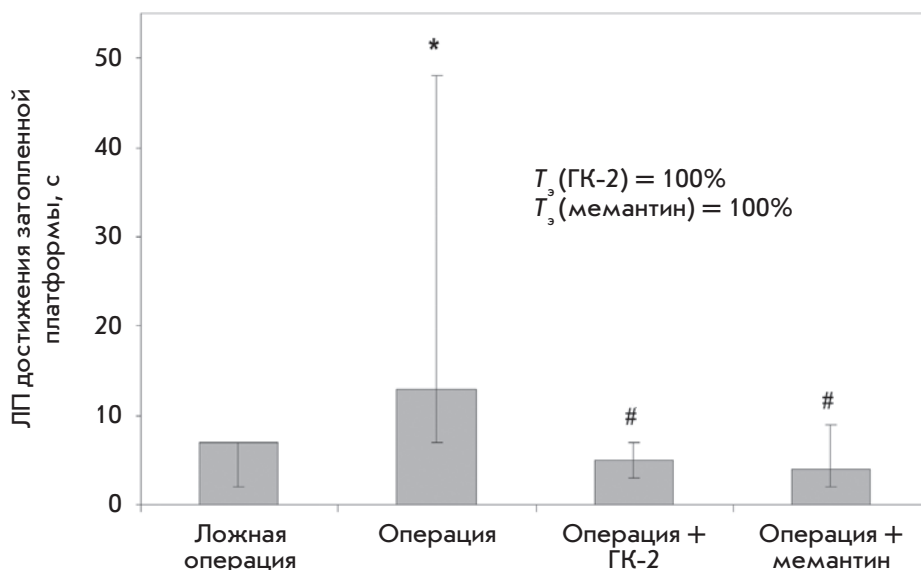


Рис. 2. Влияние ГК-2 на сохранение навыка нахождения затопленной платформы в установке «Водный лабиринт Морриса», нарушенное у крыс с экспериментальной БА, индуцированной введением стрептозотоцина в желудочки мозга. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных разбросов. * – $p = 0.017$ по сравнению с группой «ложная операция»; # – $p = 0.012$ («операция + ГК-2») и 0.014 («операция + мемантин») по сравнению с группой «операция» (одновариантный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с дальнейшим *post hoc*-анализом по Фишеру). Терапевтический эффект (T_3) дипептида ГК-2 рассчитывали по формуле: $T_3 = [(c-d)/(e-d)] \times 100\%$, где c – ЛП достижения платформы в группе «операция + лечение», d – ЛП достижения платформы в группе «операция», e – ЛП достижения платформы в группе «ложная операция»

введение стрептозотоцина не влияло на способность животных к обучению в водном лабиринте Морриса. Это может быть связано как с тем, что обучение мы проводили через 3 нед. после операции (вероятно, в этот период когнитивный дефицит еще не был достаточно выражен), так и с использованием беспородных крыс. В исследовании, проведенном Shingo и соавт. [37], внутримозговое введение стрептозотоцина также не влияло на способность крыс линии Вистар к обучению в водном лабиринте Морриса через 2 нед. после операции.

Тест на сохранение приобретенного навыка, проведенный через 1 нед. после окончания обучения, показал, что у ложнооперированных крыс средний (по четырем посадкам) ЛП достижения платформы имел тенденцию к снижению по сравнению с последним днем обучения, что согласуется с данными о повышении уровня воспроизведения долговременной пространственной памяти в отставленные сроки после обучения [38]. В то же время у оперированных крыс ЛП достижения платформы не снижался по сравнению с последним днем обучения и был выше, чем в группе «ложная операция», хотя эти результаты и были статистически недостоверными. У получавших ГК-2 животных ЛП достижения платформы не отличался от группы «ложная операция» (рис. 1).

Таблица 2. Влияние ГК-2 на ЛП нахождения затопленной платформы в водном лабиринте Морриса у крыс с экспериментальной БА, индуцированной введением стрептозотоцина в желудочки мозга

Группа	ЛП достижения затопленной платформы*
Ложная операция	7 (3–7)
Операция	13 (7–48)
Операция + ГК-2	5 (4–6.5)
Операция + мемантин	4 (2–8)

*Данные представлены в виде медиан, в скобках – интерквартильные разбросы.

Анализ межгрупповых различий по ЛП достижения затопленной платформы в последнюю, четвертую, тестовую посадку показал, что у оперированных крыс этот параметр был значимо выше, чем в группе «ложная операция» (рис. 2, табл. 2). Миметик NGF ГК-2 полностью предотвращал данное нарушение, не уступая по эффективности препарату сравнения мемантину (рис. 2).

Таким образом, дипептид ГК-2 противодействовал когнитивному дефициту на крысиных моделях БА.

Ранее установлено, что ГК-2 обладает нейропротективной активностью и действует по NGF-подобному механизму [18]. Известно, что NGF при внутримозговом введении восстанавливает когнитивные функции на *in vivo*-моделях БА. Так, введение на протяжении 14 дней мышинового NGF в желудочки головного мозга крыс, подвергнутых септо-гиппокампальной перерезке, приводило к значительному улучшению пространственной памяти в водном лабиринте Морриса с терапевтическим эффектом около 75% [28]. Описано восстановление холинергических нейронов под влиянием экзогенного NGF через 1 мес. после перерезки *fimbria-fornix* у крыс [29]. Улучшение пространственной памяти у крыс, получавших NGF, через 2 нед. после операции может быть связано с повышением выживаемости холинергических нейронов и/или улучшением холинергической передачи в гиппокампе [28]. Внутримозговое введение крысам рекомбинантного человеческого NGF на протяжении 3 нед. после разрушения базальных ядер Мейнерта иботеновой кислотой частично предотвращало нарушение способности к обучению в водном лабиринте Морриса с терапевтическим эффектом около 25% [39]. При этом введение рекомбинантного человеческого NGF приводило к снижению массы тела крыс. Помимо потери веса, известны такие побочные эффекты NGF, как болевой синдром [40, 41], гиперплазия Шванновских клеток и множественное прораствание сенсорных и симпатических нейритов в продолговатом и спинном мозге [42].

Описаны низкомолекулярные миметики NGF, активные на моделях БА. Непептидный миметик NGF, селективный агонист TrkA-рецепторов, названный D3, при внутримозговом введении (40 мкг на крысу)

восстанавливал холинергический дефицит и улучшал пространственную память у старых животных в водном лабиринте Морриса [43].

Другой низкомолекулярный непептидный миметик NGF MT2, также являющийся агонистом TrkA-рецепторов, проявлял нейропротективную и антиамилоидогенную активность на клеточной модели БА в концентрации 5–30 мкмоль/мл [44].

Данных о системном использовании как самого NGF, так и его низкомолекулярных миметиков, активирующих TrkA-рецепторы, в моделях БА нами не обнаружено. Известно лишь о непептидном агонисте p-75 рецепторов LM11A-31, который проявил нейропротективную и антиамнестическую активность на генетической мышинной модели БА [45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашем исследовании впервые получены данные о мнемотропных эффектах дипептидного миметика NGF, вызывающего фосфорилирование TrkA-рецепторов и Akt-киназа, при его системном введении в моделях БА.

Дипептид ГК-2 значительно препятствует нарушению негативного обучения (*habituation*), вызванному септо-гиппокампальной перерезкой. Аналогично мемантину, широко используемому в клинике БА, ГК-2 выражено противодействует дефициту пространственной памяти в водном лабиринте Морриса на стрептозотоциновой модели БА. При этом весовая активная доза ГК-2 в 20 раз, а молярная – примерно в 80 раз ниже, чем у мемантина.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки ГК-2 в качестве нейропротективного препарата, потенциально способного препятствовать развитию БА. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ubhi K., Masliah E. // *J. Alzheimers Dis.* 2013. V. 33. Suppl.1. P. 185–194.
2. Dunkel P., Chai C.L., Sperlagh B., Huleatt P.B., Matyus P. // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2012. V. 21. № 9. P. 1267–1308.
3. Gelfo F., Tirassa P., De Bartolo P., Caltagirone C., Petrosini L., Angelucci F. // *J. Alzheimers Dis.* 2011. V. 25. № 9. P. 213–217.
4. Sofroniew M.V., Howe C.L., Mobley W.C. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. № 24. P. 1217–1281.
5. Calissano P., Amadoro G., Matrone C., Ciafre S., Marolda R., Corsetti V., Ciotti M.T., Mercanti D., Di Luzio A., Seerini C. // *Cell Death Differ.* 2010. № 17. P. 1126–1133.
6. Calissano P., Matrone C., Amadoro G. // *Dev. Neurobiol.* 2010. V. 70. № 5. P. 372–382.
7. Cuello A.C., Bruno M.A. // *Neurochem. Res.* 2007. V. 32. № 6. P. 1041–1045.
8. Cattaneo A., Capsoni S., Paoletti F. // *J. Alzheimers Dis.* 2008. V. 15. № 2. P. 255–283.
9. Covaceuszach S., Capsoni S., Ugolini G., Spirito F., Vignone D., Cattaneo A. // *Curr. Alzheimer Res.* 2009. V. 6. № 2. P. 158–170.
10. Winkler J., Thal L.J. // *Exp. Neurol.* 1995. V. 136. № 2. P. 234–250.
11. Gu H., Long D., Song C., Li X. // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 453. № 3. P. 204–209.
12. Smith D.E., Roberts J., Gage F.H., Tuszynski M.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 19. P. 10893–10898.
13. Colangelo A.M., Bianco M.R., Vitagliano L., Cavaliere C., Cirillo G., De Gioia L., Diana D., Colombo D., Redaelli C., Zaccaro L., et al. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 11. P. 2698–2709.
14. Maliartchouk S., Feng Y., Ivanisevic L., Debeir T., Cuello A.C., Burgess K., Saragovi H.U. // *Mol. Pharmacol.* 2000. V. 57. № 2. P. 385–391.
15. Longo F.M., Xie Y., Massa S.M. // *Curr. Med. Chem.* 2005. V. 5. № 1. P. 29.
16. Середин С.Б., Гудашева Т.А. // Патент РФ. 2010. № 2410392.

17. Gudasheva T.A., Antipova T.A., Seredenin S.B. // XXII Intern. Symp. on Medicinal Chemistry. Book of Abstracts. Berlin: Chemmedchem. ISMC, 2012. P. 299.
18. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середин С.Б. // ДАН. 2010. Т. 434. № 4. С. 549–552.
19. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середин С.Б. // Бюл. эксп. биол. 2010. Т. 150. № 11. С. 537–540.
20. Середин С.Б., Силачев Д.Н., Гудашева Т.А., Пирогов Ю.А., Исаев Н.К. // Бюл. эксп. биол. 2011. Т. 151. № 5. С. 518–521.
21. Середин С.Б., Романова Г.А., Гудашева Т.А., Шакова Ф.М., Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Антипова Т.А. // Бюл. эксп. биол. 2010. Т. 150. № 10. С. 406–409.
22. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н., Николаев С.В., Антипова Т.А., Островская Р.У., Середин С.Б. // Эксп. клин. фарм. 2012. Т. 75. № 9. С. 15–20.
23. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н., Бондаренко Н.А., Середин С.Б. // Бюл. эксп. биол. 2011. Т. 151. № 6. С. 634–638.
24. Константинопольский М.А., Чернякова И.В., Колик Л.Г., Гудашева Т.А. // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». М.: Изд-во Фолиум, 2012. С. 94.
25. Поварнина П.Ю., Озерова И.В., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Середин С.Б. // ДАН. 2013. Т. 449. № 3. С. 364–366.
26. Krugel U., Bigl V., Eschrich K., Bigl M. // Int. J. Dev. Neurosci. 2001. V. 19. № 3. P. 263–277.
27. Lopez-Coviella I., Mellott T.J., Schnitzler A.C., Blusztajn J.K. // PLoS One. 2011. V. 6. № 6. e21166
28. Francis-Turner L., Valousková V. // Neurosci. Lett. 1996. V. 202. № 3. P. 193–196.
29. Miyamoto O., Itano T., Fujisawa M., Tokuda M., Matsui H., Nagao S., Hatase O. // Acta Med. Okayama. 1993. V. 47. № 3. P. 139–144.
30. Salkovic-Petrisic M., Hoyer S. // J. Neural. Transm. Suppl. 2007. № 72. P. 217–233.
31. Kovacs T., Carris N.J., Lantos P.L. // Neurorept. 2001. № 12. P. 285–288.
32. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 399 с.
33. Lamprea M.R., Cardenas F.P., Silveira R., Walsh T.J., Morato S. // Braz. J. Med. Biol. Res. 2003. V. 36. № 2. P. 233–238.
34. Cassel J.C., Kelche C., Peterson G.M., Ballough G.P., Goepf I., Will B. // Neuroscience. 1991. V. 45. № 3. P. 571–586.
35. Filali M., Lalonde R., Rivest S. // Neuropharmacology. 2011. V. 60. № 6. P. 930–936.
36. Morris R. // J. Neurosci. Meth. 1984. V. 11. № 1. P. 47–60.
37. Shingo A.S., Kanabayashi T., Murase T., Kito S. // Behavioural Brain Res. 2012. № 229. P. 378–383.
38. Солнцева С.В., Сторожева З.И., Никитин В.П. // Бюл. эксп. биол. 2012. Т. 153. № 5. С. 565–568.
39. Winkler J., Thail L.J. // Exp. Neurol. 1995. V. 136. № 2. P. 234–250.
40. Eriksdotter Jönhagen M., Nordberg A., Amberla K., Bäckman L., Ebendal T., Meyerson B., Olson L., Seiger, Shigeta M., Theodorsson E., et al. // Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 1998. V. 9. № 5. P. 246–257.
41. Apfel S.C., Schwartz S., Adornato B.T., Freeman R., Biton V., Rendell M., Vinik A., Giuliani M., Stevens J.C., Barbano R., et al. // JAMA. 2000. V. 284. № 17. P. 2215–2221.
42. Winkler J., Ramirez G.A., Kuhn H.G., Peterson D.A., Day-Lollini P.A., Stewart G.R., Tuszynski M.H., Gage F.H., Thal L.J. // Ann. Neurol. 1997. V. 41. № 1. P. 82–93.
43. Bruno M.A., Clarke P.B., Seltzer A., Quirion R., Burgess K., Cuello A.C., Saragovi H.U. // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 37. P. 8009–8018.
44. Scarpi D., Cirelli D., Matrone C., Castronovo G., Rosini P., Occhiato E.G., Romano F., Bartali L., Clemente A.M., Bottegoni G., et al. // Cell Death Dis. 2012. V. 3. № 7. P. 339.
45. Knowles J.K., Simmons D.A., Nguyen T.V., Vander Griend L., Xie Y., Zhang H., Yang T., Pollak J., Chang T., Arancio O., et al. // Neurobiol. Aging. 2013. V. 34. № 8. P. 2052–2063.

УДК 577.15; 615.355

Кинетические характеристики и цитотоксическая активность рекомбинантных препаратов метионин- γ -лиазы *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* и *Citrobacter freundii*

Е. А. Морозова¹, В. В. Куликова¹, Д. В. Яшин², Н. В. Ануфриева¹, Н. Ю. Анисимова³, С. В. Ревтович¹, М. И. Котлов⁴, Ю. Ф. Белый⁴, В. С. Покровский^{3*}, Т. В. Демидкина^{1*}

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

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

³Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское ш., 24

⁴Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*E-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru, tvd@eimb.ru

Поступила в редакцию 04.03.2013

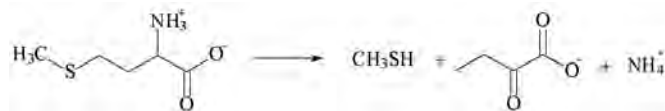
РЕФЕРАТ Определены параметры стационарной кинетики пиридоксаль-5'-фосфат-зависимой рекомбинантной метионин- γ -лиазы из трех патогенных бактерий – *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* и *Porphyromonas gingivalis* в реакциях γ - и β -элиминирования. Наибольшую каталитическую эффективность в реакции γ -элиминирования L-метионина имеет фермент из *C. sporogenes*. Показано, что фермент из этих трех источников является тетрамером, а наличие полигистидинового фрагмента на N-концах полипептидных цепей рекомбинантных ферментов влияет на их каталитическую активность и в условиях денатурации способствует агрегации мономеров с образованием димерных форм. На культурах опухолевых клеток K562, РС-3, LnCap, MCF7, SKOV-3, L5178у оценена цитотоксичность метионин- γ -лиазы *C. sporogenes* и *C. tetani* в сравнении с ферментом из *Citrobacter freundii*. Наиболее чувствительными были культуры клеток – K562, РС-3 и MCF7 – IC₅₀ = 0.4–1.3, 0.1–0.4 и 0.04–3.2 ед./мл соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кинетические параметры, метионин- γ -лиаза, патогенные микроорганизмы, олигомерная структура, цитотоксичность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДТТ – дитиотреитол; МГЛ – метионин- γ -лиаза; ПЛФ – пиридоксаль-5'-фосфат; His-tag – полигистидиновый фрагмент.

ВВЕДЕНИЕ

Метионин- γ -лиаза (МГЛ) [КФ 4.4.1.11] – пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент, катализирующий реакцию γ -элиминирования L-метионина с образованием метилмеркаптана, α -кетомасляной кислоты и аммиака:



Помимо физиологической реакции, фермент катализирует реакцию β -элиминирования L-цистеина и его S-замещенных производных с образованием со-

ответствующих меркаптанов, пировиноградной кислоты и аммиака [1]. Фермент был выделен из ряда бактерий, эукариотических простейших и грибов [2]. Этого фермента нет в клетках млекопитающих, но он присутствует у таких патогенных бактерий, как *Aeromonas* ssp. [3], *Clostridium sporogenes* [4], *Porphyromonas gingivalis* [5] и у патогенных простейших *Entamoeba histolytica* [6], *Trichomonas vaginalis* [7], что позволяет рассматривать его в качестве мишени для новых антибактериальных средств. Фермент представляет интерес в качестве противоопухолевого средства, поскольку для роста злокачественных клеток различного происхождения, в отличие

от нормальных, абсолютно необходим метионин [8]. Перспективность разработки противоопухолевого средства на основе МГЛ из *Pseudomonas putida* показана *in vitro* и *in vivo* [9–12]. Противоопухолевую активность фермента из *A. flavipes* в отношении ряда опухолей человека наблюдали *in vitro* [13]. В представленной работе определены некоторые кинетические характеристики рекомбинантных препаратов МГЛ, полученных из патогенных микроорганизмов – *C. tetani* (возбудитель столбняка), *C. sporogenes* (возбудитель газовой гангрены и энтеритов), *P. gingivalis* (возбудитель пародонтитов), и данные о цитотоксической активности фермента из этих источников и из *C. freundii*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выращивание бактериальных масс и очистка фермента

Клетки *Escherichia coli* BL21(DE3), содержащие гены МГЛ из *C. sporogenes*, *C. tetani*, *P. gingivalis* в плазмиде рЕТ-28а [14], выращивали на «индуцирующей» среде [15] при 37°C с перемешиванием (180 об/мин) в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием и хранили при –80°C. Разрушение клеток и освобождение от нуклеиновых кислот проводили согласно [16]. После отделения нуклеиновых кислот препараты переводили в 50 мМ калий-фосфатный буфер, рН 8,0, содержащий 0,05 мМ пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ), используя «Centricon-30 ultrafiltration unit» (Amicon, США). Полипептидные цепи фермента, выделенного из трех источников, содержали на N-концах полигистидиновые последовательности MGSSHHNNHHSSGLVPRGSH. Препараты очищали, используя аффинную хроматографию на колонке с сорбентом Ni²⁺ИМАС-сефароза (GE Healthcare, Швеция), для элюции МГЛ использовали градиент имидазола 10–500 мМ в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем 0,05 мМ ПЛФ. Фракции, имевшие характерные спектры пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов с λ_{\max} в области 420 нм, выходили при 25–155 мМ имидазола. Выращивание биомассы клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду с геном МГЛ из *C. freundii*, и очистку фермента проводили как описано в работе [17]. Концентрацию очищенных препаратов определяли, используя коэффициент $A_{1\%}^{278} = 0.8$ [17]. Чистоту препаратов проверяли при помощи электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли [18]. Полосы на электрофореграммах идентифицировали с использованием окрашивания Кумасси R-250 [19] и вестерн-блоттинга с реагентом на полигистидиновый фрагмент HisProbe-HRP (Thermo scientific, Rockford, IL, США) [20]. Активность препаратов в реакции

γ -элиминирования определяли по скорости образования α -кетомасляной кислоты в сопряженной реакции с D-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназой в условиях, описанных в работе [17]. За единицу ферментативной активности принимали количество МГЛ, катализирующее образование 1,0 мкМ/мин α -кетобутирата при 30°C. Удельные активности фермента из *C. tetani*, *C. sporogenes*, *P. gingivalis* и *C. freundii* составили 16,6, 12,8, 5,0, 10,2 ед./мг соответственно.

Отщепление His-tag проводили в реакции с тромбином. Реакционную смесь (1 мл), содержащую 10 мг фермента в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 8,0, 1 мМ ДТТ, 0,05 мМ ПЛФ и 100 ед. тромбина, инкубировали в течение 24 ч при 4°C. Далее препарат очищали гель-фильтрацией на колонке с Superdex 200 (GE Healthcare, Швеция), уравновешенной 50 мМ калий-фосфатным буфером, рН 8,0, содержащим 1 мМ ДТТ и 0,05 мМ ПЛФ. Гомогенность препарата определяли при помощи электрофореза в денатурирующих условиях.

Определение олигомерного состава МГЛ из *C. tetani*, *C. sporogenes*, *P. gingivalis*

Определяли молекулярные массы ферментов из *C. tetani*, *C. sporogenes*, *P. gingivalis* в препаратах, содержащих His-tag, и после отщепления фрагмента тромбином с последующей гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция). Для элюции использовали 50 мМ калий-фосфатный буфер, рН 8,0, содержащий 0,05 мМ ПЛФ и 1 мМ ДТТ.

Определение стационарных кинетических параметров реакций γ - и β -элиминирования

Стационарные параметры реакций γ - и β -элиминирования определяли по скорости образования α -кетомасляной и пировиноградной кислот в сопряженных реакциях с D-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназой и лактатдегидрогеназой в условиях, приведенных в работе [17], варьируя концентрацию субстратов в реакционных смесях. Данные обрабатывали согласно уравнению Михаэлиса–Ментен в программе Enzfitter. В расчетах использовали величины молекулярных масс субъединиц фермента с учетом His-tag, которые составляли 44,04, 44,36, 44,08 кДа для МГЛ из *C. tetani*, *C. sporogenes*, *P. gingivalis* соответственно.

Оценка цитотоксичности *in vitro*

Цитотоксическую активность МГЛ различного происхождения тестировали на линиях клеток лимфоценоза Фишера мышей L5178у (коллекция опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН), рака предстательной железы человека РС-3 и Ln-

Сар (АТСС, США), рака молочной железы человека МСF7 (АТСС, США), хронического эритробластного лейкоза человека К562 (АТСС, США), рака яичников человека SKOV-3 (коллекция опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone Laboratories, Великобритания), 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия). Достигшие логарифмической фазы роста клетки пассировали в плоскодонные 96-луночные микропланшеты (Costar, США) по (4–6) × 10⁴ клеток на лунку и преинкубировали в течение 24 ч перед добавлением тестируемых ферментов в указанных выше условиях. Световую микроскопию клеток проводили с помощью системы AxioVision 4 (Carl Zeiss, Германия). Жизнеспособность клеток определяли по исключению красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия). Число клеток подсчитывали в камере Горяева.

Препараты МГЛ в среде RPMI 1640 в широком диапазоне прогрессивно уменьшающихся концентраций добавляли в лунки с клеточной культурой и коинкубировали в течение 72 ч. В дополнение к МГЛ среда культивирования содержала 5 × 10⁻⁴ М ПЛФ. Диапазон концентраций ферментов в среде культивирования соответствовал 0.000001–6.2 ед./мл. В контрольные лунки добавляли в том же объеме среду RPMI 1640 с ПЛФ. Уровень клеточного метаболизма по окончании периода инкубации определяли с помощью стандартного МТТ-колориметрического метода [21]. Оптическое поглощение окрашенных растворов диметилсульфоксида измеряли на планшетном фотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) при λ = 540 нм. Жизнеспособность клеточной культуры после коинкубации с тестируемыми субстанциями оценивали по формуле: (N_o/N_к) × 100%, где N_o – оптическое поглощение в опытных пробах, N_к – оптическое поглощение в контроле. Методом нелинейной регрессии рассчитывали ингибирующую концентрацию каждого фермента в среде, т.е. концентрацию, которая вызывала снижение количества живых клеток на 50% (IC₅₀).

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали с применением пакета SPSS 11.5. Взаимосвязи IC₅₀ и K_м изучали с помощью корреляционного анализа Пирсона. Рассчитывали коэффициенты корреляции как по сгруппированным данным о цитотоксичности в различных клеточных линиях, так и в несгруппированных данных. В первом случае в корреляционный анализ включали среднее геометрическое значение IC₅₀ для различных культур клеток. Во втором случае цитотоксичность на каждой клеточной линии рассматривали отдельно, данные

предварительно логарифмировали для симметризации закона распределения.

Для сравнения цитотоксичности полученных ферментов *C. freundii*, *C. sporogenes* и *C. tetani* использовали однофакторный дисперсионный анализ. Поскольку дисперсии IC₅₀ в группах значительно различались, проводили анализ логарифмированных данных. Рассчитывали значения Mean ± SD – среднее арифметическое и стандартное отклонение; среднее геометрическое (антилогарифм средних логарифмированных значений); p_{ANOVA} = 0.005 – статистическую значимость различий по данным дисперсионного анализа в целом. Статистическую значимость различий цитотоксической активности разных ферментов оценивали по методу Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические параметры МГЛ из трех патогенных бактерий

Мы определили параметры стационарной кинетики МГЛ из трех источников в реакции γ-элиминирования для трех субстратов – L-метионина, L-метионинсульфоксида, S-этил-L-гомоцистеина, и в реакции β-элиминирования для двух субстратов – S-этил-L-цистеина и S-бензил-L-цистеина. Данные приведены в табл. 1 в сравнении с параметрами для МГЛ из *C. freundii*.

В целом кинетические параметры трех ферментов и МГЛ из *C. freundii* оказались сравнимыми. Фермент из *C. sporogenes* имеет наибольшую по сравнению с другими ферментами каталитическую эффективность (величина k_{кат}/K_м) в реакции с физиологическим субстратом, а фермент из *P. gingivalis* – наименьшую. Как упоминалось выше, ранее противоопухолевую активность определяли преимущественно для МГЛ из *P. putida* [22, 23]. Величины k_{кат}, K_м, k_{кат}/K_м реакции γ-элиминирования L-метионина у МГЛ из этого источника составляют 25.39 с⁻¹, 0.92 мМ, 2.76 × 10⁴ М⁻¹с⁻¹ соответственно [24]; т.е. фермент из *C. sporogenes* имеет лучшее сродство к L-метионину, чем МГЛ из *P. putida*, а их каталитические эффективности практически одинаковы.

Олигомерная структура рекомбинантных белков

Ранее было показано, что МГЛ из *P. putida* в растворе находится в виде тетрамера [25]. Данные рентгеноструктурного анализа рекомбинантной МГЛ *C. freundii* также свидетельствовали, что фермент представлен тетрамерной формой [26].

На электрофореграммах денатурированных препаратов из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis* выявлены две основные полосы – одна, соответствующая молекулярной массе субъединицы, и вторая, с мо-

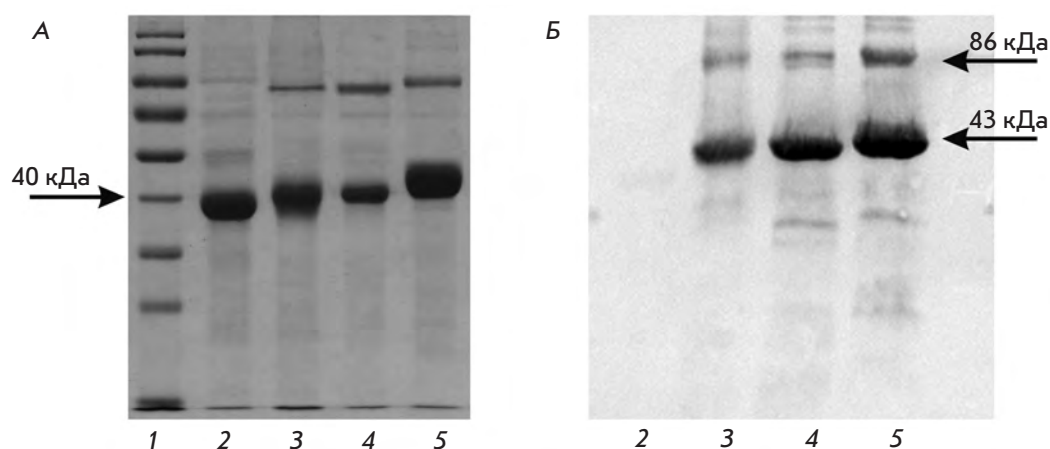


Рис. 1. Электрофорез (А) и вестерн-блот (Б) МГЛ из различных источников. 1 – Стандартные маркеры молекулярных масс, 2 – препарат МГЛ из *C. freundii*, 3 – препарат МГЛ из *P. gingivalis*, 4 – препарат МГЛ из *C. sporogenes*, 5 – препарат МГЛ из *C. tetani*

Таблица 1. Кинетические параметры МГЛ из различных источников*

Субстрат	МГЛ <i>P. gingivalis</i>			МГЛ <i>C. tetani</i>			МГЛ <i>C. sporogenes</i>			МГЛ <i>C. freundii</i> **		
	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{кат}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{кат}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{кат}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{кат}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹
L-Met	3.9	1.77	2.2×10^3	12	0.947	1.27×10^4	9.86	0.432	2.28×10^4	6.2	0.7	8.85×10^3
S-Et-L-Hcy	3.84	0.93	4.13×10^3	5.89	0.545	1.08×10^4	7.05	0.278	2.54×10^4	6.78	0.54	1.26×10^4
L-Met(SO)	5.05	12.22	4.13×10^2	2.7	7.07	3.82×10^2	6.7	33.51	2.0×10^2	2.52	6.21	4.06×10^2
S-Et-L-Cys	8.05	2.17	3.71×10^3	7.08	0.72	9.83×10^3	6.3	0.358	1.76×10^4	5.03	0.17	2.96×10^4
S-Bz-L-Cys	5.8	1.47	3.94×10^3	8.5	0.766	1.11×10^4	10	0.348	2.87×10^4	8.16	0.18	4.53×10^4

*Средняя квадратичная ошибка эксперимента при определении кинетических параметров не превышала 10%.

**Данные работ [16, 17].

лекулярной массой, большей в 2 раза (рис. 1А). Обе эти полосы взаимодействовали с реагентом на His-tag (рис. 1Б). Полосы, соответствующие димерной форме МГЛ, могли образоваться либо при окислении сульфгидрильных групп МГЛ в условиях проведения электрофореза по Лэммли, либо за счет His-tag. Во многих случаях присутствие His-tag на N-или C-концевых участках рекомбинантных белков не влияет на их структуру и функцию [27], однако имеются данные и о влиянии His-tag на структуру и функцию белков. Так, показано [28], что наличие His-tag на C-конце восстанавливает способность к димеризации мутантной формы ДНК-связывающего белка $\lambda^{30.5}$, в отличие от белка дикого типа к димеризации не способного. Присутствие His-tag на N-конце галактитол-1-фосфат-5-дегидрогеназы снизило стабильность фермента и привело к агрегации димерных молекул [29].

Можно было предположить, что присутствие на N-концах полипептидных цепей МГЛ из *C. sporo-*

genes, *C. tetani* и *P. gingivalis* последовательности MGSSHHHHHSSGLVPRGSH влияет на олигомерную организацию фермента.

Молекулярную массу нативных препаратов МГЛ из трех упомянутых выше источников и из *C. freundii* определяли методом гель-фильтрации. Установлено, что фермент из всех источников представлен тетрамерной формой. На рис. 2 приведены данные гель-фильтрации МГЛ из *C. sporogenes*. Показано, что молекулярные массы препаратов из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis* после отщепления His-tag тромбином составляют примерно 170 кДа, что соответствует тетрамерным формам. Следует отметить, что в препарате МГЛ из *C. tetani* присутствовала олигомерная форма (обладающая физиологической активностью МГЛ) с молекулярной массой приблизительно 258 кДа. На электрофореграммах всех препаратов димерные формы отсутствовали (рис. 3), что исключает упомянутую выше возможность их образования при окислении сульфгидриль-

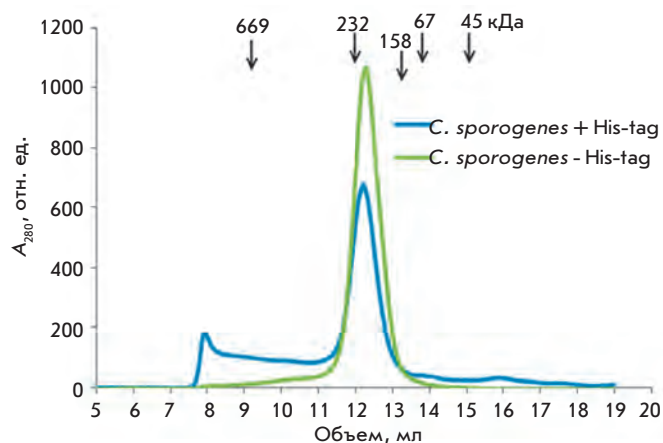


Рис. 2. Гель-фильтрация образцов МГЛ из *C. sporogenes*. Колонку калибровали с использованием стандартных маркеров, молекулярные массы которых указаны на рисунке

ных групп МГЛ в стандартных условиях электрофореза по Лэммли. Таким образом, димерная форма МГЛ наблюдается только при гель-электрофорезе денатурированных препаратов из трех источников, содержащих His-tag на N-концах полипептидных цепей.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа тетрамерная молекула *C. freundii* МГЛ состоит из двух каталитических димеров, в каждом из которых два активных центра образованы остатками из двух субъединиц. N-Концевые домены каждой из субъединиц участвуют как в формировании димера, образуя множественные водородные связи с остатками C-концевого домена соседней субъединицы, так и в ассоциации двух каталитических димеров, контактируя с остатками двух C-концевых доменов второго каталитического димера (рис. 4) [26]. Возможно, что N-концевой His-tag, присутствующий в молекулах МГЛ из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis*, образует дополнительные контакты с остатками C-концевого домена как каталитического димера, так и с C-концевыми остатками двух субъединиц второго каталитического димера, и в денатурированных препаратах может происходить димеризация субъединиц.

Удельная активность препаратов МГЛ из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis*, определенная после отщепления His-tag тромбином в реакции γ -элиминирования *L*-метионина, оказалась в 1.5 раза выше. Увеличение удельной активности препаратов на 50% нельзя объяснить только их незначительной дополнительной очисткой после обработки тромбином. Вероятно, присутствие His-tag может влиять на активность МГЛ.

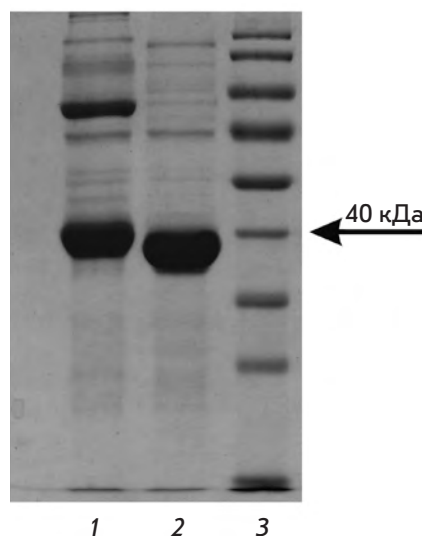


Рис. 3. Электрофорез образцов МГЛ из *C. sporogenes*. 1 – Препарат с His-tag, 2 – препарат после отщепления His-tag тромбином, 3 – стандартные маркеры молекулярных масс

Для объяснения разной каталитической эффективности ферментов и возможного влияния His-tag на N-концевых участках полипептидных цепей МГЛ из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis* на активность фермента требуются дальнейшие исследования с привлечением данных рентгеноструктурного анализа.

Цитотоксичность метионин- γ -лиазы *C. freundii*, *C. sporogenes* и *C. tetani*

Расчетные значения IC_{50} МГЛ различного происхождения на панели клеточных культур представлены в табл. 2. Наиболее чувствительными к действию ферментов оказались культуры клеток рака предстательной железы РС-3 и хронического эритробластного лейкоза человека К562, величины IC_{50} составили у них 0.1–0.4 и 0.4–1.3 ед./мл соответственно. Наименьшей чувствительностью характеризова-

Таблица 2. IC_{50} МГЛ для ряда культур опухолевых клеток

Культура клеток	IC_{50} МГЛ, ед./мл		
	<i>C. freundii</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. tetani</i>
К562	1.3	0.9	0.4
РС-3	0.1	0.4	–
LnCap	> 2.9	> 2.9	> 6.2
MCF7	0.5	0.04	3.2
L5178y	1.7	> 2.9	–
SCOV-3	–	–	5.3

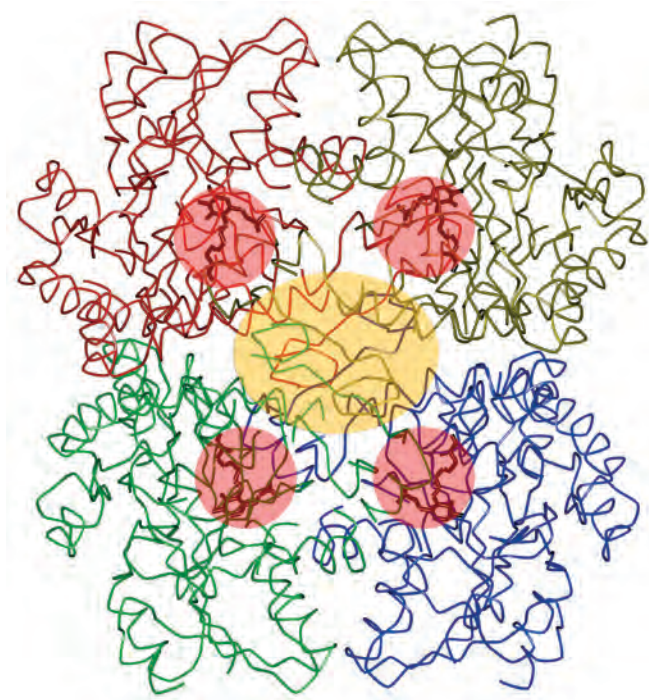


Рис. 4. Тетрамер МГЛ из *C. freundii*. Субъединицы окрашены разными цветами, активные центры отмечены розовым, область контактов между каталитическими димерами выделена желтым

лись клетки рака предстательной железы LnCap – в изученных диапазонах концентраций ни для одного из ферментов величину IC_{50} определить не удалось. Чувствительность клеток K562 и MCF7 к МГЛ отличается значительной вариабельностью.

Полученные результаты свидетельствуют об относительно высокой чувствительности большинства изученных клеток к МГЛ. Так, цитотоксичность МГЛ сопоставима с цитотоксичностью известных ферментов, в частности, *L*-аспарагиназы *E. coli*: на культурах клеток K562 и MCF7 IC_{50} для *L*-аспарагиназы *E. coli* составляет 0.8 и 10.9 ед./мл соответственно [30]. Наиболее близкой по уровню цитотоксичности к МГЛ *P. putida* оказался фермент *C. sporogenes*.

Существует статистически обоснованная гипотеза о прямой зависимости противоопухолевого эффек-

та препаратов, действие которых основано на разрушении другой аминокислоты – *L*-аспарагина (*L*-аспарагиназ) [31, 32]. В этой связи представляет интерес вклад ферментативной активности в реализацию цитотоксического эффекта МГЛ. При статистическом анализе сгруппированных данных о зависимости цитотоксичности МГЛ от K_m в отношении разных субстратов взаимосвязи между этими параметрами не обнаружены. Однако установлена тенденция к положительной взаимосвязи между K_m по отношению к *L*-метионину и IC_{50} ($r = 0.549$, $p = 0.100$), что косвенно подтверждает существование зависимости между ферментативным уменьшением уровня метионина в среде и цитотоксической активностью.

Выявленная тенденция к повышению IC_{50} при увеличении K_m может позволить с осторожностью прогнозировать возможность увеличения цитотоксичности МГЛ по мере повышения сродства к *L*-метионину. Это не противоречит существующей концепции об используемых в онкологии ферментах как о препаратах, противоопухолевый эффект которых связан с повышенной чувствительностью злокачественных клеток к дефициту аминокислот.

ВЫВОДЫ

Определение кинетических параметров и цитотоксической активности МГЛ из трех бактериальных источников показало, что фермент из *C. sporogenes* представляет наибольший интерес для дальнейших исследований. Он обладает минимальной величиной K_m по сравнению с другими изученными ферментами и наиболее высокой цитотоксичностью, близкой к цитотоксичности МГЛ из *P. putida*.

Результаты, полученные на культурах клеток K562, MCF7 и РС-3, позволяют считать перспективным дальнейшее изучение антипролиферативной активности МГЛ *in vivo*, а также на расширенной панели культур клеток *in vitro* с возможностью создания на основе этого фермента нового противоопухолевого препарата. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 11-04-12104-офи-м-2012) и грантом Президента РФ по поддержке ведущих научных школ (№ 2046.2012.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tanaka H., Esaki N., Soda K. // Enzyme Microb. Technol. 1985. V. 7. P. 530–537.
2. El-Sayed A.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. P. 445–467.
3. Nakayama T., Esaki N., Lee W.-J., Tanaka I., Tanaka H., Soda K. // Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48. P. 2367–2369.
4. Kreis W., Hession C. // Cancer Res. 1973. V. 33. P. 1862–1865.
5. Yoshimura M., Nakano Y., Yamashita Y., Oho T., Saito T., Koga T. // Infection Immunity. 2000. V. 68. P. 6912–6916.
6. Tokoro M., Asai T., Kobayashi S., Takeuchi T., Nozaki T. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 42717–42727.
7. Lockwood B., Coombs G. // Biochem. J. 1991. V. 279. P. 675–682.

8. Cellarier E., Durando X., Vasson M.P., Farges M.C., Demiden A., Maurizis J.C., Madelmont J.C., Chollet P. // *Cancer Treat Rev.* 2003. V. 29. P. 488–489.
9. Yoshioka T., Wada T., Uchida N., Maki H., Yoshida H., Ide N., Kasai H., Hojo K., Shono K., Maekawa R., et al. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. P. 2583–2587.
10. Miki K., Xu M., An Z., Wang X., Yang M., Al-Refaie W., Sun X., Baranov E., Tan Y., Chishima T., et al. // *Cancer Gene Ther.* 2000. V. 7. P. 332–338.
11. Miki K., Al-Refaie W., Xu M., Jiang P., Tan Y., Bouvet M., Zhao M., Gupta A., Chishima T., Shimada H., et al. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 2696–2702.
12. Tan Y., Xu M., Hoffman R.M. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. P. 1041–1046.
13. El-Sayed A.S., Shouman S.A., Nassrat H.M. // *Enzyme Microb. Technol.* 2012. V. 51. P. 200–210.
14. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Демидкина Т.В. // *ДАН.* 2012. Т. 445. С. 187–193.
15. Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 207–234.
16. Манухов И.В., Мамаева Д.В., Морозова Е.А., Расторгуев С.М., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В., Завильгельский Г.Б. // *Биохимия.* 2006. Т. 71. С. 454–463.
17. Морозова Е.А., Бажулина Н.П., Ануфриева Н.В., Мамаева Д.В., Ткачев Я.В., Стрельцов С.А., Тимофеев В.П., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. С. 1435–1445.
18. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
19. Meyer T.S., Lamberts B.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1965. V. 107. P. 144–145.
20. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 4350–4354.
21. Mossman T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63.
22. Xu W., Zhang X., Qian H., Zhu W., Sun X., Hu J., Zhou H., Chen Y. // *Exp. Biol. Med.* 2004. V. 229. P. 623–631.
23. Tan Y., Xu M., Hoffman R.M. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. P. 1041–1046.
24. Kudou D., Misaki S., Yamashita M., Tamura T., Esaki N., Inagaki K. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008. V. 72. P. 1722–1730.
25. Nakayama T., Esaki N., Sugie K., Berezov T.T., Tanaka H., Soda K. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 138. P. 421–424.
26. Mamaeva D.V., Morozova E.A., Nikulin A.D., Revtovich S.V., Nikonov S.V., Garber M.B., Demidkina T.V. // *Acta Cryst.* 2005. V. F61. P. 546–549.
27. Chant A., Kraemer-Pecore C.M., Watkin R., Kneale G.G. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 39. P. 152–159.
28. Wu J., Filutowicz M. // *Acta Biochem. Pol.* 1999. V. 46. P. 591–599.
29. Esteban-Torres M., Alvarez Y., Acebrón I., de las Rivas B., Muñoz R., Kohring G.W., Roa A.M., Sobrino M., Mancheño J.M. // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. P. 3127–3133.
30. Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovsky V.S., Omeljanjuk N.M., Borisova A.A., Anisimova N.Yu., Sokolov N.N. // *Protein Expr. Purif.* 2012. V. 82. P. 150–154.
31. Соколов Н.Н., Занин В.А., Александрова С.С. // *Вопр. мед. химии.* 2000. Т. 46. С. 531–548.
32. Красоткина Ю.В., Гладилина Ю.А., Борисова А.А., Гервазиев Ю.В., Абакумова О.Ю., Занин В.А., Соколов Н.Н. // *Вопр. биол. мед. фарм. химии.* 2008. № 3. С. 18–21.

УДК 577.2:616,577.2:579

Влияние аллелей гена *ADH1B* и уровня образования на характер потребления алкоголя у российских мужчин

С. А. Боринская^{1,2*}, А. А. Ким^{1,3}, А. В. Рубанович¹, Н. К. Янковский^{1,3,4}¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3²Московский государственный медико-стоматологический университет, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1³Московский государственный физико-технический институт (государственный университет), 141700, Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер., 9⁴Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: borinskaya@vigg.ru

Поступила в редакцию 05.03.2013

РЕФЕРАТ Злоупотребление алкоголем является одной из основных причин низкой продолжительности жизни в Российской Федерации. На количество потребляемого алкоголя влияют как социальные, так и генетические факторы. К генетическим факторам относятся аллели генов алкогольдегидрогеназы (*ADH1B*) и альдегиддегидрогеназы (*ALDH2*). В представленном исследовании определены частоты аллелей этих генов в группе из 642 русских мужчин с установленным по данным опроса количеством потребляемого алкоголя и характером потребления (частота потребления, типы алкогольных напитков, наличие запоев). Из них 68 (10.6%) индивидов были гетерозиготными носителями аллеля *ADH1B*48His* и 2 (0.3%) – носителями аллеля *ALDH2*504Lys*. Впервые описано влияние аллелей гена *ADH1B* на характер потребления алкоголя в российских популяциях. У носителей аллеля *ADH1B*48His* количество потребляемого алкоголя ниже в среднем на 21.6% (1733 г этанола в год). У русских мужчин с высшим образованием потребление алкоголя в среднем на 9.8% (793 г этанола в год) ниже, чем у мужчин со средним или начальным образованием. Таким образом, влияние генетического фактора (протективный эффект аллеля *ADH1B*48His*) на снижение потребления алкоголя оказалось более значительным, чем ранее описанное влияние высшего образования. Оба фактора влияют также на опасные стили потребления алкоголя: запои и потребление суррогатов. Доля лиц с запоями среди носителей генотипа *Arg/Arg* составила 8.4%, тогда как среди носителей аллеля *His* запои не выявлены ($OR = 12.6$, $P = 0.006$). Среди лиц с высшим образованием меньше доля потребляющих алкогольсодержащие суррогаты (0.6%), тогда как при более низком уровне образования частота потребления суррогатов выше – 6.0% ($OR = 10.0$, $P = 0.004$). Высшее образование снижает также и вероятность наличия запоев. В представленной работе впервые оценено влияние аллелей гена *ADH1B* на количество потребляемого алкоголя и проведено сравнение роли генетических и социальных факторов, влияющих на характер потребления алкоголя у русских мужчин.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА потребление алкоголя, социальные факторы, генетический полиморфизм, ген *ADH1B*.

ВВЕДЕНИЕ

Злоупотребление алкоголем является одной из основных причин низкой продолжительности жизни в Российской Федерации. От трети до более половины смертей мужчин трудоспособного возраста составляют прямые и непрямые алкогольные потери [1–4].

Основная часть экзогенного этанола (до 80–90% экзогенного алкоголя) окисляется печеночными ферментами – алкогольдегидрогеназой (АДГ) и альдегиддегидрогеназой (АльДГ). Второе по значению

место (около 9%) принадлежит окислению микросомальными системами (цитохром P450), вклад окисления этанола каталазой в пероксисомах составляет примерно 1% [5–7].

У человека выявлено семь генов АДГ, различающихся уровнем экспрессии в разных тканях в разные периоды жизни [8]. Экзогенный этанол окисляется преимущественно ферментом, кодируемым геном *ADH1B*. Однонуклеотидный полиморфизм (замена G на A) в гене *ADH1B* соответствует замене Arg48His

в участке аминокислотной последовательности, влияющем на скорость работы фермента. АДГ, содержащая His48 (аллель *ADH1B*48His*), в 100 раз более активна, чем вариант, несущий Arg (аллель *ADH1B*48Arg*) [9, 10].

Ацетальдегид, образующийся при действии АДГ на этанол, окисляется до ацетата под действием АльДГ. До 95% ацетальдегида метаболизируется митохондриальной АльДГ, кодируемой геном *ALDH2* [11, 12]. Однонуклеотидный полиморфизм (также замена G на A) в гене *ALDH2* соответствует замене Glu504Lys в молекуле фермента. Вариант *ALDH2*504Lys* соответствует неактивному ферменту. У гомозиготных носителей данного аллеля фермент нефункционален. АльДГ представляет собой гомотетрамер, даже одна нефункциональная субъединица в составе которого приводит к инактивации всего комплекса, поэтому активность данного фермента у гетерозигот не превышает 6% от активности у гомозиготных носителей аллеля *504Glu* [13].

Ацетат, полученный в результате окисления ацетальдегида, утилизируется в цикле трикарбоновых кислот с выделением конечных продуктов распада – углекислого газа и воды. При потреблении больших количеств экзогенного алкоголя последствия интоксикации определяются не столько токсичностью самого этанола, сколько чрезвычайно сильным влиянием продукта его окисления – ацетальдегида [6]. У носителей аллеля *ALDH2*504Lys* (сниженная скорость детоксикации ацетальдегида) после приема алкоголя концентрация ацетальдегида в крови значительно повышена и сильнее выражены токсические эффекты [14]. Гетерозиготные носители аллеля *ALDH2*504Lys* потребляют меньше алкоголя, чем индивиды, у которых аллель отсутствует, и имеют более низкий риск развития алкоголизма [15, 16]. Менее выраженным протективным эффектом обладает аллель *ADH1B*48His* как в комбинации с аллелем *ALDH2*504Lys* в популяциях японцев и корейцев [6, 16], так и без учета других аллелей у белых американцев [17] и австралийцев [18]. Влияние аллелей *ADH1B*48His* и *ALDH2*504Lys* на характер потребления алкоголя и количество потребляемого алкоголя в российских популяциях не установлено.

Частота аллеля *ALDH2*504Lys* варьирует от 40% в популяциях Восточной Азии до менее 1–2% в популяциях Средней Азии. В европейских популяциях данный аллель практически отсутствует, в нескольких изученных группах русских обнаружен лишь один носитель данного аллеля [19]. Частота аллеля *ADH1B*48His* максимальна также в популяциях Восточной Азии (70%), а в Европе варьирует от менее 1 до 8–10% [20]. В разных группах русских носителями аллеля *ADH1B*48His* являются от 5 до 15% индиви-

дов, что соответствует частоте аллеля от 2.5–8% [20].

В данной статье представлены результаты изучения роли аллелей *ALDH2*504Lys* и *ADH1B*48His* в потреблении алкоголя русскими мужчинами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для исследования послужили образцы крови 642 русских мужчин в возрасте от 22 до 59 лет, собранные во время «Ижевского исследования семей» в 2008–2009 годах [2, 21]. Известны результаты биохимического и иммунологического анализа каждого образца крови. Этническая принадлежность, уровень образования, характер потребления алкоголя и количество потребляемого алкоголя были установлены по опросу самих индивидов и их родственников. Опрос проводили специально обученные эксперты в соответствии с анкетой, разработанной для целей Ижевского исследования семей [2, 21]. Среди обследованных 24.6% (158 человек) имели высшее образование.

Респондентам задавали вопросы о количестве и частоте потребляемых алкогольных напитков (каждый день или почти каждый день, 3–4 раза в неделю, 1–2 раза в неделю, 1–3 раза в месяц, несколько раз в год, никогда или почти никогда). Количество потребляемых за один раз напитков каждого типа (пиво, вина, крепкие алкогольные напитки, суррогаты) фиксировали в привычных для жителей России единицах измерения (бутылка, граммы вина или крепких напитков). Объем чистого этилового спирта в выпитых за прошедший год напитках рассчитывали на основе частоты приема, объема потребления и крепости напитков. Концентрацию этанола в алкогольных напитках каждого типа определяли путем сбора данных с заводских этикеток напитков, продаваемых в Ижевске. Концентрацию алкоголя в водке дополнительно уточняли на основе лабораторных анализов. В расчетах было принято объемное содержание этанола в пиве – 4.5%, в вине – 12% и в крепких спиртных напитках – 43%. Для непьющего алкоголя (суррогатов) выясняли только частоту потребления, поскольку отсутствуют стандартные меры объема их потребления и невозможно установить содержание алкоголя во всех видах суррогатов [2, 21]. Поэтому из расчетов, включавших оценку количества потребляемого алкоголя, потребители суррогатов были исключены. Характеристика потребления алкоголя в исследованной выборке представлена в *табл. 1*.

ДНК выделяли сорбентным методом с помощью колонок QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) согласно инструкции производителя.

Определение генотипов по полиморфизмам *ADH1B*Arg48His* (rs1229984) и *ALDH2*Glu504Lys*

Таблица 1. Потребление алкоголя в группе русских мужчин

Потребление алкоголя	Число индивидов
Всего генотипировано	642 (100%)
В год, предшествовавший опросу, алкоголь не потребляли	83 (12.9%)
- из них потребляли ранее	80 (12.5%)
- никогда не потребляли	3 (0.5%)
В год, предшествовавший опросу, потребляли алкоголь еженедельно	320 (49.8%)
- в том числе ежедневно	47 (7.3%)
В год, предшествовавший опросу, имели запои	48 (7.5%)
В год, предшествовавший опросу, потребляли суррогаты*	30 (4.7%)

*Под суррогатами понимают непредназначенные для питья жидкости, содержащие алкоголь (одеколон, аптечные спиртосодержащие настойки, технические спиртосодержащие жидкости и др.).

(rs671) проводили одновременно с применением дуплексной четырехпраймерной ПЦР [22].

Для получения описательных статистик и при проведении множественного регрессионного анализа использовался пакет программ STATISTICA 6.0. Межгрупповые различия по количественным признакам оценивались с помощью непараметрического теста Манна-Уитни. При оценке отношения шансов (OR) и значимости отличий частот по точному тесту Фишера использовали свободно распространяемый пакет программ WinPepi: www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html [23]. При наличии нулей в таблице сопряженности 2 × 2 для оценки OR программа к каждой ячейке добавляет 1/2.

Различия в потреблении алкоголя носителями разных генотипов (D) и вклад факторов, снижающих потребление алкоголя, в общее снижение потребления в группе (I), оценивали с использованием формулы:

$$D = \frac{\bar{x}_0 - \bar{x}_1}{x_0}$$

$$I = \frac{\bar{x}_0 n_1 - \bar{x}_1 n_1}{x_0 n_0 + x_1 n_1} = \frac{(\bar{x}_0 - \bar{x}_1) n_1}{(\bar{x}_0 + \bar{x}_1 \frac{n_1}{n_0}) n_0} \approx \frac{(\bar{x}_0 - \bar{x}_1) n_1}{x_0 n_0}$$

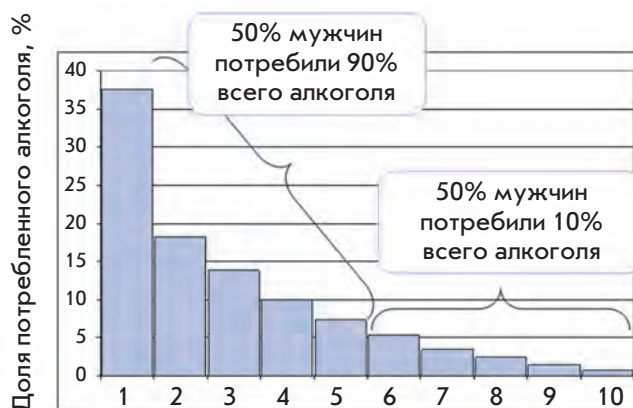


Рис. 1. Распределение потребляемого алкоголя в исследуемой выборке между группами мужчин (децилями), ранжированными по количеству выпитого за год алкоголя. Непьющие алкоголь и потребители суррогатов исключены

где D – относительный риск для носителей генотипа Arg/Arg, \bar{x}_i – средний уровень потребления алкоголя для i-го генотипа; n_i – численность носителей i-го генотипа, I – вклад фактора в снижение общего уровня потребления в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее потребление алкоголя в пересчете на этиловый спирт составило в обследованной группе 6979 ± 364 г на человека в год (без учета потребителей суррогатов). Это соответствует примерно 34 полулитровым бутылкам водки (с вариациями от 0 до 348 бутылок у отдельных индивидов). Указанное среднее количество потребляемого алкоголя в пересчете на этанол в 2 раза ниже экспертной оценки среднего количества алкоголя, потребляемого индивидом в России [24]. Два фактора могут вносить вклад в такое расхождение. Во-первых, в изученной группе относительно невелика доля лиц молодого возраста, наиболее активно потребляющих алкоголь. Во-вторых, расхождение в оценке количества алкоголя, потребленного респондентами за определенный период (месяц, предшествовавший опросу), полученной при опросах, с количеством, фиксируемым ежедневно на протяжении того же периода, отмечено в ряде исследований [25]. У россиян оценка по опросам оказывается заниженной примерно в 2 раза [26].

При этом, согласно оценке, полученной по результатам опроса, в данной группе 14% сильно пьющих мужчин потребляют половину алкоголя, выпитого за год всеми индивидами. То есть у этих 14% средний

уровень потребления алкоголя составляет около 143 бутылок водки в год на человека, тогда как у остальных 86% – в среднем около 23. Распределение количества алкоголя (в процентах от количества, потребленного всей группой) в подгруппах мужчин, ранжированных от максимального к минимальному уровню потребления, представлено на *рис. 1*.

Определены генотипы каждого индивида по полиморфизмам *ADH1B*Arg48His* и *ALDH2*Glu504Lys*. Частота гетерозиготных носителей аллеля *ADH1B*48His* составила 10.6%, гомозиготные носители этого аллеля не были выявлены (*табл. 2*). Частота аллеля *ADH1B*48His* в исследованной группе составила 5.2%, что соответствует частоте в ранее изученных группах русских [20]. Распределение частот генотипов соответствует равновесному распределению Харди–Вайнберга.

Так как в изученной группе всего лишь два индивида несли аллель *ALDH2*504Lys*, что соответствует частоте 0.16%, этот аллель из дальнейшего анализа был исключен.

Нами оценено влияние аллеля *ADH1B*48His* на количество потребляемого алкоголя в изученной группе. Лица, употреблявшие суррогаты, были ис-

ключены, так как невозможно оценить количество потребляемого ими алкоголя.

Ассоциацию аллеля *ADH1B*48His* с количеством потребляемого алкоголя анализировали с использованием двух оценок: частоты аллеля в группах с различным уровнем потребления алкоголя и сравнения количества потребляемого алкоголя у индивидов с различными генотипами в разных возрастных группах.

Для оценки частоты аллеля *ADH1B*48His* в группах с различным уровнем и стилем потребления алкоголя всю исследуемую выборку разделили на четыре части. В одну подгруппу вошли потребители суррогатов (30 человек), в другую – индивиды, не потреблявшие алкоголь в течение 1 года или более («абстиненты», 83 человека). Оставшихся разделили пополам – на подгруппу с более высоким уровнем потребления алкоголя (264 человека) и подгруппу с низким уровнем потребления (265 человек). Характеристики подгрупп представлены в *табл. 3*.

Частота носителей аллеля *ADH1B*48His* в «менее пьющей» части выборки составила 13.4%, в «более пьющей» – 8.7%. Эти различия соответствуют предположению о протективной роли аллеля *ADH1B*48His*

Таблица 2. Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *ADH1B*Arg48His* в выборке 642 русских мужчин

Частота генотипов (число индивидов)			Частота аллелей (SD)		c ² (p)
<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/His</i>	<i>His/His</i>	G	A	
0.894 (574)	0.106 (68)	0	0.947 ±0.008	0.053 ±0.008	2.01 (0.157)

Таблица 3. Характеристики групп с различным уровнем и стилем потребления алкоголя

Группа	Число индивидов	Среднее количество потребляемого алкоголя, г этанола/год	Доля носителей <i>ADH1B*48His</i>	Доля лиц с высшим образованием
			% (число индивидов)	
Высокий уровень потребления алкоголя	264	13517	8.7 (23)	22.7 (60)
Низкий уровень потребления алкоголя	265	2162	14.0 (37)	33.6 (89)
Не потребляли в течение года до опроса	83	0	8.4 (7)	9.6 (8)
Потребители суррогатов	30	Не опр.	3.3 (1)	3.3 (1)
ВСЕГО	642	–	10.6 (68)	24.6 (158)
Имели запои в предшествующий год	48	15984	0	18.8 (9)
Не имели запоев в предшествующий год	594	7278	11.4 (68)	25.1 (149)
ВСЕГО	642	–		

в отношении потребления больших количеств алкоголя, однако не достигают статистически значимого уровня ($P = 0.074$ по двустороннему тесту Фишера).

В подгруппе индивидов, указавших, что они не потребляли алкоголь за последний год, частота носителей аллеля *ADH1B*48His* составила 8.4%. Так как все, кроме трех человек из этой группы, сказали, что потребляли алкоголь ранее, можно полагать, что прекращение потребления, по крайней мере у части группы, связано с ухудшением здоровья. В частности, этому предположению соответствует более высокая частота выявления антител к *Treponema pallidum* в этой группе. Они выявлены у 4.8% членов этой группы (4 из 83) против 1.1% (3 из 264 в группе с более низким потреблением алкоголя) и 1.9% (5 из 265 в группе с более высоким уровнем потребления алкоголя). Представляет интерес более детальный анализ причин прекращения потребления алкоголя.

Среди потребителей суррогатов выявлен только один носитель аллеля *ADH1B*48His* (3.3%).

Исследованные группы различались по уровню образования (табл. 3). Наиболее высока была доля лиц с высшим образованием (33.6%) в группе с низким уровнем потребления алкоголя. В группе с высоким потреблением алкоголя 22.7% мужчин имеют высшее образование. Различия статистически значимы ($OR = 1.72$, $P = 0.007$ по двустороннему тесту Фишера). Наличие высшего образования делает менее вероятным попадание индивида в «более пьющую» половину группы.

Среди индивидов, год или более воздерживавшихся от приема алкоголя, доля лиц с высшим образованием составила 9.6%, что ниже, чем в обеих рассмотренных выше подгруппах, и это различие статистически значимо ($P < 0.02$). Учитывая меньшую вероятность того, что мужчины с высшим образованием потребляют большие количества алкоголя, можно предположить, что одной из причин низкой доли лиц с высшим образованием среди прекративших потребление алкоголя может быть его чрезмерное потребление в прошлом. Этому предположению соответствует и более низкая частота аллеля *ADH1B*48His* в этой группе (8.4%), практически совпадающая с частотой в подгруппе с высоким потреблением алкоголя (8.7%).

Среди потребителей суррогатов только один человек из 30 (3.3%) имеет высшее образование.

Среднегодовой уровень потребляемого алкоголя определен нами в различных возрастных группах у носителей различных генотипов. Носители аллеля *ADH1B*48His* (генотип *ADH1B*48Arg/His*) в среднем потребляют на 1749 г (21.8%) меньше этанола в год, чем индивиды, у которых нет этого аллеля (генотип *ADH1B*48Arg/Arg*). При этом по количеству потре-

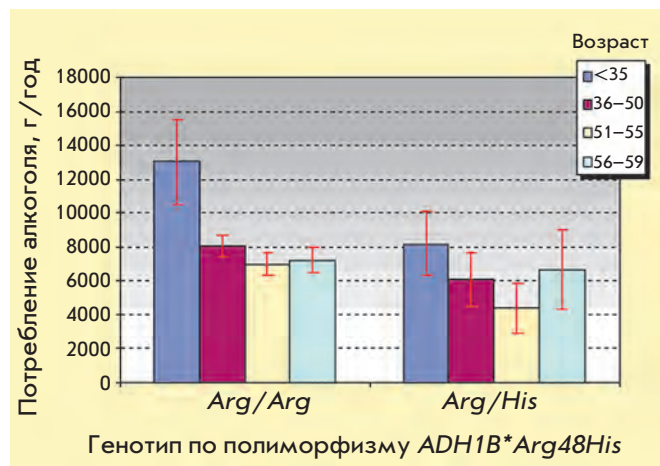


Рис. 2. Среднегодовое потребление алкоголя мужчинами разных возрастных групп, носителей разных генотипов по полиморфизму *ADH1B*Arg48His* (в соответствии с данными табл. 4).

бляемого алкоголя различия между носителями разных генотипов имеются во всех возрастных группах, однако они не достигают статистически значимого уровня (рис. 2). Причиной статистически незначимых различий может быть как случайность эффекта, так и недостаточный размер выборки. Аналогичный эффект – сниженное количество потребляемого алкоголя у носителей аллеля *ADH1B*48His* – выявлен и в других популяциях при анализе групп большей численности (у японцев [10] и в европеоидных группах [17, 18]). Можно предполагать, что при увеличении размера выборки статистическая значимость различий будет достигнута и в популяции русских. Уровень снижения количества алкоголя, потребляемого русскими носителями аллеля *ADH1B*48His*, определенный в нашей работе, близок к данным для других популяций. Так, у белых американцев, носителей аллеля *ADH1B*48His*, количество потребляемого алкоголя снижено на 18% [17]. У белых австралийцев эффект варьировал от примерно 20 до 50% в зависимости от количества потребляемого алкоголя (возрастал при более высоких количествах алкоголя) [18]. Снижение количества потребляемого алкоголя у японских носителей аллеля *ADH1B*48His* зависело от того, на фоне какого генотипа по *ALDH2*Glu504Lys* этот аллель был представлен. На фоне генотипа *504Glu/Glu* (нормальная детоксикация ацетальдегида) протективный эффект выражался в снижении потребления алкоголя на 7.1%, а на фоне генотипа *504Glu/Lys* (детоксикация замедлена) – на 48.1%, в среднем обеспечивая снижение уровня потребления алкоголя на 33.2% [17].

Таблица 4. Результаты регрессионного анализа потребления алкоголя в зависимости от генотипа по гену *ADH1B* и уровня образования

Коэффициенты линейной регрессии	Beta*	SE	B	SE	p
Свободный член			12864	1260	0.0000
Генотип <i>ADH1B</i> (<i>Arg/His</i> против <i>Arg/Arg</i>)	-0.073	0.043	-2113	1255	0.0929
Образование (высшее в сравнении со средним и ниже)	-0.047	0.043	-971	884	0.2722

Примечание. Абстиненты и потребители суррогатов исключены.

*Стандартизированный угол наклона регрессии (в единицах стандартного отклонения).

Таблица 5. Сравнение среднегодового потребления алкоголя у индивидов с различными генотипами и уровнем образования

Потребление этанола, г/год		Снижение потребления алкоголя индивидом, D	Вклад в снижение потребления алкоголя во всей выборке, I*
Генотип по полиморфизму <i>ADH1B*Arg48His</i>			
<i>Arg/Arg</i> (469 человек)	<i>Arg/His</i> (60 человек)	Генотип <i>Arg/His</i> по отношению к <i>Arg/Arg</i>	Для генотипа <i>Arg/His</i>
8041	6292	21.8%	2.5%
Уровень образования			
Среднее и ниже (380 человек)	Высшее (149 человек)	Высшее образование по отношению к более низкому уровню образования	Для высшего образования
8071	7259	10.1%	2.8%

**Примечание.* Абстиненты и потребители суррогатов исключены.

Интересно сравнить «защитные эффекты» носительства аллеля *ADH1B*48His* и высшего образования. Оценка протективного эффекта на основе регрессионного анализа показывает, что вклад аллеля *ADH1B*48His* в снижение потребления алкоголя индивидом в 1.6 раза выше, чем описанное ранее влияние высшего образования (отношение стандартизированных регрессионных коэффициентов Beta, табл. 4).

Среди потреблявших алкоголь (потребители суррогатов исключены) в год, предшествовавший опросу, мужчины с высшим образованием выпили в среднем на 813 г (10.1%) меньше алкоголя (в пересчете на этанол), чем лица без высшего образования. Тогда как «защитное действие» аллеля *ADH1B*48His* проявляется в снижении количества потребляемого индивидом алкоголя в среднем на 1749 г (21.8%) этанола в год (табл. 5). На популяционном уровне влияние обоих факторов на снижение количества алкоголя,

потребляемого русскими мужчинами, соизмеримы по величине. Вклад аллеля *ADH1B*48His* в снижение потребления алкоголя во всей выборке составил 2.5%, а высшего образования – 2.8% (табл. 5). Однако с учетом того, что в изученной выборке эффекты не достигают статистически значимого уровня, необходимо подтвердить предварительные оценки на выборках большего размера.

Влияние генотипа на характер потребления алкоголя оценивали, сравнивая доли индивидов, имеющих запои, и индивидов, потребляющих суррогаты, среди носителей генотипов *ADH1B*48Arg/Arg* и *ADH1B*48Arg/His* (рис. 3). Ни один из 68 носителей генотипа *Arg/His* из группы русских мужчин не имел запоев в год, предшествующий опросу, и лишь один (1.4%) потреблял суррогаты. Среди 574 носителей генотипа *Arg/Arg* доля таких мужчин составила 8.4% (48 человек, различия между носителями разных генотипов статистически значи-

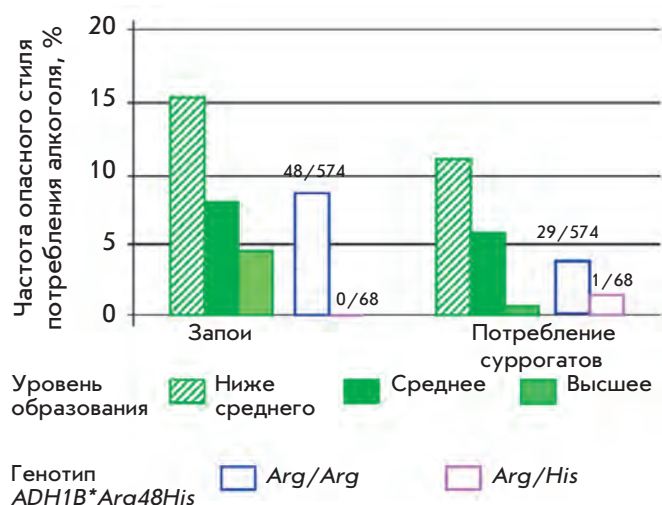


Рис. 3. Частота опасных стилей потребления алкоголя в зависимости от уровня образования и генотипа по полиморфному локусу *ADH1B*Arg48His*

мы по точному критерию Фишера, $OR = 12.62$, 95% $CI = 1.57 - \infty$, $P = 0.006$) и 5.1% (29 человек, различия не достигают уровня статистической значимости, $OR = 3.57$, 95% $CI = 0.57 - 147.75$, $P = 0.355$). Таким образом, в группе русских мужчин носители аллеля *ADH1B*48His* защищены от запоев. Влияние аллеля *ADH1B*48His* на наличие запоев и потребление суррогатов изучено впервые в мире. Для уточнения оценки влияния этого аллеля на риск запоев и потребление суррогатов необходимо использовать выборки большего размера.

Ранее при исследовании группы российских мужчин разной национальности, включавшей и изучаемую выборку, было показано, что среди мужчин

с высшим образованием меньше доля лиц с опасными стилями потребления алкоголя [2, 21, 27]. В группе русских мужчин частота запоев у лиц с высшим образованием составила 5.8%, а со средним и начальным образованием – 8.1%. Более детальный анализ, проведенный на группе большего размера (927 человек, включая как изученную группу, так и мужчин, информация о генотипах которых отсутствует), показывает, что чем выше уровень образования, тем ниже частота запоев, и эти различия статистически значимы (табл. 6). Уровень образования влияет и на потребление суррогатов. Среди лиц без высшего образования доля признавших, что потребляет суррогаты (6.0%), выше, чем в группе с высшим образованием (0.6%) ($OR = 10.0$, $P = 0.004$) (рис. 3).

Сравнение «протективного эффекта» в отношении запоев аллеля *ADH1B*48His* и высшего образования показывает, что «генетическая защита» более действенна на уровне индивида, но суммарно на уровне группы эффект обоих факторов примерно одинаков (табл. 4 и 5).

Нами показано, что носительство аллеля *ADH1B*48His* ассоциировано с пониженным риском возникновения запоев у русских мужчин и снижением количества потребляемого индивидом алкоголя (в пересчете на этанол) на 1749 г (2186 мл) этанола в год. Этот эффект в 2–3 раза ниже эффекта ограничения продажи алкоголя во второй половине 1980-х годов, который привел к снижению потребления алкоголя индивидом на 4–6 л этанола в год [28, 29]. Меры по ограничению продажи алкоголя и ценовой политике затрагивают все население. Выявленный протективный эффект аллеля *ADH1B*48His* затрагивает лишь немногим более 10% русского населения. Однако вклад этого аллеля в общее снижение уровня потребления алкоголя может быть более значительным в этнических группах, где частота этого аллеля

Таблица 6. Сравнение частот встречаемости запоев в год, предшествующий опросу, у потребителей алкоголя с разным уровнем образования

Запой в предшествующий год	Уровень образования (N, %)			Всего
	Неполное среднее	Среднее и среднее специальное	Высшее	
Да	5 12.20	62 9.31	9 4.09	76 8.20
Нет	36 87.80	604 90.69	211 95.91	851 91.80
Всего	41 100.00	666 100.00	220 100.00	927 100.00

Примечание. Сравнение распределений по критерию Пирсона $\chi^2 = 6.894$, $p = 0.032$.

ля выше, чем у русских. Не исключено, что степень влияния аллеля *ADH1B*48His* на снижение уровня потребления алкоголя может несколько изменяться в зависимости от генетического фона, отличающего разные этнические группы Российской Федерации. Поэтому представляет интерес изучение влияния аллеля *ADH1B*48His* на потребление алкоголя у представителей других этнических групп России. ●

Авторы благодарят
проф. Д.А. Леона (Лондонская школа гигиены
и тропической медицины) за предоставленные
материалы и ценные замечания, высказанные
при подготовке статьи.

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-06-00307)
(С.А.Б.) и Программой «Фундаментальные науки
медицине» Президиума РАН (Н.К.Я.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Немцов А.В. Алкогольная смертность в России, 1980–90-е годы. М.: NALEX, 2001. 60 с.
2. Андреев Е.М., Кирьянов Н.А., Леон Д., Макки М., Томкин С., Школьников В.М. // Наркология. 2007. № 8. С. 38–52.
3. Leon D.A., Shkolnikov V.M., McKee M. // *Addiction*. 2009. V. 104. № 10. P. 1630–1636.
4. Zaridze D., Brennan P., Boreham J., Boroda A., Karpov R., Lazarev A., Konobeevskaya I., Igitov V., Terechova T., Boffetta P., Peto R. // *Lancet*. 2009. V. 373. P. 2201–2214.
5. Островский Ю.М., Садовник М.Н. Пути метаболизма этанола и их роль в развитии алкоголизма. Теоретические основы поиска средств для лечения алкоголизма. Итоги науки и техники. Сер. Токсикология. М.: ВИНТИ, 1984. Т. 13. С. 93–150.
6. Haley T.J., Berndt W.O. *Handbook of Toxicology*. USA. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1987. 365 p.
7. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. М.: Медицина, 1994. 255 с.
8. Edenberg H.J. // *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 2000. V. 64. P. 295–341.
9. Jornvall H., Hempel J., Vallee B.L., Bosron W.F., Li T.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 3024–3028.
10. Matsuo K., Wakai K., Hirose K., Ito H., Saito T., Tajima K. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2006. V. 15. № 5. P. 1009–1013.
11. Goedde H.W., Agarwal D.P. // *Alcohol Alcohol. Suppl.* 1987. V. 1. P. 47–54.
12. Hsu L.C., Bendel R.E., Yoshida A. // *Genomics*. 1988. V. 2. P. 57–65.
13. Crabb D.W., Edenberg H.J., Bosron W.F., Li T.K. // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 83. P. 314–316.
14. Gelernter J., Kranzler H.R. // *Hum. Genet.* 2009. V. 126. P. 91–99.
15. Wall T.L., Horn S.M., Johnson M.L., Smith T.L., Carr L.G. // *J. Stud. Alcohol*. 2000. V. 61. P. 13–17.
16. Kim D.J., Choi I.G., Park B.L., Lee B.C., Ham B.J., Yoon S., Bae J.S., Cheong H.S., Shin H.D. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. P. 854–858.
17. Sherva R., Rice J.P., Neuman R.J., Rochberg N., Saccone N.L., Bierut L.J. // *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2009. V. 33. № 5. P. 848–857.
18. Macgregor S., Lind P.A., Bucholz K.K., Hansell N.K., Madden P.A., Richter M.M., Montgomery G.W., Martin N.G., Heath A.C., Whitfield J.B. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. P. 580–593.
19. Li H., Borinskaya S., Yoshimura K., Kal'ina N., Marusin A., Stepanov V.A., Qin Z., Khaliq S., Lee M.Y., Yang Y., et al. // *Ann. Hum. Genet.* 2009. V. 73. P. 335–345.
20. Borinskaya S., Kal'ina N., Marusin A., Faskhutdinova G., Morozova I., Kutuev I., Koshechkin V., Khusnutdinova E., Stepanov V., Puzyrev V., Yankovsky N., Rogaev E. // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. V. 84. № 1. P. 89–92.
21. Leon D.A., Saburova L., Tomkins S., Andreev E., Kiryanov N., McKee M., Shkolnikov V.M. // *Lancet*. 2007. V. 369. № 9578. P. 2001–2009.
22. Tamakoshi A., Hamajima N., Kawase H., Wakai K., Katsuda N., Saito T., Ito H., Hirose K., Takezaki T., Tajima K. // *Alcohol Alcohol*. 2003. V. 38. № 5. P. 407–410.
23. Abramson J.H. // *Epidemiol. Persp. Innov.* 2004. V. 1. P. 6.
24. Информация ВОЗ http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/profiles/rus.pdf
25. Midanik L. // *British J. Addict.* 1988. V. 83. P. 1019–1039.
26. Nemtsov A. // *Addiction*. 2004. V. 99. № 3. P. 386–387.
27. Tomkins S., Saburova L., Kiryanov N., Andreev E., McKee M., Shkolnikov V., Leon D.A. // *Addiction*. 2007. V. 102. P. 544–553.
28. Авербах Л.К., Шамота А.З. // *Вопросы наркологии*. 1992. № 2. С. 32–37.
29. Немцов А.В. // *Социальная и клиническая психиатрия*. 1992. Т. 2. № 4. С. 46–53.

УДК 541.182.642:546.57:612.[647+664].621.039.85

Перенос наночастиц серебра через плаценту и молоко матери в эксперименте на крысах *in vivo*

Е. А. Мельник¹, Ю. П. Бузулуков², В. Ф. Демин², И. В. Гмошинский^{1*}, Н. В. Тышко¹, В. А. Тутельян¹

¹Научно-исследовательский институт питания РАМН, 109240, Москва, Устьинский пр-д, 2/14

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

*E-mail: gmosh@ion.ru

Поступила в редакцию 18.12.2012

РЕФЕРАТ Наночастицы (НЧ) серебра, широко используемые при производстве различных видов потребительской продукции и в медицине, относятся к новым видам материалов, создающих потенциальные риски для здоровья человека. Возможные негативные эффекты воздействия этих НЧ на репродуктивную сферу изучены недостаточно. В эксперименте *in vivo* проведена количественная оценка переноса наночастиц металлического серебра через плаценту и с молоком матери. Использовали НЧ серебра размером 34.9 ± 14.8 нм, стабилизированные низкомолекулярным поливинилпирролидоном, которые метили радиоактивным изотопом ^{110m}Ag путем облучения потока тепловых нейтронов в ядерном реакторе. Препараты [^{110m}Ag]-НЧ вводили внутривенно через зонд беременным (20-й день беременности) или лактирующим (14–16-й дни лактации) самкам крыс в дозе 1.69–2.21 мг/кг массы тела в расчете на серебро. Накопление НЧ в плодах крыс и в крысятках, потреблявших материнское молоко, определяли с помощью низкофонового полупроводникового гамма-спектрометра через 24 и 48 ч после введения метки соответственно. Во всех случаях обнаружено проникновение метки [^{110m}Ag]-НЧ через плаценту и ее поступление в материнское молоко в количестве, в 100–1000 раз превышающем чувствительность использованного аналитического метода. Средний уровень накопления НЧ в плодах составлял 0.085–0.147% от введенной дозы, что было сопоставимо с аккумуляцией метки в печени, крови и мышечном каркасе взрослых животных, и, как минимум, в 10–100 раз превосходил проникновение НЧ через гематоэнцефалический барьер в головной мозг самок. У лактирующих самок суммарное поступление [^{110m}Ag]-НЧ в молоко составляло не менее $1.94 \pm 0.29\%$ от введенной дозы за 48 ч лактации; не менее 25% этого количества всасывалось в пищеварительном тракте крысят. Таким образом, впервые получены экспериментальные доказательства переноса НЧ от матери к потомству через плаценту и с грудным молоком.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА беременность, лактация, наночастицы, радиоактивный индикатор, серебро, фетоплацентарный барьер.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БАД – биологически активная добавка; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; МР – методические рекомендации; МДА – минимальная детектируемая активность; НЧ – наночастицы; НМ – наноматериалы; ПВП – поливинилпирролидон; М – выборочное среднее; *m* – стандартная ошибка среднего.

ВВЕДЕНИЕ

Прогрессивное развитие нанотехнологий и увеличение объемов выпуска и практического применения искусственных наночастиц (НЧ) и наноматериалов (НМ) привели к тому, что в ближайшее время НЧ могут стать значимыми контаминантами окружающей среды. Из числа приоритетных НМ особое внимание привлекают НЧ серебра, широко применяемые в различных видах потребительской продукции (дезинфицирующие средства, текстиль, лакокрасочные изделия, косметика, упаковочные материалы, БАД

к пище) [1, 2], а также имеющие разнообразные биофармацевтические приложения, включая использование в качестве антимикробных [3, 4], противовоспалительных [5] препаратов и средств молекулярной нанодиагностики *in vivo* [6]. Вместе с тем НЧ серебра должны рассматриваться и как определенный источник рисков по причине их возможной токсичности для человека [7–15]. Особенно это относится к рискам, связанным с воздействием НМ на детский организм в результате их возможного переноса через плаценту, а также через грудное молоко [16]. Не ис-

ключена возможность поступления к потомству НМ, присутствующих в рационе матери или используемых ею в составе косметических средств или препаратов бытовой химии [17]. Количественная оценка такого переноса НЧ необходима для определения потенциальных рисков воздействия НЧ серебра, поступающих в организм матери, для потомства и разработки соответствующих защитных мероприятий, включая гигиеническое нормирование в потребительской продукции. Однако возможность переноса НЧ, естественным путем поступающих в организм матери, к ее потомству изучена крайне недостаточно в связи со специфическими методическими трудностями определения НЧ в составе биологических объектов [18, 19]. Анализ методов выявления НЧ в составе биологических образцов, включая электронную и атомно-силовую микроскопию, спектральные методы, хроматографию, использование флуоресцентных, спиновых, стабильно-изотопных и других меток [18], позволил выбрать в качестве оптимального метод радиоактивных индикаторов, являющийся строго количественным, высокочувствительным и допускающим простую и наглядную интерпретацию результатов применительно к НЧ, не подвергающихся биотрансформации и биодegradации в организме – НЧ золота, платины, серебра [20].

В представленной работе проведена количественная оценка транспорта НЧ серебра через плаценту, а также с грудным молоком на модели беременных и кормящих самок крыс с использованием препарата НЧ, меченных радиоактивным изотопом ^{110m}Ag .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн эксперимента

Исследование проведено на беременных и кормящих крысах линии «Вистар», содержащихся в клинике лабораторных животных ФГБУ «НИИ питания» РАМН. В преемственный период и на протяжении всей беременности и лактации самки получали стандартный полусинтетический рацион ФГБУ «НИИ питания» РАМН согласно [21]. Срок беременности самок составлял 20 дней после зачатия, срок лактации – в среднем 10–11 дней после рождения потомства. Беременным крысам ^{110m}Ag -НЧ серебра вводили внутривенно через зонд в дозе 1.69 мг/кг массы тела (три самки) и 2.21 мг/кг массы тела (четыре самки) в виде дисперсии в деионизованной воде, содержащей нетоксичный, неабсорбируемый в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) стабилизатор НЧ – поливинилпирролидон (ПВП) с молекулярной массой 15–30 кДа; после чего крыс помещали в индивидуальные клетки из полистирола. Через 24 ч после введения препарата крыс подвергали

глубокой анестезии диэтиловым эфиром, вскрывали брюшную полость, обескровливали из нижней полой вены и отбирали матку с плодами, печень и головной мозг. Плоды извлекали из матки, тщательно отмывали от околоплодной жидкости. После этого плоды, печень и головной мозг самок помещали во флаконы для гамма-спектрометрии из полиэтилена высокой чистоты. При отборе проб соблюдали меры предосторожности от загрязнения исследуемых органов и плодов крыс НЧ, которые содержатся в других внутренних органах и крови.

В эксперименте на лактирующих крысах пять самок, вскармливающих по 9 крысят каждая, получали внутривенно раствор ^{110m}Ag -НЧ серебра в дозе 2.11 мг/кг массы тела, после чего их возвращали в индивидуальные клетки из полистирола, в которых находилось их потомство. По условию эксперимента исключалась копрофагия экскрементов самок детенышами. Через 48 ч после введения метки крысят, вскармливаемых самкой, подвергали ингаляции диэтиловым эфиром в летальной дозе, тщательно промывали для удаления возможных следов экскрементов самки с шерстяного покрова, удаляли кожу с подкожно-жировой клетчаткой, а тушки помещали во флаконы для гамма-спектрометрии. Тушки четырех крысят вскрывали, выделяли ЖКТ, печень, почки, селезенку и остающийся каркас. Полученные препараты помещали по отдельности во флаконы для гамма-спектрометрии.

Получение меченных ^{110m}Ag наночастиц

В работе использован препарат коллоидного серебра «Арговит» производства фирмы ООО НПЦ «Вектор-Вита» (Россия), который представлял собой водную дисперсию НЧ металлического серебра, содержащую 1.0–1.4% по массе серебра и 18.6–19.0% ПВП. По данным электронной микроскопии (рис. 1), средний диаметр НЧ составлял 34.9 ± 14.8 нм; минимальный размер – 8.4 нм, максимальный – 80.9 нм; форма частиц была близка к сферической. Препарат разводили деионизованной водой в отношении 1 : 11 или 1 : 47 и запаивали в ампулы из высокочистого кварца, которые затем облучали потоком тепловых нейтронов ($0.005 < E_n < 0.4$ эВ) в вертикальном экспериментальном канале ВЭК-9 ядерного реактора ИР-8. После извлечения из реактора ампулы выдерживали в течение 48 ч для уменьшения фона гамма-активности короткоживущего изотопа кремния в материале ампулы, вскрывали, объединяли содержимое, обрабатывали ультразвуком (5 мин, 44 кГц, 40 Вт) для устранения вторичной агрегации НЧ и доводили до фиксированного объема деионизованной водой. Непосредственно перед введением крысам отбирали 0.04 мл дисперсии меченных ^{110m}Ag НЧ, что состав-

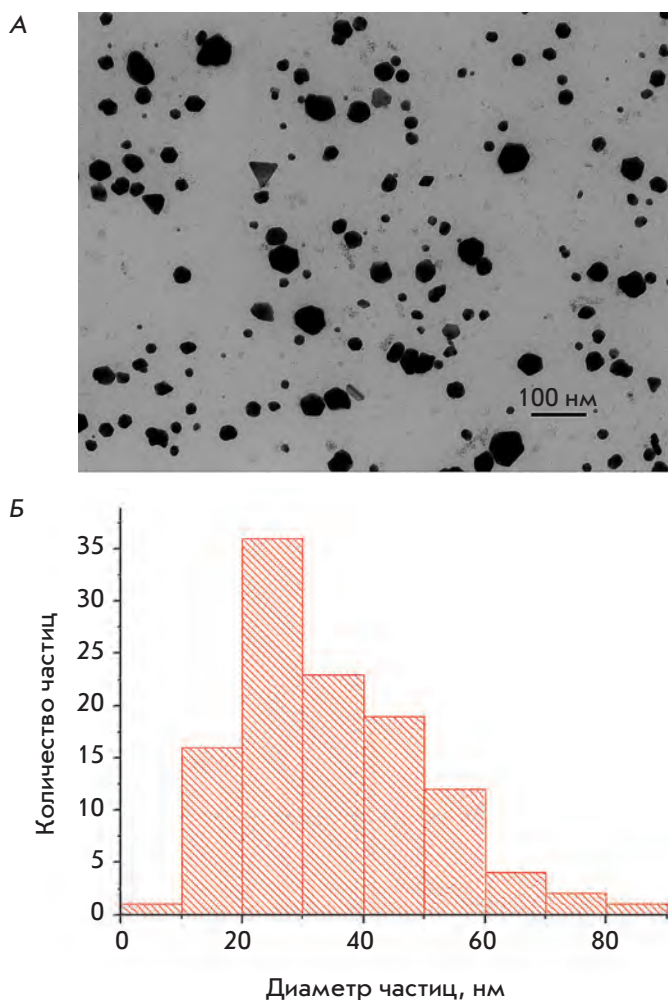


Рис. 1. Электронная микрофотография НЧ серебра в препарате «Арговит» (А) и гистограмма распределения частиц по диаметру (Б). Электронный микроскоп JEM-100CX (Jeol, Япония), ускоряющее напряжение 80 кВ. Исследование проведено в лаборатории иммунобиохимии ИНБИ им. А.Н. Баха РАН

ляло примерно 1% количества, вводимого крысам, переносили во флакон для гамма-спектрометрии и доводили деионизованной водой до объема, приблизительно соответствующего объему биологического образца (плода или тушки крысенка). Полученную пробу использовали в качестве эталона при определении активности биологических образцов.

Анализ образцов

Активность биологических образцов измеряли на гамма-спектрометре производства фирмы Canberra (США) в составе германиевого полупроводникового детектора GC4018, анализатора DSA-1000,

программного обеспечения Genie-2000 – Genie S501, Genie S502. Величины активности, выраженные в единицах импульсов в минуту в одном из выбранных энергетических диапазонов изотопа ^{110m}Ag [22], пересчитывали в относительные количества радиоизотопной метки (μ) в % от введенной дозы по формуле:

$$\mu = \frac{A_n}{A_s} \times (1/K),$$

где A_n – активность биопробы, A_s – активность эталонного образца, содержащего 0.04 см³ дисперсии меченных [^{110m}Ag]-НЧ, K – коэффициент пересчета, представляющий отношение индивидуального количества дисперсии НЧ (см³/кг массы тела), вводимой самкам, к усредненной дозе, полученной делением полного объема введенной дисперсии на суммарную массу тела всех самок в группе.

Концентрацию НЧ серебра в анализируемых пробах, выражаемую в нг/г образца, рассчитывали с учетом индивидуального количества НМ, введенного самке, по следующей формуле:

$$C = \mu \times D \times \left(F / s \right) \times 10^6,$$

где μ – относительное количество радиоактивной метки, % от количества, введенного самке, D – вводимая доза, мг/кг массы тела, F – масса тела самки, кг, s – масса биологического образца, г, 10^6 – коэффициент перехода от мг к нг.

Использование для определения массы ^{110}Ag в биологических образцах метода относительных гамма-спектрометрических измерений позволило исключить из расчетов абсолютную активность (выраженную в Бк) и оперировать первичными данными измерений (имп./с), что позволило устранить ряд ошибок, возникающих при переходе от первичных данных к абсолютной активности. В этой ситуации основная ошибка измерений определяется значениями фона в выбранном энергетическом диапазоне. По этой причине при оценке минимального достоверного уровня скорости счета ^{110m}Ag в образцах использовали понятие минимальной детектируемой активности (МДА) в виде предела количественного определения L_q [23, 24].

Метрологическая характеристика метода

При определении метрологических характеристик использовали понятие МДА в виде предела количественного определения L_q , рассчитываемого по соотношению:

$$L_q = 5.66 \times \sqrt{R_b / T},$$

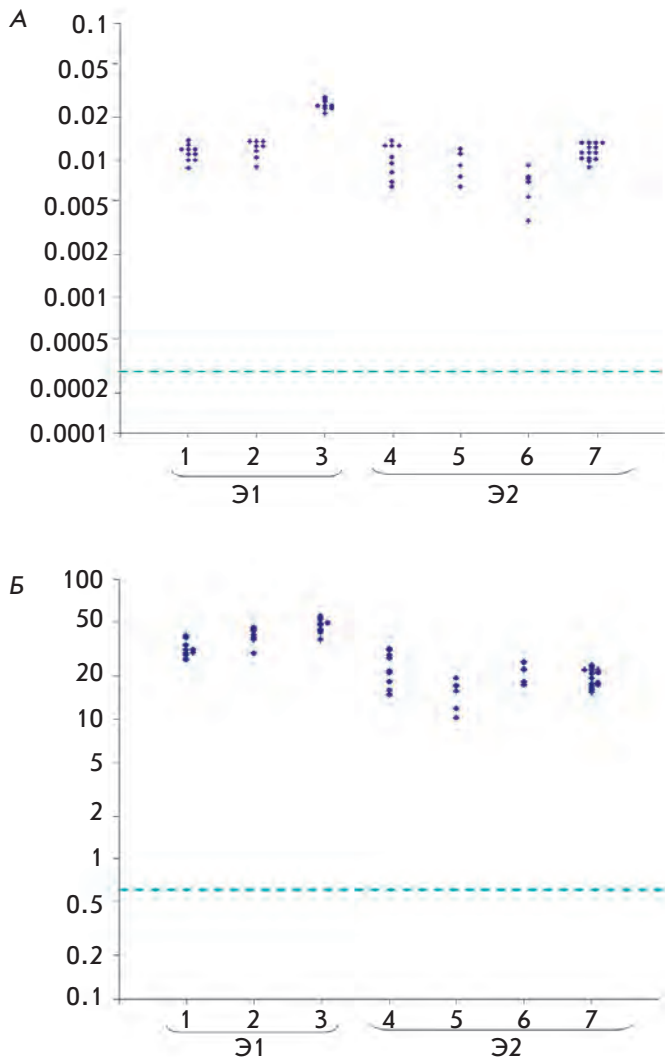


Рис. 2. Содержание (А) и концентрация (Б) $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ серебра в плодах крыс. Ось абсцисс – № беременной самки, № эксперимента; ось ординат – содержание НЧ, % от введенной дозы (А), концентрация НЧ (нг/г образца) (Б). Здесь и на рис. 3 пунктиром показан предел количественного определения $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ в образцах

где R_b – скорость счета фона, составляющая в применяемой гамма-спектрометрической аппаратуре 2.64×10^{-3} имп./с, T – среднее время измерения образца, равное 3600 с, а 5.66 – коэффициент, учитывающий доверительный интервал оценки $p = 0.95$ и относительную статистическую неопределенность $\pm 50\%$. С учетом этого $L_q = 4.8 \times 10^{-3}$ имп./с [23, 24]. Применительно к используемому препарату $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ соответствует минимальному пределу количественного определения 2.6 нг НЧ серебра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 представлены содержание и концентрация НЧ Ag в плодах крыс через 24 ч после внутрижелудочного введения $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ беременным самкам, а в табл. 1 приведены средние ($M \pm m$) значения по каждой беременной самке и по эксперименту в целом, при двух использованных дозах НМ. Как следует из представленных результатов, НЧ серебра были выявлены во всех плодах от всех беременных самок в количествах, значительно превышавших предел определения. Полученные данные свидетельствуют о проникновении НЧ серебра через стенку кишки и плаценту с последующим накоплением в плодах.

Сравнение с данными о всасывании и межорганном распределении $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ, вводившихся внутрижелудочно самкам крыс в сопоставимой дозе (0.81 мг Ag/кг массы тела) [20], показывает (табл. 2), что проникновение НЧ Ag через плаценту более чем в 10 раз превышает накопление в головном мозгу, соответствует уровню в крови и селезенке и существенно ниже накопления в печени. Установленное в настоящем эксперименте содержание НЧ серебра в печени и головном мозгу беременных самок крыс (табл. 2) не отличалось статистически значимо от значений, полученных ранее для взрослых самцов [20] в сопоставимых условиях ($P > 0.05$; t -критерий Стьюдента).

Как следует из данных, представленных на рис. 3 и в табл. 3, в организме всех 45 детенышей в пометах всех пяти лактирующих крыс обнаружены $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ, введенные внутрижелудочно лактирующим самкам. Концентрации этих НЧ значительно (в 100–1000 раз) превосходили предел количественного определения.

По условиям проведения эксперимента такие количества $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ невозможно объяснить заглатыванием детенышами экскрементов самок, содержащих значительные количества НЧ, загрязнением кожных покровов, удаленных перед проведением гамма-спектрометрии, а также заглатыванием подстилки, загрязненной мочой самки, поскольку полная экскреция НЧ серебра с мочой, как следует из данных [20], не превышала за 2 сут 0.032% от введенной дозы препарата, что в 60 раз меньше количества НЧ, суммарно обнаруженного в детенышах.

Как видно из табл. 4, максимальное количество ^{110m}Ag обнаружено в ЖКТ детенышей, однако значимые (намного выше предела количественного определения) уровни наночастиц выявлялись и во внутренних органах, и в каркасе детенышей, что, в свою очередь, указывает на высокий уровень всасывания НЧ в их ЖКТ.

Как следует из табл. 3, общее количество метки $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ, экскретированной с молоком и за-

Таблица 1. Результаты определения [^{110m}Ag]-наночастиц серебра в плодах самок крыс через 24 ч после внутрижелудочного введения препарата

Доза НЧ, мг/кг массы	Самки крысы, №	Число плодов	Общее содержание НЧ в плоде, % от введенной дозы*	Концентрация НЧ в плоде, нг/г образца*	Масса плода, г*
1.69	1	10	0.0114 ± 0.0005	31.7 ± 1.4	2.66 ± 0.04
	2	8	0.0122 ± 0.0006	40.0 ± 1.8	2.13 ± 0.08
	3	9	0.0254 ± 0.0007	46.7 ± 1.8	4.07 ± 0.08
	Среднее (N = 27)		0.0163 ± 0.013	39.1 ± 1.5	2.97 ± 0.16
	Однородность распределения, ANOVA, P		< 0.001	< 0.001	< 0.001
2.21	4	9	0.0104 ± 0.0009	23.7 ± 2.2	3.91 ± 0.08
	5	5	0.0093 ± 0.0011	15.1 ± 1.8	5.72 ± 0.10
	6	6	0.0067 ± 0.0008	22.2 ± 1.4	3.07 ± 0.23
	7	14	0.0116 ± 0.0004	20.1 ± 0.8	5.26 ± 0.10
	Среднее (N = 34)		0.0101 ± 0.0005	20.7 ± 0.8	4.58 ± 0.18
	Однородность распределения, ANOVA, P		< 0.001	0.008	< 0.001

* Средние значения, M ± m.

Таблица 2. Сопоставление накопления НЧ серебра в плодах и во внутренних органах крыс через 24 ч после внутрижелудочного зондового введения [^{110m}Ag]-НЧ

Эксперимент	Доза [^{110m} Ag]-НЧ, мг/кг	Число животных	Биосубстрат	Содержание, % от введенной дозы
Самцы крыс, 2011 г.*	0.81	4	Каркас	0.36 ± 0.17
			Печень	0.60 ± 0.18
			Кровь	0.126 ± 0.051
			Селезенка	0.054 ± 0.020
			Гонады	0.016 ± 0.003
			Почки	0.014 ± 0.002
			Легкие	0.0094 ± 0.0026
			Головной мозг	0.0029 ± 0.0010
			Поджел. железа	0.0079 ± 0.0015
Сердце	0.0042 ± 0.0016			
Беременные самки**	1.69	3	Плоды (в сумме)	0.147 ± 0.041
			Печень	0.559 ± 0.229
			Головной мозг	0.0035 ± 0.0004
	2.21	4	Плоды (в сумме)	0.085 ± 0.028
			Печень	0.324 ± 0.046
		4	Головной мозг	0.0035 ± 0.0006

*Из работы [20]; ** – настоящее исследование.

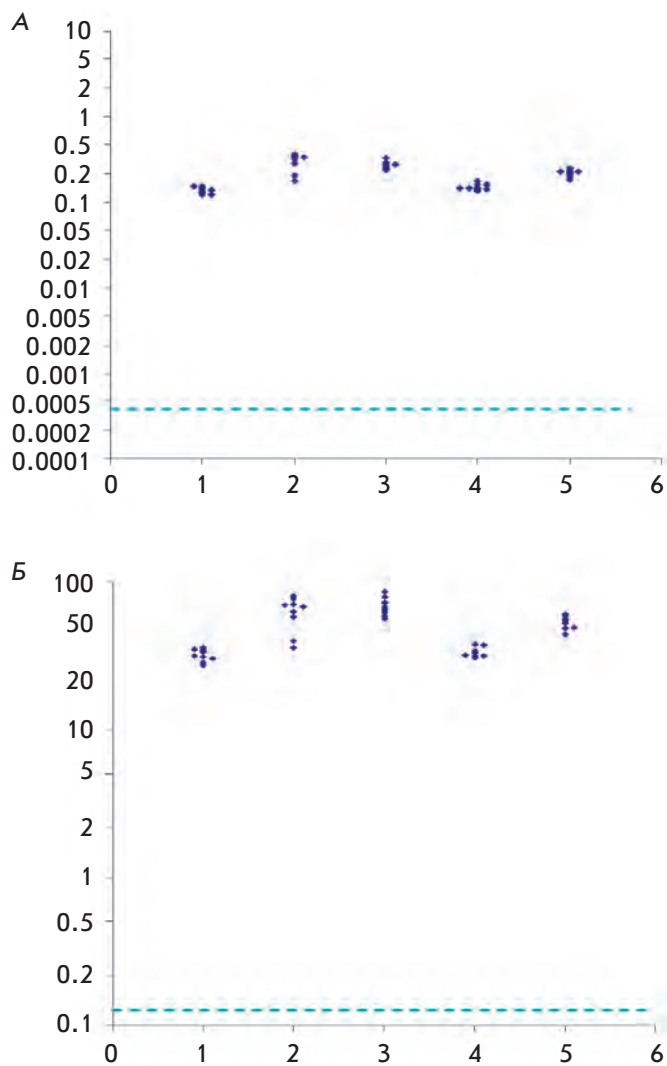


Рис. 3. Содержание (А) и концентрация (Б) $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ серебра в детенышах крыс. Ось абсцисс – № кормящей самки; ось ординат – содержание НЧ, % от введенной дозы (А), концентрация НЧ (нг/г массы тела) (Б). Пунктиром показан предел количественного определения $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ в образцах

регистрированной в крысятах, было сопоставимым (или даже большим) с единовременным суммарным содержанием метки во всех органах и каркасе животного после внутрижелудочного введения данного препарата (приведено в табл. 2 согласно [20]). Таким образом, есть основания полагать, что экскреция НЧ Ag с молоком при лактации – один из основных путей выделения этих наночастиц из организма, который количественно уступает только выведению с калом и намного превосходит выведение с мочой.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, при введении беременным и кормящим самкам крыс НЧ Ag в дозах, равных примерно 2 мг/кг массы тела, концентрация НЧ в органах и тканях их потомства составляет порядка 0.020–0.040 и 0.030–0.070 мкг/г ткани соответственно. Дозы НЧ серебра, вводимые самкам крыс, были достаточно высокими и в пересчете на среднюю массу тела человека (70 кг) составляли ~140 мг. Возможность единовременного экспонирования человека такими количествами НМ может возникнуть при потреблении загрязненной питьевой воды, пищевых продуктов или неправильного применения Ag-содержащих БАД. Полученные данные прямо подтверждают возможность передачи НЧ серебра, поступающих в желудочно-кишечный тракт матери, потомству в период как беременности, так и лактации. Возможность такого транспорта НЧ различных видов неоднократно постулировалась как потенциальный источник рисков, создаваемых ими для развития плода и новорожденного [16, 17], однако прямые экспериментальные подтверждения существования этого процесса немногочисленны. Показано [25], что НЧ серебра размером 14 нм в ограниченных количествах всасываются в желудочно-кишечном тракте взрослых крыс в ходе многократного 28-суточного внутрижелудочного введения и распределяются по органам и тканям, включая почки и печень. Данные о проникновении собственно НЧ серебра через фетоплацентарный барьер и молочную железу отсутствуют, однако имеются результаты, подтверждающие возможность переноса близких по физико-химическим свойствам наночастиц металлического золота размером 12–14 нм [26] после внутривенного введения беременным самкам мышей. Описано проникновение квантовых точек CdSe через фетоплацентарный барьер после парентерального введения самкам мышей [27], показана [28] способность флуоресцирующих НЧ полистирола диаметром 50–100 нм проникать через фетоплацентарный барьер, моделируемый монослоем клеток хориокарциномы человека. Полученные нами данные показывают, что в случае НЧ серебра процесс осуществляется *in vivo* в условиях естественного пути поступления НЧ в организм матери.

Возникает вопрос, насколько значимы концентрации НЧ, выявленные в плодах и детенышах крыс, и могут ли они оказать негативное воздействие на развитие и здоровье потомства? В настоящее время накоплено довольно много данных о биологических эффектах НЧ серебра при различных путях его поступления *in vivo*. Так, коллоидное серебро вводили мышам внутрибрюшинно в очень высоких дозах, вплоть до 1000 мг/кг [12]. В этих заведомо нефизиологических условиях НЧ проникали через

Таблица 3. Определение [^{110m}Ag]-наночастиц серебра во вскармливаемых материнским молоком детенышах крыс через 48 ч после внутрижелудочного введения меченого препарата самкам

Самка, №	Число крысят	Общее содержание НЧ, % от введенной дозы*	Концентрация НЧ, нг/г массы тела*	Масса крысенка, г*
1	9	0.136 ± 0.004	31.9 ± 1.0	28.9 ± 0.4
2	9	0.302 ± 0.022	62.5 ± 5.2	29.2 ± 0.4
3	9	0.272 ± 0.009	68.5 ± 3.2	28.2 ± 0.8
4	9	0.150 ± 0.004	33.3 ± 0.9	31.4 ± 0.7
5	9	0.220 ± 0.007	52.9 ± 1.7	28.5 ± 0.2
Среднее по эксперименту (N = 45)		0.216 ± 0.011	49.8 ± 2.6	29.3 ± 0.3
Однородность распределения ANOVA, P		< 0.001	< 0.001	0.002
Суммарное содержание в помете, % от введенной дозы			1.94 ± 0.29	

Примечание. Доза НЧ – 2.11 мг/кг массы тела самки.
*Средние значения, $M \pm m$.

гематоэнцефалический барьер, вызывая развитие признаков окислительного стресса в различных отделах головного мозга. Показано генотоксическое действие НЧ серебра, введенного внутривентриально в дозе около 1 мг/кг массы тела мышей [13]. Интерпретацию результатов данной работы затрудняло присутствие в препарате НЧ токсичного ПАВ – диоктилсульфосукцината натрия. Установлено наличие ингаляционной токсичности НЧ серебра для крыс [14, 15]. При 28-дневном пероральном введении этого наноматериала в дозе до 30 мг/кг массы тела крысам не наблюдали признаков общетоксического и генотоксического действия, хотя НЧ серебра и накапливались в почках и печени животных [29]. Значительно более высокие дозы наночастиц серебра (вплоть до 1000 мг/кг массы тела), вводимые перорально, приводили к появлению определенных биохимических и гистопатологических сдвигов, что свидетельствовало о токсичности [8, 29].

В связи с токсическими свойствами НЧ серебра важно было оценить вероятность проявления токсичности у потомства животных, подвергающегося экспонированию этим веществом в результате трансплацентарного переноса или с молоком. Определенный интерес представляют данные о цитотоксичности НЧ серебра *in vitro*, полученные в условиях, когда точно известна концентрация НЧ. Так, показано, что НЧ серебра в концентрации 5–50 мкг/см³ повреждают культивируемые гепатоциты линии BRL3A крысы [30]. В опытах на сперматогонимальных клетках крысы цитотоксическое действие НЧ

серебра, идентифицируемое по высвобождению лактатдегидрогеназы и в тетразолиевом митохондриальном тесте, проявлялось, начиная с концентрации 5 мкг/см³ [31]. Наблюдали также стимуляцию апоптоза фибробластов мыши (с использованием теста активности каспазы-3) при концентрации НЧ серебра не менее 3.12 мкг/см³ [32]. НЧ серебра в концентрации не менее 10 мкг/см³ нарушали проводимость для ионов Na⁺ в культуре нейронов гиппокампа линии CA-1 [33]. В опытах на мононуклеарных клетках периферической крови человека [34] показано, что НЧ серебра в концентрации 3 мкг/см³ и более стимулируют продукцию фактора некроза опухоли-α. Начиная с концентрации 15 мкг/см³, отмечалось выраженное цитотоксическое действие НЧ серебра. Согласно [35] НЧ серебра, покрытые ПВП или цитратом, способны влиять на дифференцировку клеток феохромоцитомы PC12, имеющих нейроэндокринную природу. Минимальная действующая концентрация НЧ составляла 3 мкМ по серебру (около 0.3 мкг/см³). Наконец, охарактеризовано действие НЧ серебра различного размера в первичной культуре нейронов коры головного мозга крысы [36]. Показано статистически значимое увеличение гибели клеток, культивируемых в течение 14 дней при минимальной концентрации НЧ размером 20 нм, равной 5 мкг/см³ и более. Токсичность НЧ снижалась при уменьшении их размера, так что НЧ диаметром более 40 нм были цитотоксичными, только начиная с концентрации 10 мкг/см³.

Сравнение приведенных выше данных с результатами нашей работы позволяет утверждать, что кон-

центрации НЧ серебра в плодах крыс (не более 50 нг/г ткани при вводимой дозе НМ около 2 мг/кг массы тела, табл. 1) были в 60–300 раз ниже минимальных действующих концентраций НЧ, выявленных в системах *in vitro*. Однако такая оценка не учитывает возможность неоднородного распределения НЧ по органам и тканям плода. Известно, что НЧ серебра накапливаются преимущественно в почках и печени [20, 25]. Если предположить, что весь наноматериал накапливается только в одном из этих органов, масса которого на данном сроке гестации составляет 6.0 и 0.9% от массы плода, то получим заведомо завышенную концентрацию НЧ в органах – 830 и 5000 нг/г в печени и почках соответственно. Последняя величина сопоставима с определенной *in vitro* нижней границей возможного цитотоксического действия, равной приблизительно 3000–5000 нг/г. При этом следует учитывать, что вводимая беременным самкам крыс доза наноматериала, составлявшая ≈2 мг/кг массы тела, была аgravирована в 2000 раз по сравнению с верхним допустимым уровнем потребления серебра в любой форме (как в виде коллоидных частиц, так и ионов), равной 70 мкг или около 1 мкг/кг массы тела человека. Отсюда можно сделать вывод, что уровень накопления НЧ серебра в органах плодов крыс может с определенными оговорками рассматриваться как безопасный в случае поступления наночастиц серебра внутрь в физиологических количествах (например, вместе с питьевой водой или БАД к пище).

У крысят, получающих молочное вскармливание, средний уровень меченых НЧ составил 50 нг/г. Эта величина на 75% обусловлена меткой, находящейся в ЖКТ. Содержание НЧ в печени составляет 17.9%, а в почках – 0.9% от общего количества, обнаруженного в крысенке. Масса органов при данном сроке развития равна в среднем 3.8 и 1.2% массы тела, откуда следует, что концентрация НЧ в них составляет около 235 и 38 нг/г соответственно. Эти величины значительно ниже предполагаемого уровня цитотоксического воздействия и свидетельствуют о безопасности приема НЧ лактирующими самками в вышеуказанной заведомо аgravированной дозе для развития потомства.

Таким образом, на основании опубликованных данных можно сделать вывод, что уровни НЧ в тканях плодов и крысят, выявленные при однократном введении НЧ самкам крыс, не могут рассматриваться как опасные. В то же время необходимо учитывать, во-первых, возможность накопления НЧ в организме при их многократном поступлении, следовательно, уровень НЧ в органах и тканях будет выше, чем при однократной внутрижелудочной экспозиции, а во-вторых, неполное соответствие условий экспери-

Таблица 4. Межорганное распределение [^{110m}Ag]-наночастиц серебра в организме крысят (N = 4) через 48 ч после внутрижелудочного введения меченого препарата самкам

Органы и ткани	Общее содержание наночастиц в крысенке, $M \pm m$	
	% от обнаруженного количества	% от дозы, скормленной самке
ЖКТ	73.8 ± 4.4	0.106 ± 0.006
Каркас	7.4 ± 1.4	0.0125 ± 0.0011
Печень	17.9 ± 3.0	0.0287 ± 0.0033
Почки	0.90 ± 0.18	0.0014 ± 0.0003

ментов *in vitro* и в организме. В частности, длительность экспозиции НЧ в клеточных культурах составляет часы, реже – до 7–14 дней, тогда как *in vivo* их воздействие может продолжаться в течение всей жизни. Поэтому изучение репродуктивной токсичности должно быть рекомендовано при комплексной оценке безопасности новых видов НЧ и НМ. Перенос НЧ через плаценту и грудное молоко следует учитывать при разработке процедур, направленных на максимальное ограничение контакта организма женщины с НЧ и НМ в период беременности и лактации.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что при введении меченых изотопов ^{110m}Ag НЧ серебра в желудочно-кишечный тракт беременных и лактирующих самок крыс в дозе около 2 мг/кг массы тела, [^{110m}Ag]-НЧ проникает через плаценту и поступает в материнское молоко в количествах, в 100–1000 раз превышающих чувствительность использованного аналитического метода.
2. Средний уровень накопления НЧ в плодах составлял 0.085–0.147% от введенной дозы, что было сопоставимо с аккумуляцией в печени самок (0.3–0.5% от введенной дозы), и, как минимум, в 10–100 раз превосходил проникновение НЧ через гематоэнцефалический барьер в головной мозг самок (3.5×10^{-3} %).
3. У лактирующих самок суммарное поступление [^{110m}Ag]-НЧ в молоко составляло не менее $1.94 \pm 0.29\%$ от введенной дозы за 48 ч лактации; не менее 25% этого количества всасывалось в пищеварительном тракте крысят.
4. При введении НЧ серебра самкам крыс в дозе, аgravированной в 2000 раз по сравнению с адекват-

ным уровнем потребления этого микроэлемента, максимальные уровни этих НЧ выявлены в почках плодов, где они не были существенно больше токсических концентраций, установленных в опытах *in vitro*; в остальных случаях уровни НЧ были намного меньше действующих концентраций. Однако, учитывая возможные эффекты накопления НЧ в органах и тканях потомства при их длительном поступлении в материнский организм, рекомендуется изучение

репродуктивной токсичности НЧ при комплексной оценке их безопасности.

Таким образом, впервые получены экспериментальные доказательства переноса НЧ серебра от матери к потомству через плаценту и с грудным молоком. ●

Авторы выражают искреннюю благодарность С.А. Хотимченко за полезное обсуждение результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Верников В.М., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. // *Вопр. питания.* 2009. Т. 78. № 6. С. 13–20.
- Blaser S.A., Scheringer M., Macleod M., Hungerbühler K. // *Sci. Total Environ.* 2008. V. 390. № 2–3. P. 396–409.
- Fayaz M.A., Ao Z., Girilal M., Chen L., Xiao X., Kalachelvan P.T., Yao X. // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 5007–5018.
- Acosta-Torres L.S., Mendieta I., Nuñez-Anita R.E., Cajero-Juárez M., Castaño V.M. // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 4777–4786.
- Bhol K.C., Schechter P.J. // *Dig. Dis. Sci.* 2007. V. 52. № 10. P. 2732–2742.
- Chrastina A., Schnitzer J.E. // *Int. J. Nanomedicine.* 2010. V. 5. P. 653–659.
- Шумакова А.А., Смирнова В.В., Тананова О.Н., Трушина Э.Н., Кравченко Л.В., Аксенов И.В., Селифанов А.В., Сото Х.С., Кузнецова Г.Г., Булахов А.В. и др. // *Вопр. питания.* 2011. Т. 80. № 6. С. 9–18.
- Kim Y.S., Song M.Y., Park J.D., Song K.S., Ryu H.R., Chung Y.H., Chang H.K., Lee J.H., Oh K.H., Kelman B.J., et al. // *Part Fibre Toxicol.* 2010. V. 7. № 1. P. 20.
- Wijnhoven S.W.P., Peijnenburg W.J.G.M., Herberths C.A., Hagens W.I., Oomen A.G., Heugens E.H.W., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., Van De Meent D., et al. // *Nanotoxicology.* 2009. V. 3. № 2. P. 109–138.
- Онищенко Г.Г., Арчаков А.И., Бессонов В.В., Бокитько Б.Г., Гинцбург А.Л., Гмошинский И.В., Григорьев А.И., Измеров Н.Ф., Кирпичников М.П., Народицкий Б.С. и др. // *Гигиена и санитария.* 2007. № 6. С. 3–10.
- Онищенко Г.Г., Тутельян В.А. // *Вопр. питания.* 2007. Т. 76. № 6. С. 4–8.
- Rahman M.F., Wang J., Patterson T.A., Sainia U.T., Robinson B.L., Newporta G.D., Murdock R.C., Schlager J.J., Hussain S.M., Alia S.F. // *Toxicol. Lett.* 2009. V. 187. № 1. P. 15–21.
- Орджоникидзе К.Г., Рамайя Л.К., Егорова Е.М., Рубанович А.В. // *Acta Naturae.* 2009. T. 1. № 3. С. 99–101.
- Sung J.H., Ji J.H., Yoon J.U., Kim D.S., Song M.Y., Jeong J., Han B.S., Han J.H., Chung Y.H., Kim J. // *Inhal. Toxicol.* 2008. V. 20. № 6. P. 567–574.
- Jung J.H., Kim S.S., Yoon J.U., Park J.D., Choi B.S., Chung Y.H., Kwon I.H., Jeong J., Han B.S. // *Inhal. Toxicol.* 2007. V. 19. № 10. P. 857–871.
- Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., et al. // *Part. Fibre Toxicol.* 2005. V. 2. № 1. P. 8–43.
- Yokel R.A., MacPhail R.C. // *J. Occupational Med. Toxicol.* 2011. V. 6. № 7. P. 1–27.
- Распопов Р.В., Гмошинский И.В., Попов К.И., Красноярова О.В., Хотимченко С.А. // *Вопр. питания.* 2012. Т. 81. № 2. С. 10–17.
- Tiede K., Vohall A.B., Tear S.P., Lewis J., David H., Hasselov M. // *Food Add. Contam.* 2008. V. 25. № 7. P. 795–821.
- Бузулуков Ю.П., Гмошинский И.В., Распопов Р.В., Демин В.Ф., Соловьев В.Ю., Кузьмин П.Г., Шафеев Г.А., Хотимченко С.А. // *Мед. радиология и радиационная безопасность.* 2012. Т. 57. № 3. С. 5–12.
- Тышко Н.В., Жминченко В.М., Пашорина В.А., Селяскин К.Е., Мельник Е.А., Мустафина О.К., Сото С.Х., Трушина Э.Н., Гаппаров М.М.Г. // *Вопр. питания.* 2011. Т. 80. № 5. С. 30–38.
- База ядерных данных МАГАТЭ: www.iaea.org/Our Work/Nuclear Data Service.
- Исаев А.Г., Бабенко В.В., Казимиров А.С., Гришин С.И., Иевлев С.М. // *Пробл. безпеки атомних електростанцій І Чорнобиля.* Киев: НПП «АтомКомплексПрибор», 2010. № 13. С. 103–110.
- Lochamy J.C. The Minimum Detectable Activity Concept. EG&G ORTEC Systems Application Studies, PSD № 17, September 1981.
- Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larse A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam H.R., Larsen E.H. // *Part. Fibre Toxicol.* 2011. V. 8. P. 1–18.
- Yang H., Sun C., Fan Z., Tian X., Yan L., Du L., Liu Y., Chen C., Liang X., Anderson G.J., et al. // *Sci. Repts.* 2012. V. 2. № 11. P. 847–855.
- Chu M., Wu Q., Yang H., Yuan R., Hou S., Yang Y., Zou Y., Xu S., Xu K., Ji A., et al. // *Small.* 2010. V. 6. № 5. P. 670–678.
- Cartwright L., Poulsen M.S., Nielsen H.M., Pojana G., Knudsen L.E., Saunders M., Rytting E. // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 497–510.
- Kim Y.S., Kim J.S., Cho H.S., Rha D.S., Kim J.M., Park J.D., Choi B.S., Lim R., Chang H.K., Chung Y.H., et al. // *Inhal. Toxicol.* 2008. V. 20. № 6. P. 575–583.
- Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. // *Toxicol. in vitro.* 2005. V. 19. № 7. P. 975–983
- Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., Hofmann M.C. // *Toxicol. Sci.* 2005. V. 88. № 2. P. 412–419.
- Arora S., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009. V. 236. № 3. P. 310–318.
- Liu Z., Ren G., Zhang T., Yang Z. // *Toxicology.* 2009. V. 264. № 3. P. 179–184.
- Shin S.H., Ye M.K., Kim H.S., Kang H.S. // *Int. Immunopharmacol.* 2007. V. 7. № 13. P. 1813–1818.
- Powers C.M., Badireddy A.R., Ryde I.T., Seidler F.J., Slotkin T.A. // *Environ. Health Perspect.* 2011. V. 119. № 1. P. 37–44.
- Haase A., Rott S., Manton A., Graf P., Plendl J., Thünemann A.F., Meier W.P., Taubert A., Luch A., Reiser G. // *Toxicol. Sci.* 2012. V. 126. № 2. P. 457–468.

УДК 579.65

Метагеномный анализ динамики изменений состава микробиома кишечника участников эксперимента «МАРС-500», имитирующего длительный космический полет

А. В. Марданов¹, М. М. Бабыкин², А. В. Белецкий¹, А. И. Григорьев³, В. В. Зинченко², В. В. Кадников¹, М. П. Кирпичников², А. М. Мазур^{1,2}, А. В. Недолужко¹, Н. Д. Новикова³, Е. Б. Прохорчук^{1,2}, Н. В. Равин^{1,2}, К. Г. Скрябин^{1,2}, С. В. Шестаков^{2*}

¹Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

²Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76А

*E-mail: shestakovgen@mail.ru

Поступила в редакцию 26.12.2012

РЕФЕРАТ Проведен метагеномный анализ динамики изменений состава микробиоты кишечника пяти участников эксперимента «МАРС-500». Анализировали препараты ДНК из проб фекалий, взятых до начала эксперимента, через 14, 30, 210, 363, 510 дней пребывания испытателей в изолированном модуле и через 2 недели после выхода из него. Таксономический состав микробиоты определяли по результатам пиросеквенирования амплифицированных фрагментов генов 16S рибосомной РНК. У одного участника с помощью полногеномного секвенирования по технологии SOLiD определяли таксономический и функциональный состав микробиоты. Каждый участник имел индивидуальный состав микробиоты, относящийся к одному из трех энтеротипов. Для двух участников характерен энтеротип I с преобладанием *Bacteroides*, у двух других выявлен энтеротип II с доминированием *Prevotella*. У одного участника состав микробиоты относится к смешанному типу. Установлено, что (1) в ходе эксперимента таксономический состав микробиоты каждого из участников изменялся, но без смены энтеротипа; (2) изменения в соотношении различных таксонов наблюдались через 14–30 дней, что могло быть следствием влияния стрессовых факторов уже на первом этапе эксперимента; (3) через 2 недели после выхода из модуля отмечена тенденция к восстановлению исходного состава микробиоты, однако полного восстановления не происходило. Метагеномный анализ микробиоты одного из участников показал, что, несмотря на изменения в таксономическом составе, сохранялось постоянство генного состава по большинству функциональных категорий. Предполагается, что в экосистеме кишечника каждого из участников происходила адаптивная перестройка таксономического состава микробиоты, отражающая индивидуальный ответ на воздействия условий эксперимента. При этом формировался новый сбалансированный таксономический состав микробиоты с функциональной компенсацией на уровне поддержания устойчивого генного состава в целостном сообществе без негативных последствий для состояния здоровья участников эксперимента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метагеномика, микробиота кишечника, стрессовые воздействия, энтеротипы.

ВВЕДЕНИЕ

Метагеномные исследования микробиома человека, проводимые в рамках масштабных международных научных программ [1–3], направлены на выяснение роли микроорганизмов в жизнедеятельности человека, на разработку методов диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний. Таксо-

номический и генный состав микробиоты, обитающей в кишечнике, является одним из критериев оценки здоровья человека [4–6]. В экосистеме кишечника доминируют представители пяти филумов бактерий, составляющих более 95% микробиоты, но соотношение таксонов на родовом и видовом уровне индивидуально для каждого человека [2, 7, 8], что обусловлено

генетическими особенностями индивидов, доминирующим типом питания и спецификой взаимодействия микробов в целостной экосистеме. Вместе с тем каждому «здоровому» индивиду свойствен собственный сбалансированный и постоянный состав метабенома [8–10], который может существенно изменяться при заболеваниях [5, 7, 11, 12], действии лекарственных средств [7, 13, 14]. Выявлена взаимосвязь между состоянием резидентной микробиоты и типом питания [15–17], психофизиологическими, нейрогуморальными факторами [18–20]. Стрессовые физические и эмоциональные перегрузки влияют на состав микробиоты. Отклонения от привычного образа жизни (например, длительные поездки) могут приводить к дисбалансу в соотношении различных таксонов в микробиоте [11] и нередко сопровождаются болезненными симптомами (диарея, запоры и т.д.). Условия космических полетов могут оказывать на космонавтов как физическое, так и психологическое стрессовое воздействие [21, 22], влияя на функционирование микробиоты кишечника [23–25].

В Институте медико-биологических проблем РАН проведен эксперимент «МАРС-500», имитирующий некоторые условия длительного межпланетного полета. Испытатели находились 510 дней в изолированном модуле в целях изучения возможного влияния условий «космического полета» на физиологическое и психическое состояние испытателей. В качестве одного из медико-биологических тестов был исследован состав микробиоты кишечника пяти испытателей, у которых в ходе эксперимента «МАРС-500» периодически брали пробы фекалий. Выделенные из них препараты ДНК использовали для секвенирования с последующим определением таксономического и генного состава микробиоты.

В результате исследования установлено, что длительное пребывание в замкнутом модуле привело к изменениям в составе микробиоты. Динамика изменений была индивидуальной для каждого из участников. По-видимому, происходила адаптивная перестройка экосистемы кишечника, отражавшая индивидуальный ответ участников на влияние условий эксперимента (психоэмоциональный стресс, смена типа питания, прием пробиотиков и т.п.). Эти воздействия не оказали заметного негативного влияния на здоровье испытателей, о чем свидетельствуют итоги медико-биологического мониторинга состояния каждого из участников [26, 27].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Отбор образцов для метагеномного анализа

Среди участников эксперимента «МАРС-500» были представители четырех стран (России, Италии,

Франции, КНР) в возрасте от 28 до 38 лет, отобранные для включения в экипаж с учетом позитивных данных медицинского и психологического тестирования. В ходе эксперимента отбирали пробы фекалий в нулевой точке (непосредственно перед заходом в замкнутый модуль), через 14, 30, 210, 363, 510 дней пребывания в модуле и через 2 недели после выхода из модуля (524 дня). Пробы фекалий хранили при -80°C ; препараты ДНК выделяли с помощью наборов QIAamp DNA stool Mini Kit (Qiagen, Германия), широко используемых для анализа микробиоты в фекалиях. Качество препаратов ДНК проверяли методом электрофореза в агарозном геле. Отметим, что использованный метод выделения ДНК может приводить к занижению доли актинобактерий и завышению доли Bacteroidetes [28], однако сравнительный метагеномный анализ на разных этапах эксперимента правомерен, поскольку одинаковую методику применяли для всех проб.

Аmplификация и пиросеквенирование фрагментов генов 16S рибосомной РНК

Для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК, включающего вариабельные участки V3–V5, использовали бар-кодированные «универсальные» праймеры PRK341F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG) и PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATСТААТ). ПЦР проводили в объеме 50 мкл, содержащем 2.5 ед. GoTaq-ДНК-полимеразы (Promega), 0.2 мМ MgCl_2 , по 0.1 мкМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, по 1 мкМ каждого праймера и 0.1 мкг метагеномной ДНК. Реакцию проводили на амплификаторе Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Германия) по следующей программе: начальная денатурация в течение 2 мин при 96°C , затем 30 циклов ($96^{\circ}\text{C} - 40\text{ с}$, $58^{\circ}\text{C} - 40\text{ с}$, $72^{\circ}\text{C} - 1\text{ мин}$), последняя элонгация в течение 10 мин при 72°C . ПЦР-фрагменты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле. Образцы для пиросеквенирования подготавливали по стандартной методике (исключая стадию фрагментации ДНК), используя набор реагентов GS Rapid Library Prep Kit. Для эмульсионной ПЦР использовали набор реактивов GS Titanium LV emPCR Kit (Lib-L) v2, пиросеквенирование на GS FLX (Roche) проводили по протоколу Titanium с использованием GS Titanium Sequencing Kit XLR70. Для дальнейшего анализа отбирали чтения длиной более 350 нуклеотидов. Таким образом, было получено 549668 независимых последовательностей фрагментов генов 16S рРНК, которые выравнивали и фильтровали с помощью пакета программ Mothur [29], версия 1.23.1. Химерные последовательности удаляли с помощью Chimera.uchime [30], входящей в состав пакета Mothur. Не прошедшие фильтрацию чтения составляли в разных образцах

до 10% от общего числа. Таксономическую классификацию прошедших фильтрацию чтений проводили с использованием метода Wang et al. [31], реализованного в программе RDP Classifier. Анализ результатов повторного секвенирования четырех препаратов ДНК, взятых у участников № 1 и № 5 на разных этапах эксперимента, показал, что различия между параллельными пробами (по критерию соотношения долей основных таксонов) составляли не более 3% от всего микробного сообщества. Это свидетельствует о методической корректности результатов, представленных на диаграммах.

Секвенирование метабеномов по технологии SOLiD
Библиотеки фрагментов из образцов метабеномной ДНК готовили по стандартной методике, используя набор реагентов SOLiD Fragment Library Construction Kit. Размеры библиотек измеряли, ис-

пользуя Agilent BioAnalyzer DNA1000 kit. Длина фрагментов варьировала от 183 до 254 п.н. Эмульсионную ПЦР проводили по стандартным протоколам, рекомендованным компанией Applied Biosystems, используя EZ Bead System. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК проводили чтениями по 50 п.н. на секвенаторе SOLiD 4.0 (Applied Biosystems). Объем секвенирования после фильтрации по качеству чтения составлял от 1.8 до 3.4 млрд н. на образец. После фильтрации чтения собирали в контиги с помощью параллельной версии Abyss 1.2.5 [32]. Поиск генов в контигах и их функциональную и таксономическую классификацию проводили на сервере MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>) для автоматической аннотации и анализа метабеномных данных. Эта программа предсказывает гены в контигах на основе FragGeneScan [33], а затем проводит поиск их гомологов с помощью BLAT [34] в соб-

Таблица 1. Энтеротипы микробиот участников в начальной точке эксперимента

Таксономическая принадлежность	Участник, №				
	1	2	3	4	5
Firmicutes					
Lachnospiraceae	8.63	12.33	7.59	19.11	15.07
Negativicutes	2.33	4.88	10.35	2.75	7.18
Ruminococcaceae	3.06	19.99	13.66	20.41	5.45
Другие	0.60	2.98	3.47	5.60	1.31
Bacteroidetes					
Prevotellaceae	75.25	< 0.01	35.78	9.63	0.03
Rikenellaceae	0.56	1.62	2.77	1.82	1.72
Porphyromonadaceae	0.58	1.23	2.87	5.34	1.31
Bacteroidaceae	2.57	53.36	17.16	28.92	63.82
Другие	0.96	0.26	4.62	5.60	0.83
Минорные группы					
Proteobacteria	5.09	0.72	1.14	0.15	2.50
Actinobacteria	0.08	0.07	0.02	< 0.01	0.04
Fusobacteriaceae	< 0.01	2.06	< 0.01	< 0.01	0.37
Verrucomicrobia	< 0.01	< 0.01	0.31	0.07	< 0.01
Другие микроорганизмы	0.28	0.5	0.27	0.61	0.36
Итого					
Число чтений до фильтрации	5450	4883	6253	4929	7882
Число чтений после фильтрации	5321	4567	5886	4610	7545
Энтеротип	II	I	II	III	I

Примечание. Показаны доли (%) просеквенированных последовательностей 16S рРНК, отнесенных к соответствующим таксономическим группам.

ственной базе данных M5NR, которая интегрирует несколько баз данных – GenBank, KEGG, COG, The SEED [35], UniProt [36]. При таксономической классификации каждый ген относили к семейству наиболее близкого гомолога из GenBank. Генам, имеющим совпадения в базе KEGG, были присвоены несколько категорий KEGG, соответствующих разным уровням иерархии.

Поскольку при функциональной и таксономической классификации MG-RAST не учитывается кратность прочтения генов, результаты анализа корректировали с учетом покрытия. Нуклеотидное покрытие предсказанных генов определяли в результате наложения индивидуальных чтений на собранные контиги с использованием программы Bowtie [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономический состав микробиома кишечника на основе результатов пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК

В микробиоте кишечника участников эксперимента «МАРС-500» методами метагеномики с использованием в качестве маркера 16S рРНК выявлено более 40 родов бактерий, большинство из которых относятся к четырем филумам: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria и Actinobacteria, что соответствует сведениям о составе кишечной микробиоты здоровых взрослых [38, 39]. Выявлены также представители некоторых других филумов, включая Fusobacteria, Verrucomicrobia и Synergistia. У двух участников обнаружены метаногенные археи рода *Methanobrevibacter*.

Сравнительный таксономический анализ микробиоты в пробах фекалий у пяти участников в начальной точке эксперимента (перед входом в закрытый модуль) выявил существенные индивидуальные различия между участниками по составу микробиоты. Полученные результаты (табл. 1) позволили определить принадлежность микробиоты к определенным энтеротипам согласно предложенной в 2011 году классификации [40, 41]. Энтеротипами обозначают специфические кластеры микробов с доминированием определенного таксона. Эти кластеры контролируют трофические связи в микробном сообществе и его взаимодействие с хозяином, имеющим индивидуальные генотипические характеристики.

Участники № 1 и № 3 обладают энтеротипом II, в котором доминирует *Prevotella* в сочетании с фирмикутами *Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Blautia*. В кишечной микробиоте участника № 3 обнаружены минорные группы *Akkermansia* (*Verrucomicrobia*)

и β-протеобактерий, тогда как участнику № 1 свойственна высокая доля γ-протеобактерий.

Микробиота участников № 2 и № 5 относится к энтеротипу I с преобладанием *Bacteroides* в кластере с *Parabacteroides*, *Faecalibacterium* и некоторыми группами Ruminococcaceae, Lachnospiraceae. У этих участников обнаружены также *Fusobacteria*. Особенностью состава микробиоты участника № 5 является относительно высокое содержание β-протеобактерий, а также преобладание рода *Phascolarctobacterium* среди Negativicutes, тогда как у участника № 2 доминирует род *Dialister*.

Иная картина таксономического состава микробного сообщества выявлена у участника № 4. В исходной точке эксперимента нет выраженного доминирования филогрупп, определяющих энтеротипы I и II, но высока доля Ruminococcaceae (включая неклассифицированные филотипы), Lachnospiraceae, а также Paraprevotella. Среди Negativicutes доминирует род *Dialister*, как и у участника № 2. Для микробиоты участника № 4 характерно наличие археи *Methanobrevibacter*. Таким образом, микробное сообщество кишечника этого участника отличается и может быть отнесено к смешанному типу, близкому к энтеротипу III [41]. Такой смешанный состав можно рассматривать скорее в ракурсе представлений о градиенте состава микробиома, чем концепции дискретных энтеротипов [42, 43].

Результаты метагеномного исследования показали, что длительное пребывание в закрытом модуле оказало влияние на таксономический состав микробиоты каждого из участников (рис. 1). Динамика изменений имела индивидуальный характер, что отражало различия в исходном составе микробных сообществ и разную реакцию участников на действие условий/факторов эксперимента. Как видно из рис. 1А–Г, не наблюдалось единого для всех участников однонаправленного тренда в изменениях состава микробиоты от начала до завершения эксперимента. Вариабельность изменений, по-видимому, можно связать с различиями в условиях эксперимента на разных его этапах. Это касается приема пробиотика *Enterococcus faecium* (в виде таблеток в первые 180 дней) и препаратов Эубикор и Витафлор в последние месяцы, смены диеты, выполнения некоторыми из членов экипажа специальных работ, связанных с выходом из основного модуля на условную поверхность Марса (после 210 дней, но до отбора проб через 363 дня). Все участники принимали одинаковые пробиотики и пребиотики в течение одного периода. Из модуля на условную поверхность Марса выходили в скафандрах участники № 2, № 3, № 5.

Об индивидуальном характере ответа каждого из участников свидетельствуют данные по динамике

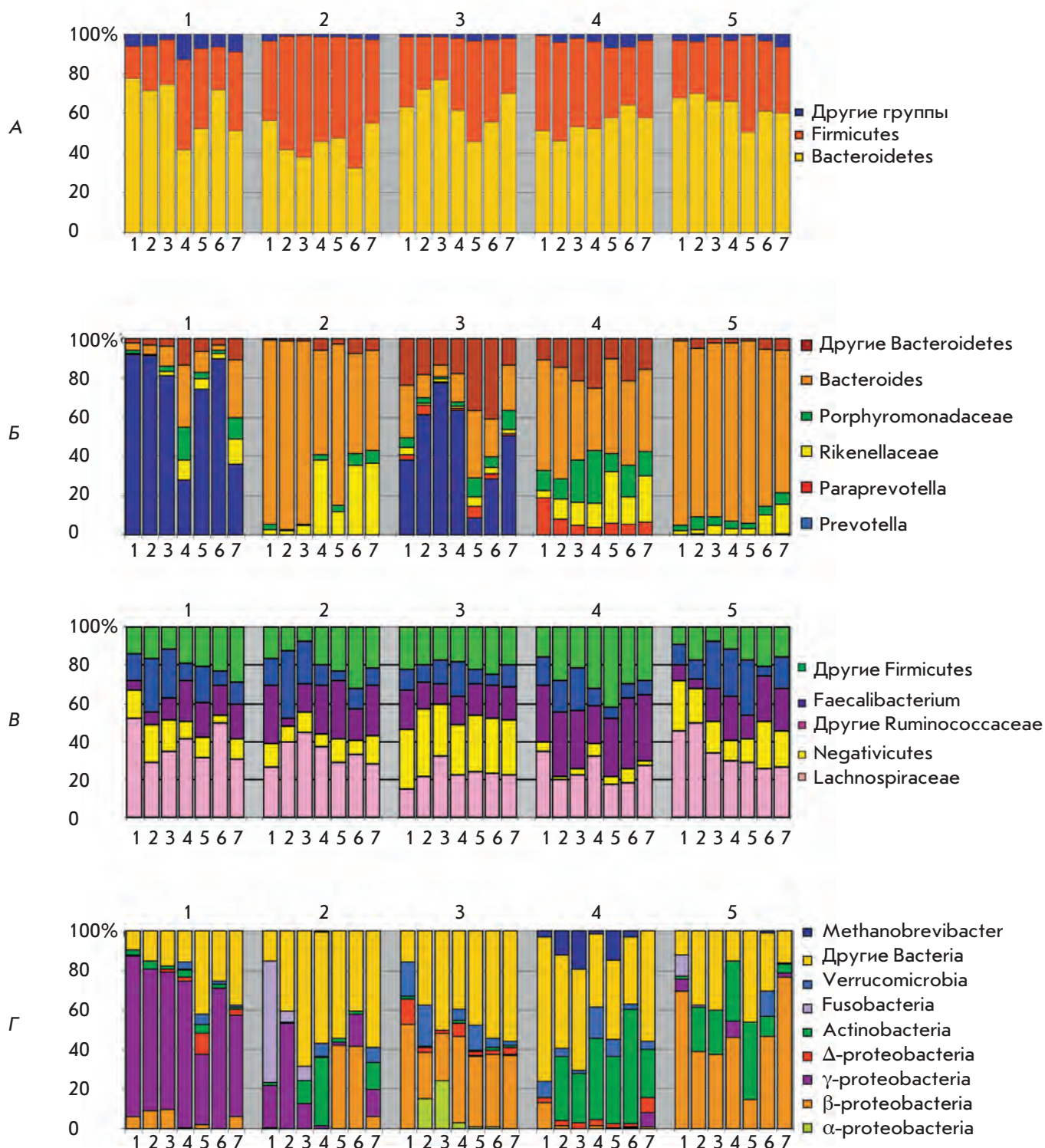


Рис. 1. Динамика изменения микробиоты кишечника участников эксперимента «МАРС-500». А – Основные группы микроорганизмов; Б – микроорганизмы филума Bacteroidetes; В – микроорганизмы филума Firmicutes; Г – минорные группы микроорганизмов. По оси ординат указана доля последовательностей, отнесенных к соответствующей таксономической группе (%), по оси абсцисс – номер образца (1 – 0, 2 – 14, 3 – 30, 4 – 210, 5 – 363, 6 – 510 и 7 – 524 дня). Сверху указаны идентификационные номера участника проекта

изменений в микробиоте на родовом и видовом уровне, а также по такому показателю, как соотношение основных филумов, Firmicutes (F) и Bacteroidetes (B). В микробиоте участников № 1, № 2, № 3 соотношение F/V заметно изменялось, а у участников № 4 и № 5 оставалось относительно стабильным на протяжении всего эксперимента (рис. 1А). Если у участника № 1 соотношение F/V существенно увеличивалось только к этапу 210 дней пребывания в модуле, то у участника № 2 повышение этого показателя наблюдалось уже через 2 недели, но после 210 дней начинало снижаться. У участника № 3, напротив, в первый месяц соотношение F/V уменьшалось, но затем снова повышалось. В ряде работ было показано, что резкие изменения в соотношении Firmicutes/Bacteroidetes встречаются при некоторых гастроэнтерологических [13, 44] и других заболеваниях [45, 46]. Однако ни у кого из участников эксперимента «МАРС-500» в ходе пребывания в модуле не были зарегистрированы симптомы такого рода заболеваний.

В течение всего эксперимента не происходили замены базового энтеротипа, хотя в микробиоте заметно изменялось долевое содержание отдельных таксонов. У участника № 1 с этапа 210 дней увеличилась доля неидентифицированных бактерий, представителей Firmicutes (рис. 1В) и протеобактерий (рис. 1Г) при сохранении высокого уровня *Prevotella*, *Faecalibacterium* и *Coprococcus* (рис. 1В). У участника № 2 обнаружена утрата фузобактерий уже на 14 день эксперимента (рис. 1Г) и колебания в относительном содержании определяющих энтеротип II бактерий рода *Bacteroides* (рис. 1Б). В первые недели отмечено некоторое увеличение доли *Faecalibacterium* (с последующим снижением) и уменьшение доли *Roseburia* при увеличении минорных видов *Alistipes* (*Rikenellaceae*) и представителей *Lachnospiraceae*. В микробиоте участника № 3 отмечено незначительное уменьшение доли

Bacteroides в первые недели при одновременном повышении относительного содержания *Prevotellaceae* (рис. 1Б) и доли γ -протеобактерий, а также *Megamonas* (*Negativicutes*) и неклассифицированных групп бактерий. В картине изменений состава большинства видов и родов кишечной микробиоты участника № 4 отсутствовали большие колебания (рис. 1), но явно прослеживалось увеличение относительного содержания *Faecalibacterium prausnitzii* (рис. 1В) в первые недели эксперимента и *Roseburia* на этапе 210 дней, а также повышение доли актинобактерий (рис. 2). Не выявлено существенных изменений в составе микробиоты (кроме протеобактерий) участника № 5 (рис. 1А), у которого, однако, обнаружена тенденция к снижению доли *Bacteroides* к концу пребывания в модуле (рис. 1Б).

При детальном сравнительном анализе профилей микробиоты выявлены определенные закономерности в динамике содержания актинобактерий и *Negativicutes*. В исходных пробах микробиоты у всех участников содержание актинобактерий минимально, что, возможно, связано с особенностями методики выделения ДНК и/или использованием праймеров, малоэффективных для получения фрагментов 16S рРНК бифидобактерий. Как видно на рис. 2, в пробах, взятых на разных этапах эксперимента, увеличено относительное содержание актинобактерий, особенно в микробиоте участника № 4. Такое повышение доли актинобактерий обусловлено, возможно, приемом пробиотиков, которые могут стимулировать рост бифидобактерий. Не исключено, однако, что такое возрастание доли актинобактерий определяется их более активной диссоциацией от поверхности эпителия, где осуществляется колонизация. Если состав *Negativicutes* на уровне рода не изменялся существенно в ходе эксперимента у участников № 2, № 4 и № 5, то в микробиоте участника № 3 обнаружено последовательное замещение рода *Phascolarctobacter* бак-

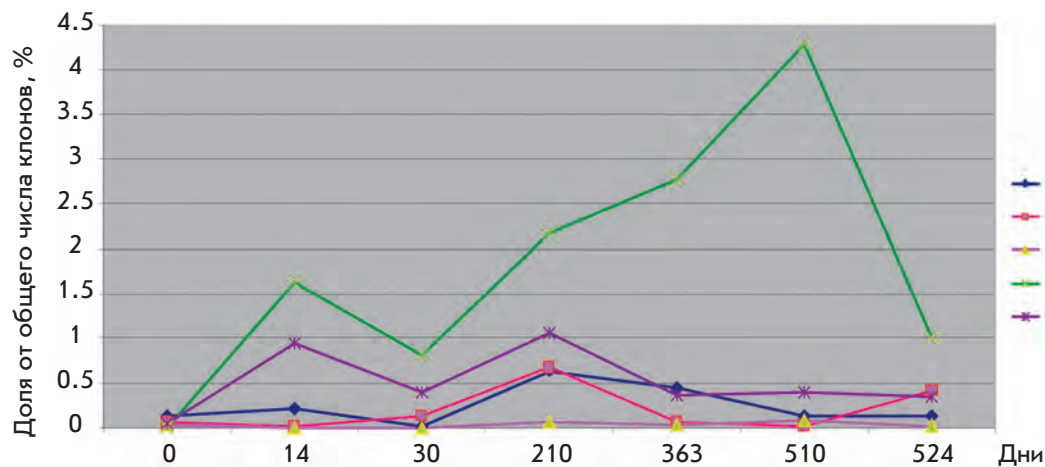


Рис. 2. Динамика изменения относительного содержания актинобактерий в микробиоте участников эксперимента «МАРС-500»

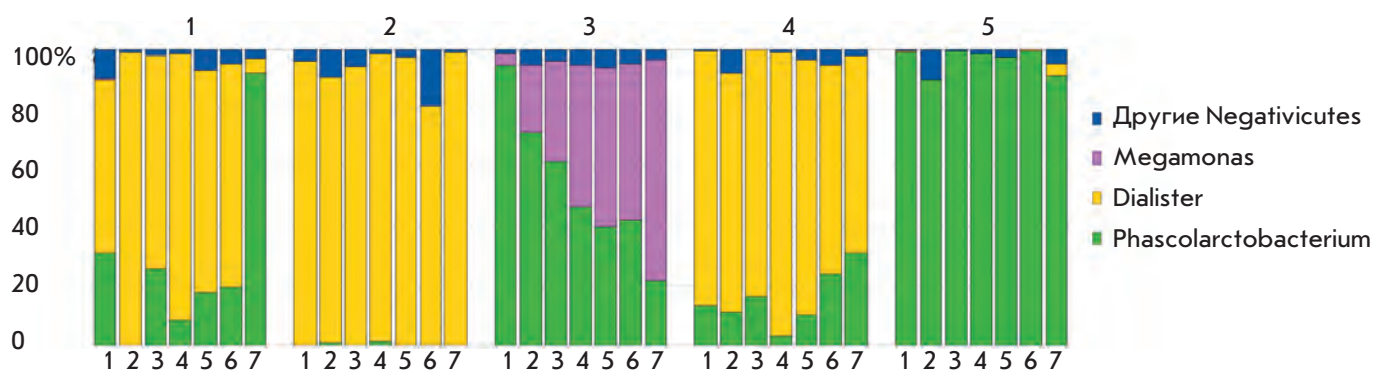


Рис. 3. Динамика изменения состава фирмикут Negativicutes в микробиоте участников эксперимента «МАРС-500». По оси ординат указана доля последовательностей, отнесенных к соответствующей таксономической группе (%); по оси абсцисс – номер образца (1 – 0, 2 – 14, 3 – 30, 4 – 210, 5 – 363, 6 – 510 и 7 – 524 дня). Сверху указаны идентификационные номера участника проекта

териями рода *Megamonas* (рис. 3) без восстановления исходного состава Negativicutes через 2 недели после выхода из модуля.

Анализируя динамику изменений состава кишечной микробиоты в ходе эксперимента, можно отметить следующие тенденции. Во-первых, воздействие условий/факторов эксперимента проявляется уже в первые недели, хотя и в разной степени у разных участников. Можно полагать, что быстрые изменения вызваны первой психоэмоциональной реакцией на непривычные стрессовые условия пребывания в изолированном модуле. Во-вторых, прослеживается тенденция к частичному восстановлению начального состава микробиоты по отдельным группам таксонов после завершения эксперимента. Однако ни у одного из участников исходный состав не восстановился полностью через 2 недели после выхода из модуля. Известно, что после применения антибиотиков, вызывающих резкие сдвиги в составе микроб-

ного сообщества в кишечнике, исходный состав начинает восстанавливаться после прекращения приема лекарственного средства [14], но даже для неполного восстановления состава индигенной микробиоты требуется длительное время [47].

Определение генного состава микробиоты участника № 2

Представленные выше результаты анализа таксономического состава микробиома по последовательностям генов 16S рРНК не дают прямой информации о наборе функциональных генов в микробном метабеноме. Поэтому нами определен генный состав образцов микробиоты участника № 2, у которого наблюдались заметные изменения в таксономическом составе микроорганизмов в ходе эксперимента.

При анализе результатов секвенирования образцов метабеномов ДНК по технологии SOLiD (табл. 2) следует учитывать, что 1) средняя длина контигов

Таблица 2. Результаты секвенирования метабеномов микробиоты кишечника участника № 2 на геномном анализаторе SOLiD

Этап эксперимента, дни	Число чтений, млн шт.	Объем секвенирования, млрд н.	N50 контига, нуклеотиды	Суммарная длина контигов, млн н.
0	42.0	2.0	185	26
14	57.7	2.8	157	23
30	68.7	3.3	147	23
210	38.6	1.8	155	26
363	68.9	3.3	152	34
524	70.6	3.3	159	32

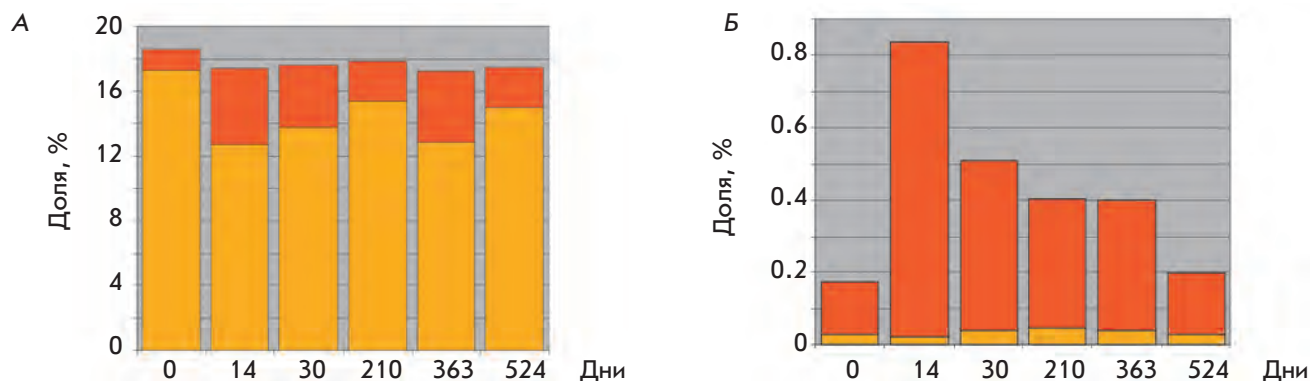


Рис. 4. Динамика изменений доли генов, отнесенных к функциональным категориям KEGG «Carbohydrates metabolism» (А) и «Cell motility» (Б) в метагеноме микробиоты кишечника участника № 2. По оси ординат указана доля генов соответствующей категории (%), по оси абсцисс – номер образца (1, 14, 30, 210, 363 и 524 дня). Желтым указаны доли генов, отнесенные к Bacteroidetes, оранжевым – к Firmicutes

для разных точек не превышала 200 нуклеотидов, т.е. была существенно меньше среднего размера бактериального гена; 2) присутствовавшие в микробиоме Bacteroidetes были представлены в основном родом *Bacteroides*, у многих видов которого определены полные геномные последовательности. Бактерии филума Firmicutes филогенетически более разнообразны. Поэтому таксономическая идентификация контигов, относящихся к Bacteroidetes, была более полной, в то время как многие контиги, в действительности принадлежащие Firmicutes, не удалось классифицировать из-за отсутствия близких гомологов в базах данных. Это привело к занижению доли Firmicutes в метагеноме по сравнению с результатами анализа по 16S рРНК. Тем не менее динамика изменений в соотношении Bacteroidetes и Firmicutes сохранялась.

Была охарактеризована количественная представленность генов определенных функциональных категорий в метагеноме (по классификации KEGG, [34]) и их принадлежность к различным таксономическим группам бактерий. В целом по основным функциональным категориям генов существенных изменений в микробиоте участника № 2 на протяжении эксперимента отмечено не было. Так, на категорию KEGG «Carbohydrates metabolism», одной из важнейших для функционирования кишечной микробиоты, на разных этапах эксперимента приходилось от 16.7 до 18.6% идентифицированных генов (рис. 4А). Однако относительный вклад различных таксонов Bacteroidetes и Firmicutes менялся в гораздо более широком диапазоне, о чем свидетельствуют результаты «таксономической» классификации этих генов и данные, полученные на основе таксономического анализа по 16S рРНК. Можно предполо-

жить, что в процессе перестройки таксономического состава микробиома происходило замещение генов, определяющих метаболизм углеводов, у различных представителей Bacteroidetes и Firmicutes, но общая доля этой функциональной категории в метагеноме почти не менялась.

Иная картина получена при анализе динамики изменений доли генов категории KEGG «Cell motility», контролирующей подвижность клеток (рис. 4Б). Большинство генов этой категории относились к Firmicutes и соответственно их доля в метагеноме изменялась при изменении относительного содержания Firmicutes и, возможно, Proteobacteria в сообществе. Эти данные согласуются с малым числом генов, определяющих подвижность клеток, в секвенированных геномах представителей рода *Bacteroides*. Признак подвижности клеток у Firmicutes и Proteobacteria контролируется большим числом генов [48]. Жгутики обеспечивают не только подвижность, но и сенсорные функции и межклеточные коммуникации в экосистемах [49]. Возможно, «востребованность» функции подвижности клеток определяет увеличение доли некоторых фило типов Firmicutes при перестройке микробного сообщества в ходе эксперимента.

Можно предполагать, что в процессе эксперимента «МАРС-500» происходила адаптивная перестройка микробного сообщества в ответ на стрессовые воздействия факторов длительной изоляции и формировался новый, сбалансированный таксономический состав микробиоты, обеспечивающий поддержание нормального функционирования гено-метаболических сетей как в самом микробном сообществе кишечника, так и в системе взаимодействий микробиоты с орга-

низмом хозяина. Такой адаптивный переход на новое сочетание таксонов с сохранением оптимального генного состава в целом сообществе может быть обеспечен за счет избыточности большинства категорий генов и функциональной взаимозаменяемости бактериальных филотипов из различных таксономических групп. Одним из механизмов такой взаимозаменяемости может быть обмен генами путем горизонтального переноса [50], который потенциально возможен при участии вирусов, мобильных элементов и конъюгативных плазмид, присущих многим микробам, обитающим в кишечнике.

ВЫВОДЫ

Результаты метагеномного анализа микробиоты кишечника у участников эксперимента «МАРС-500», имитирующего некоторые условия длительных межпланетных полетов, свидетельствуют о том, что при пребывании в закрытом модуле в микробиоте происходят заметные изменения в составе микробного сообщества. Эти изменения индивидуальны для каждого из участников, что определяется как различиями в исходном составе микробиоты, так и различным характером ответа на воздействие условий эксперимента в зависимости от генетических и физиолого-биохимических особенностей каждого из участников.

Факторами, влияющими на таксономический состав микробиоты, являются психологический стресс, обусловленный сменой образа жизни, переход на иной тип питания, прием пробиотиков. Мониторинг динамики изменений в микробиоте показал, что (1) заметные изменения в таксономическом составе начинают проявляться уже на первых этапах эксперимента; (2) несмотря на большую вариабельность, в составе отдельных таксономических групп смены энтеротипов не происходит, т.е. сохраняется базовый состав кишечной экосистемы; (3) через 2 недели после выхода из модуля наблюдается тенденция возврата к исходному составу микробиоты, но ни у одного из участников не происходит полного восстановления начального состава микробного сообщества. Возможно, двухнедельного периода «реабилитации» просто недостаточно для восстановления.

Поскольку в ходе эксперимента ни у одного из участников не было отмечено симптомов заболеваний, при которых состав микробиоты может существенно изменяться [6, 11, 12], то можно предпо-

ложить, что в экосистемах кишечника происходила перестройка таксономического состава, отражающая индивидуальный ответ на воздействие условий эксперимента, и формировалось новое сбалансированное сообщество. В пользу этого предположения свидетельствуют данные анализа генного состава микробиоты участника № 2. Генный состав метабенома кишечной микробиоты у этого участника мало изменялся на разных этапах эксперимента, что могло быть обусловлено компенсаторным замещением одних видов/штаммов другими, способными выполнять функции, связанные с обеспечением «нормального» взаимодействия микробного сообщества с организмом хозяина.

Таким образом, можно полагать, что мощное стрессовое воздействие длительного пребывания в изолированном модуле не оказалось для состояния микробиоты кишечника «драматическим» и не привело к заметным негативным последствиям для здоровья участников эксперимента. Очевидно, что изоляция при длительных космических полетах является лишь одним из стрессовых факторов, действие которых может потенциально влиять на космонавтов. При правильном отборе и подготовке экипажа этот фактор, по-видимому, не является решающим. Более существенными могут быть невесомость, радиация и некоторые специфические условия работы в корабле. Эти факторы, трудно воспроизводимые в условиях наземного эксперимента, могут увеличить вероятность нарушения функций желудочно-кишечного тракта, иммунной и других систем организма, что может вызвать развитие дисбиоза, который будет выражаться в существенных изменениях таксономического и генного состава микробиоты кишечника. Полученные в данной работе сведения об изменениях в составе микробиоты кишечника участников эксперимента «МАРС-500» следует рассматривать в плане возможностей использования методов метагеномного анализа микробиоты как одного из способов тестирования состояния здоровья участников реальных космических полетов и кандидатов для выполнения работ в экстремальных условиях действия сильных стрессовых факторов. ●

Работа поддержана программой развития ФГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» до 2020 года.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huttenhower C., Gevers D., Knight R., Abubucker S., Badger J.H., Chinwalla A.T., Creasy H.H., Earl A.M., FitzGerald M.G., Fulton R.S., et al. // Nature. 2012. V. 486. P. 207–214.

2. Methe B.A., Nelson K.E., Pop M., Creasy H.H., Giglio M.G., Huttenhower C., Gevers D., Petrosino J.F., Abubucker S., Badger J.H., et al. // Nature. 2012. V. 486. P. 215–221.
3. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S.,

- Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., et al. // *Nature*. 2010. V. 464. P. 59.
4. Kinross J.M., von Roon A.C., Holmes E., Darzi A., Nicholson J.K. // *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2008. V. 464. P. 396–403.
 5. Shestakov S.V. // *Biol. Bull. Rev.* 2011. V. 1. № 2. P. 83–93.
 6. Blumberg R., Powrie F. // *Sci. Translational Med.* 2012. V. 4. № 137. P. 137rv7.
 7. Claesson M.J., Cusack S., O’Sullivan O., Greene-Diniza R., de Weerd H., Flannery E., Marchesi J., Falush D., Dinanb T., Fitzgerald G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. Suppl. 1. P. 4586–4591.
 8. Turnbaugh P.J., Quince C., Faith J.J., Yatsunenko T., Niaz F., Affourtit J., Egholm M., Henrissat B., Knight R., Gordon J.I., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 7503–7508.
 9. Jalanka-Tuovinen J., Salonen A., Nikkila J., Immonen Q., Kekkonen R., Lahti L., Palva A., de Vos W. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e23035.
 10. Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J.-P., Ugarte E., Munoz-Tamayo R., Paslier D.L.E., Nalin R., Dore J., Leclerc M. // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. № 10. P. 2574–2584.
 11. Willing B.P., Dicksved J., Halvorson J., Andersson A.F., Lucio M., Zheng Z., Jarnerot G., Tysk C., Jansson J.K., Engstrand L. // *Gastroenterology*. 2010. V. 139. P. 1844–1854.
 12. Frank D.N., St. Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 13780–13785.
 13. Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. e280.
 14. Dethlefsen L., Relman D.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 4554–4561.
 15. Robinson C.J., Bohannan B.J.M., Young V.B. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010. V. 74. № 3. P. 453–476.
 16. Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.-Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., et al. // *Science*. 2011. V. 334. P. 105–108.
 17. Claesson M.J., Jeffery I.B., Conde S. Power S.E., O’Connor E.M., Cusack S., Harris H.M.B., Coakley M., Lakshminarayanan M., O’Sullivan O., et al. // *Nature*. 2012. V. 488. P. 178–184.
 18. Lutgendorff F., Akkermans L.M.A., Soderholm J.D. // *Curr. Mol. Med.* 2008. V. 8. P. 282–298.
 19. Phillips M.L. // *Environm. Hlth Perspect.* 2009. V. 117. P. 199–205.
 20. Sharkey K.A., Mawe G.M. // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012. V. 9. P. 74–76.
 21. Лебедев В.В. // *Вест. РАН*. 2010. Т. 80. № 11. С. 1000–1004.
 22. Григорьев А.И., Егоров А.Д. Человек в космическом полете. М.: Наука, 1997. Т. 2. С. 368–447.
 23. Lizko N.N. // *Nahrung*. 1987. V. 31. P. 443–447.
 24. Лизько Н.Н. // *Вест. РАМН*. 1996. № 8. С. 31–34.
 25. Ильин В.К., Батов А.Б., Новикова Н.Д., Мухамедиева Л.Н., Поддубко С.В., Гегенава А.В., Марданов Р.Г., Соловьева З.О., Скедина М.А. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2010. Т. 44. № 4. С. 52–57.
 26. Ушаков И.Б. // *Abst. Intern. Symp. Results of the experiments simulating manned mission to Mars (MARS-500)*. Moscow: RAS, 2012. P. 64–65.
 27. Моруков В.В., Белаковский М.С., Демин Е.П., Суворов А.В. // *Abst. Intern. Symp. Results of the experiments simulating manned mission to Mars (MARS-500)*. Moscow: RAS, 2012. P. 44.
 28. Salonen A., Nikkila J., Jalanka-Tuovinen J., Immonen O., Rajilic-Stojanovic M., Kekkonen R.A., Palva A., de Vos W. // *J. Microbiol. Methods*. 2010. V. 81. P. 127–134.
 29. Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 7537–7541.
 30. Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2194–2200.
 31. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 5261–5267.
 32. Simpson J.T., Wong K., Jackman S.D., Jones S.J.M., Birol I. // *Genome Res.* 2009. V. 19. № 6. P. 1117–1123.
 33. Rho M., Tang H., Ye Y. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 20. E191.
 34. Kent W.J. // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 656–664.
 35. Overbeek R., Begley T., Butler R.M., Choudhuri J.V., Chuang H.-Y., Cohoon M., de Crecy-Lagard V., Diaz N., Disz T., Edwards R., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 17. P. 5691–5702.
 36. Apweiler R., Martin M.J., O’Donovan C., Magrane M., Alam-Faruque J., Antunes R., Barrell D., Bely B., Bingley M., Binns D. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. D214–219.
 37. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. // *Genome Biol.* 2009. V. 10. R25.
 38. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. // *Science*. 2005. V. 308. P. 1635–1668.
 39. Claesson M.J., O’Sullivan O., Wang Q., Nikkila J., Marchesi J.R., Smidt H., de Vos W.M., Ross R.P., O’Toole P.W. // *PLoS One*. 2009. V. 4. e6669.
 40. O’Toole P.W., Claesson M.J. // *Intern. Dairy J.* 2010. V. 20. P. 281–291.
 41. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.-M., et al. // *Nature*. 2011. V. 473. P. 174–180.
 42. Huse S.M., Ye Y., Zhou V., Fodor A.A. // *PLoS One*. 2012. V. 7. e34242.
 43. Jeffrey I.B., Claesson J., O’Toole P.W. // *Nat. Microbiol. Rev.* 2012. V. 10. P. 591–592.
 44. Frank D.N., Pace N.R. // *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008. V. 24. P. 4–10.
 45. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 1022–1023.
 46. Schwiertz A., Taras D., Schafer K., Beijer S., Bos N.A., Donus C., Hardt P.D. // *Obesity*. 2009. V. 18. P. 190–195.
 47. Jerenberg C., Lofmark S., Edlund C., Jansson J.K. // *ISME J.* 2007. V. 1. P. 55–61.
 48. Bratlie M., Johansen J., Sherman B.T., Huang D.W., Lempicki R.A., Drablos F. // *BMC Genomics*. 2010. V. 11. P. 588.
 49. Anderson J.K., Smith T.G., Hoover T.R. // *Trends Microbiol.* 2010. V. 18. № 1. P. 30–37.
 50. Smillie C.S., Smith M.B., Friedman J., Cordero O.X., David L.A., Alm E.J. // *Nature*. 2011. V. 480. P. 241–244.

УДК 577.3

Стабилизация центральной части тропомиозина изменяет чувствительность актин-миозинового взаимодействия к ионам кальция

Д. В. Щепкин¹, А. М. Матюшенко², Г. В. Копылова¹, Н. В. Артемова², С. Ю. Бершицкий¹, А. К. Цатурян³, Д. И. Левицкий^{2,4*}

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

³Институт механики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Мичуринский просп., 1

⁴НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: levitsky@inbi.ras.ru

Поступило в редакцию 23.04.2013

РЕФЕРАТ Показано, что мутации D137L и G126R, стабилизирующие центральную часть молекулы тропомиозина (ТМ), увеличивают максимальную скорость скольжения регулируемых актиновых филаментов в искусственной подвижной системе при высоких концентрациях Ca^{2+} и повышают Ca^{2+} -чувствительность актин-миозинового взаимодействия, обеспечивающего такое скольжение. На основе анализа опубликованных данных о структуре комплекса актин-ТМ-миозин высказано предположение, что физиологические эффекты этих мутаций в ТМ могут быть обусловлены влиянием на взаимодействия между центральной частью ТМ и определенными участками головки миозина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА актин, искусственная подвижная система, миозин, регуляция мышечного сокращения, тропомиозин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИПС – искусственная подвижная система; ТМ – тропомиозин.

ВВЕДЕНИЕ

Тропомиозин (ТМ) является одним из ключевых компонентов регуляторного аппарата тонких филаментов всех типов мышц. Согласно теории «стерического блокирования», лежащей в основе современных представлений о механизме регуляции сокращения скелетной и сердечной мышц, ТМ способен перемещаться по поверхности актинового филамента, открывая или закрывая участки взаимодействия актина с головками молекул миозина [1]. Молекула ТМ представляет собой димер α -спиралей, образующих левозакрученную суперспираль (coiled-coil) [2]. В последнее время накапливаются данные о том, что структура молекулы ТМ далеко не так проста, как считалось ранее. Отмечаются такие необычные, характерные только для ТМ черты структуры, как наличие участков с повышенной конформационной подвижностью. В центральной части молекулы ТМ обнаружены консервативные неканонические остатки, нарушающие coiled-coil-структуру в этой

области, – Asp137 [3] и Gly126 [4]. Замена этих остатков на канонические (мутации D137L, G126R и G126A) приводила к стабилизации центральной части молекулы ТМ, полностью предотвращая расщепление ТМ трипсином по близлежащему Arg133 [3, 4]. Более того, в обеих работах было показано, что стабилизирующие мутации D137L и G126R (но не G126A) вызывают значительное увеличение активности актин-активируемой АТР-азы головок миозина при высоких концентрациях кальция ($pCa \leq 5$) при их взаимодействии с актиновыми нитями, содержащими ТМ и тропонин, но при этом не оказывают влияния ни на Ca^{2+} -чувствительность АТР-азы, ни на сродство ТМ к актину [3, 4]. В настоящей работе мы более подробно исследовали влияние этих мутаций на регуляторные свойства ТМ, впервые используя для этой цели более чувствительный метод искусственной подвижной системы (ИПС, *in vitro* motility assay), позволяющий регистрировать скорость движения реконструированных тонких фила-

ментов по поверхности, на которой иммобилизован миозин.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантный скелетно-мышечный α -ТМ с мутациями D137L и G126R получали, как описано ранее [4], используя в качестве белка дикого типа ТМ, в котором Cys190 заменен на Ala (мутация C190A) [3]. Эксперименты и измерения характеристик скольжения регулируемых тонких нитей в ИПС при разных концентрациях Ca^{2+} проводили согласно описанной ранее методике [5]. Проточную камеру, покрытую изнутри нитроцеллюлозой, загружали раствором миозина из скелетных мышц кролика в концентрации 0.5 мкМ (0.2 мг/мл). Неприсоединившийся миозин отмывали и загружали регулируемые тонкие нити, состоящие из 10 нМ F-актина, меченного родамин-фаллоидином, 0.1 мкМ тропонина и 0.1 мкМ ТМ в буфере, содержащем 25 мМ KCl, 25 мМ имидазол, 2 мМ АТФ, 4 мМ MgCl_2 , 1 мМ EGTA, 20 мМ ДТТ, 3.5 мг/мл глюкозы, 20 мкг/мл каталазы и 0.15 мг/мл глюкозооксидазы, pH 7.5. (Такие условия оптимальны для изучения скорости скольжения реконструированных тонких филаментов в ИПС [6].) Концентрации свободного кальция задавали соотношением EGTA/ Ca -EGTA, рассчитанным с помощью программы WebMaxC Standard (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>). Эксперименты проводили при 30°C, скорость скольжения тонких нитей измеряли с помощью программы GMimPro [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что мутации D137L и G126R, стабилизирующие центральную часть молекулы ТМ, не только увеличивают на 20–30% максимальную скорость скольжения регулируемых тонких нитей в ИПС при высоких концентрациях Ca^{2+} (рис. 1А), но и повышают чувствительность скорости скольжения к Ca^{2+} , смещая кривую Ca -зависимости в сторону более низких концентраций Ca^{2+} (рис. 1Б). Величина $p\text{Ca}_{50}$ (т.е. отрицательный логарифм концентрации свободного Ca^{2+} , при которой скорость скольжения полумаксимальна) составляла 6.06 ± 0.04 (здесь и далее приведены средние значения \pm ошибка среднего) для регулируемых тонких филаментов, содержащих контрольный ТМ с мутацией C190A, 6.36 ± 0.05 для филаментов, содержащих ТМ с мутациями D137L/C190A, и 6.42 ± 0.03 для филаментов с мутациями ТМ G126R/C190A. Таким образом, нам впервые удалось показать, что стабилизирующие мутации D137L и G126R в центральной части молекулы ТМ заметно повышают Ca^{2+} -чувствительность актин-миозинового взаимодействия, лежащего

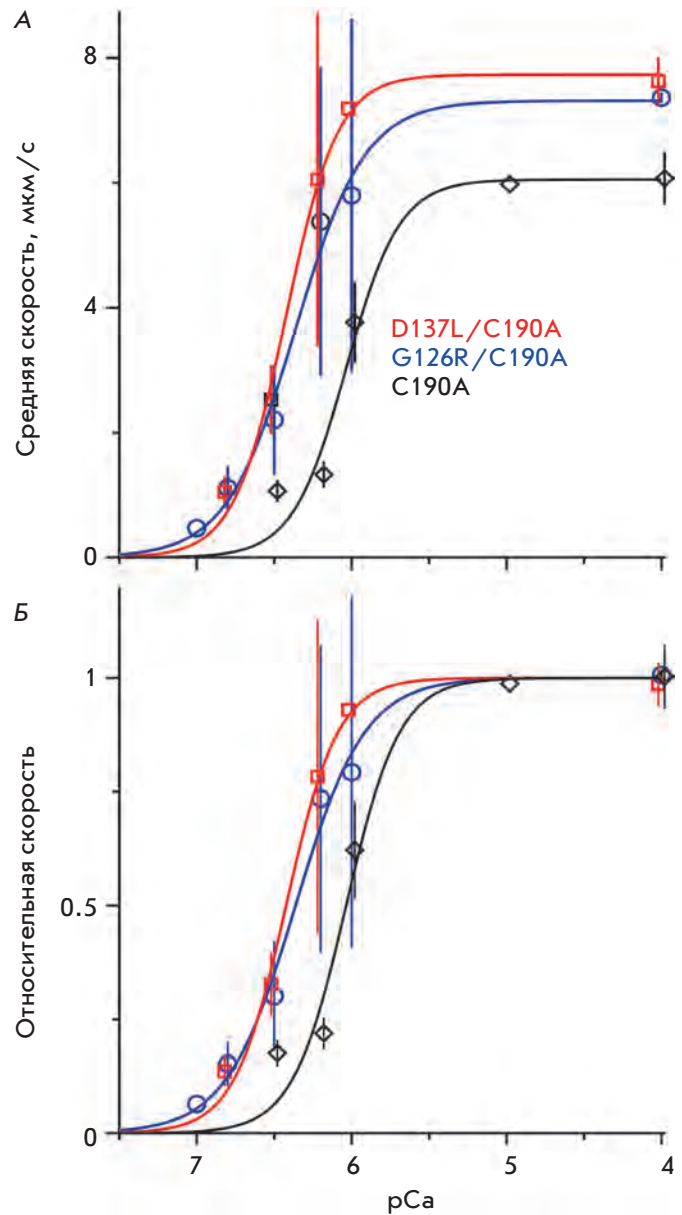


Рис. 1. Зависимость средней скорости скольжения регулируемых тонких нитей по поверхности, покрытой миозином, от концентрации Ca^{2+} . А — Средние данные по 2–3 экспериментам с каждым из мутантов ТМ. Вертикальные линии — среднеквадратичные отклонения. Б — Нормализованные зависимости для данных, представленных на части А

в основе молекулярного механизма мышечного сокращения и регулируемого изменениями концентрации Ca^{2+} в мышечном волокне. Данные об увеличении скорости скольжения нитей в ИПС (рис. 1А) хорошо коррелируют с увеличением скорости АТФ-азы миозина в присутствии регулируемых тонких нитей

с мутациями D137L и G126R в центральной части ТМ при насыщающей концентрации Ca^{2+} [3, 4].

Для интерпретации результатов мы избрали новый подход, основанный на анализе недавно опубликованных данных о структуре комплекса актин–ТМ–миозин, полученной с разрешением 8 Å методом криоэлектронной микроскопии [8]. Важной особенностью этой структуры являются непосредственные контакты между молекулой ТМ, расположенной на поверхности актинового филамента, и определенными участками головки миозина. Поскольку эта структура была получена с использованием немускульного миозина-I, мы при построении нашей модели (рис. 2) заменили участки взаимодействия с ТМ в миозине-I на соответствующие участки головки миозина-II скелетных мышц, использованного в наших опытах. При построении модели мы искали те остатки в головке миозина, которые находятся достаточно близко от остатков в положениях 126 и 137 в центральной части ТМ и могли бы вступать с ними во взаимодействия. Результаты этого поиска представлены на рис. 2. Оказалось, что остаток Gly126 не способен к каким-либо взаимодействиям с миозином, однако вследствие мутации G126R остаток Arg126 в ТМ оказывается вблизи от остатка Lys399 в головке миозина, и между положительно заряженными атомами этих остатков возникнет электростатическое отталкивание (рис. 2А). В пользу такой интерпретации свидетельствует тот факт, что замена остатка Gly126 в ТМ не на заряженный Arg, а на маленький и гидрофобный Ala не влияла на АТФ-азную активность миозина в комплексе с регулируемым актиновыми филаментами [3]. С другой стороны, отрицательно заряженный остаток Asp137 находится близко от положительно заряженного остатка Arg371 в головке миозина и вступает с ним в электростатическое взаимодействие (рис. 2Б), которое нарушается при замене остатка Asp137 на остаток лейцина вследствие мутации D137L.

Таким образом, в обоих случаях мутации в центральной части ТМ должны приводить к уменьшению энергии взаимодействия ТМ с головкой миозина, прочно присоединенной к актину. Величина такого уменьшения энергии мала по сравнению с энергией прочного связывания миозина с актином [8], но сопоставима с энергией, нужной для перемещения ТМ по поверхности актинового филамента. Согласно теории «стерического блокирования» [1, 9], в отсутствие Ca^{2+} тропонин удерживает ТМ в положении, в котором он закрывает участки связывания на актине от миозина. При повышении концентрации Ca^{2+} тропонин отсоединяется от актлина и ТМ смещается, приоткрывая эти участки. Головки миозина вначале присоединяются к актину «слабо» и непрочно, а за-

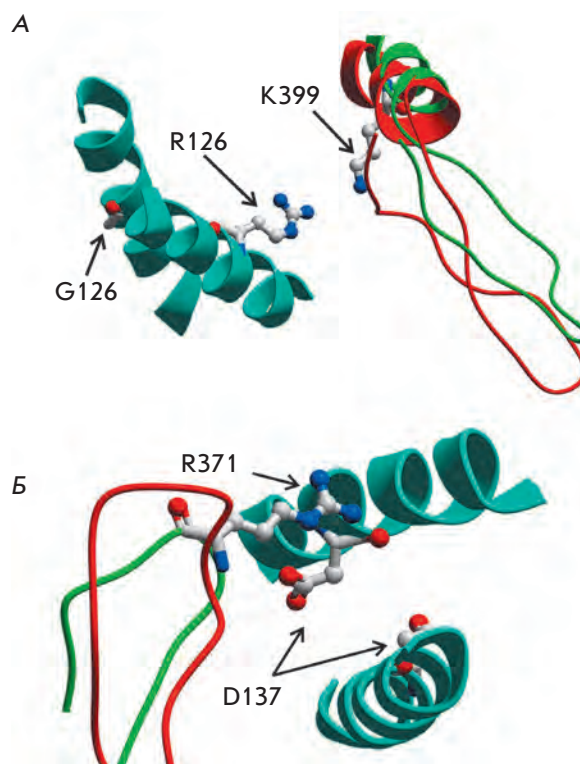


Рис. 2. Структурная модель области контакта миозиновой головки с ТМ на поверхности актинового филамента при прочном связывании миозина с актином. Показаны только участки миозиновой головки, прилегающие к аминокислотным остаткам 126 (А) и 137 (Б) в центральной части ТМ (актин и остальные части миозина и ТМ не показаны). Модель получена из структуры комплекса актин–ТМ–миозин ([8], код pdb 4A7H) встраиванием верхнего 50-кДа домена головки миозина-II быстрых скелетных мышц цыпленка (код pdb 2MYS) вместо головки миозина-I. Сегменты двойной α -спирали ТМ показаны голубыми лентами, участки головки миозина-I, использованного в работе [8], – красным, а участки головки скелетно-мышечного миозина-II – зеленым. В атомном представлении показаны остатки R126 в ТМ с мутацией G126R (А) и «неканонический» остаток D137 в молекуле ТМ (Б), замененный на Leu в мутантном белке D137L/C190A, а также заряженные остатки миозиновой головки K399 (А) и R371 (Б), расположенные в непосредственной близости от этих остатков ТМ. Расстояния между заряженными атомами остатков K399 в миозине и R126 в ТМ (А) составили в модели 8.8 Å, а между R371 миозина и D137 в ТМ (Б) – 4.7 Å. Модель и рисунок подготовлены с помощью программы ICM-Browser (MolSoft, Калифорния, США)

тем переходят в состояние «сильного» связывания и еще дальше смещают тяжи ТМ, освобождая все больше мест связывания миозина на соседних мономерах актина. Судя по нашим данным, исследованные мутации в центральной части ТМ усиливают его смещение по поверхности актиновой нити в результате прочного связывания миозиновой головки и соответственно дают возможность большему количеству соседних миозиновых головок присоединиться к актину и совершать работу. Именно этим можно, по-видимому, объяснить заметное влияние

таких мутаций в молекуле ТМ на скорость и Ca^{2+} -чувствительность скольжения регулируемых актиновых филаментов в ИПС. ●

*Работа поддержана РФФИ
(гранты № 12-04-00411-а, 11-04-00750-а,
11-04-00908-а и 12-04-31328-мол-а,
13-04-40099, 13-04-40100, 13-04-40101)
и Программой «Молекулярная и клеточная
биология» Президиума РАН.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McKillop D.F.A., Geeves M.A. // *Biophys. J.* 1993. V. 65. P. 693–701.
2. Невзоров И.А., Левицкий Д.И. // *Успехи биол. химии.* 2011. Т. 51. С. 283–334.
3. Sumida J.P., Wu E., Lehrer S.S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 6728–6734.
4. Nevzorov I.A., Nikolaeva O.P., Kainov Y.A., Redwood C.S., Levitsky D.I. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 15766–15772.
5. Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Nikitina L.V., Katsnelson L.B., Bershitsky S.Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 401. № 1. P. 159–163.
6. Homsher E., Kim B., Bobkova A., Tobacman L.S. // *Biophys. J.* 1996. V. 70. № 4. P. 1881–1892.
7. Mashanov G.I., Molloy J.E. // *Biophys. J.* 2007. V. 92. № 6. P. 2199–2211.
8. Behrmann E., Müller M., Penczek P.A., Mannherz H.G., Manstein D.J., Raunser S. // *Cell.* 2012. V. 150. № 2. P. 327–338.
9. Lehman W., Craig R. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. V. 644. P. 95–109.

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.

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 четырех.

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт — курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт — заглавный, полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).
- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком *.

- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3 – 6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μ М; нм, но не nm).

- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (АТФ, АМФ и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

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

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с первоначальным вариантом статьи, а также ответами на все замечания.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде PDF-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: vera.knorre@gmail.com, actanaturae@gmail.com, телефоны: (495) 727-38-60, (495) 930-87-07.

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