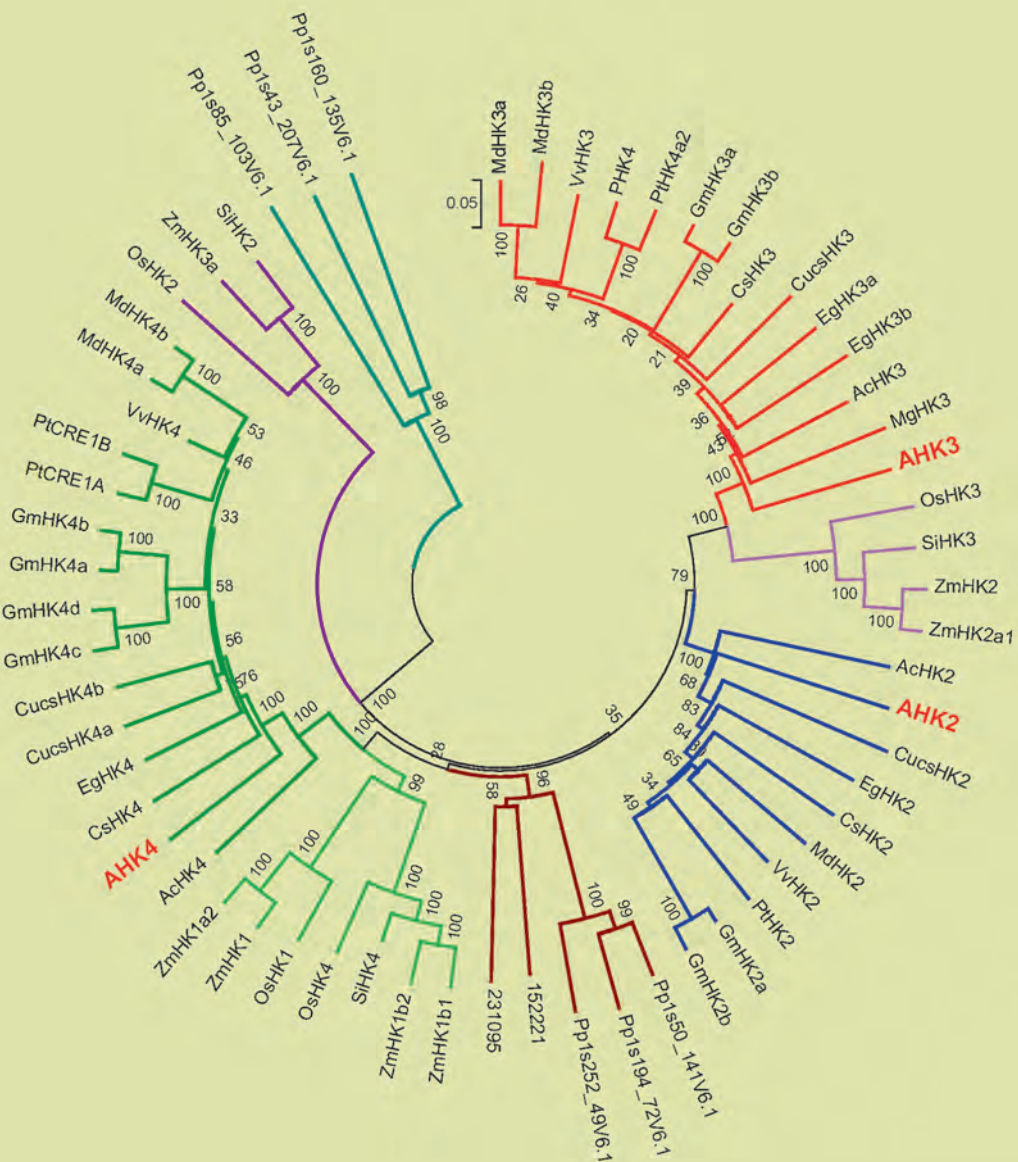


# Acta Naturae

## Свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов



# Письмо редакторов

**Д**орогие коллеги и читатели!  
Вашему вниманию предлагается 14-й номер нашего журнала. Номер открывается интервью с академиком РАН и РАМН Р.М. Хаитовым, удостоенным (вместе с академиком Р.В. Петровым) Государственной премии 2011 г. «за выдающиеся достижения в научном и практическом развитии отечественной иммунологии». Рахим Мусаевич делится с нами мыслями о развитии иммунологии и российской науки в целом. Мы же, со своей стороны, пользуемся случаем, чтобы еще раз поздравить лауреатов со столь высокой и заслуженной наградой.

Теперь о содержании текущего номера. В нем пять обзоров, посвященных актуальным проблемам науки о живом. Три из них относятся к области фундаментальной медицины – использованию клеточных технологий в лечении патологий печени (О.С. Петракова и др.), молекулярно-генетическим подходам к исследованиям полигенных заболеваний (D. Lvovs и др.) и кардиологическим биофармацевтикам (А.В. Максименко). Два посвящены более «академическим» аспектам – свойствам рецепторов и особенностям сигналинга цитокининов (С.Н. Ломин и др.) и структурно-функциональным исследова-

ниям липополисахарида чумного микроба (Ю.А. Книрель и А.П. Анисимов). Как видно из перечисленного, тематика обзоров достаточно разнообразна, и мы надеемся, что они найдут своего заинтересованного читателя.

Все три научных сообщения номера посвящены исследованиям в клеточных моделях. Хочется обратить особое внимание на статью А.И. Тухватулина и др. Эта работа выполнена на стыке двух, казалось бы, никак не связанных дисциплин – физики плазмы и клеточной биологии – и, как нам кажется, демонстрирует совершенно новый подход к биомедицинским исследованиям.

В заключение хочется еще раз напомнить читателям и будущим авторам, что наш журнал теперь находится в PubMed, причем публикуются полные тексты статей. Это обстоятельство налагает на всех нас особую ответственность по «контролю качества» наших публикаций, если мы хотим, чтобы Acta Naturae заняла достойное место в международном рейтинге научных журналов. Выражаем мнение, что объединенными усилиями нам удастся выполнить эту амбициозную задачу.

До встречи в следующем номере! ●

Редакционная коллегия

# Наука и технологии России – STRF.ru



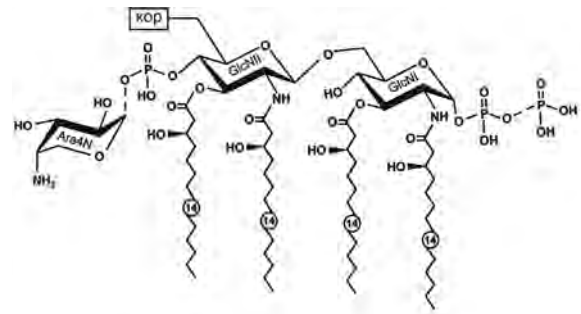
- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются, что публикации о результатах исследований помогут им выделиться на фоне коллег и конкурентов...  
...при этом
- 17% учёных никогда не общались с журналистами\*

Откройте миру свои открытия

## Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства

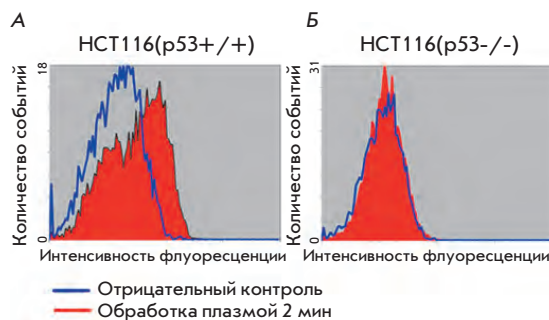
Ю. А. Книрель, А. П. Анисимов

В обзоре приведены данные о составе и строении углеводной части (олигосахарида кора) и липидного компонента (липид А) различных форм липополисахарида (ЛПС) – одного из важных факторов патогенности чумного микроба *Yersinia pestis*. Рассмотрены функции и биологическая значимость генов биосинтеза ЛПС, биологические свойства ЛПС штаммов различных внутривидовых групп *Y. pestis* и их мутантов. Обсуждаются перспективы создания живых противочумных вакцин на основе штаммов *Y. pestis* с генетически модифицированным ЛПС.



Структурный вариант липида А *Yersinia pestis* – тетраацильная форма, синтезируемая штаммами дикого типа при 37°C.

## Низкотемпературная плазма вызывает р53-зависимый апоптоз клеток карциномы кишечника



Внутриклеточная концентрация белка р53 в клетках НСТ116(р53+/+) и НСТ116(р53-/-).

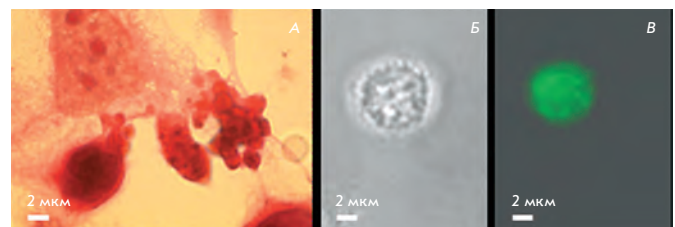
А. И. Тухватулин, Е. В. Сысолятина, Д. В. Щебляков, Д. Ю. Логунов, М. М. Васильев, М. А. Юрова, М. А. Данилова, О. Ф. Петров, Б. С. Народицкий, Г. Е. Morfill, А. И. Григорьев, В. Е. Фортов, А. Л. Гинцбург, С. А. Ермолаева

Низкотемпературная плазма (НТП) – это поток частично ионизированного газа, имеющего температуру, близкую к температуре окружающей среды. Показано, что обработка клеток карциномы кишечника низкотемпературной плазмой приводит к р53-зависимому апоптозу. Эти результаты важны для понимания возможностей использования НТП в медицине в качестве противоопухолевого средства.

## Митохондриальный путь апоптоза в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 при действии α-токоферилсукцината

М. А. Савицкая, М. С. Вильданова, О. П. Кисурина-Евгеньева, Е. А. Смирнова, Г. Е. Онищенко

В связи с распространенностью злокачественных заболеваний большое внимание уделяется поиску соединений, обладающих противоопухолевой активностью и селективностью в отношении опухолевых клеток. К этим соединениям относятся и такие производные витамина Е, как сукцинат витамина Е (СВЕ). Показано, что митохондрии служат важной мишенью действия СВЕ при запуске каспазозависимой апоптотической гибели клеток эпидермоидной карциномы человека А431 в культуре.



Апоптоз в культуре клеток А431.

# Acta Naturae

ТОМ 4, № 3 (14), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 2012

## 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. Габиров, 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: А.И. Гордеев

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: М.Н. Морозова  
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, mmorozova@strf.ru

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, 2012

Номер подписан в печать 15 сентября 2012 г.  
Тираж 300 экз. Цена свободная.  
Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

Журнал «Acta Naturae» включен  
в базу данных PubMed.

Журнал «Acta Naturae» входит в Перечень  
ведущих периодических изданий Высшей  
аттестационной комиссии Минобрнауки России

## СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов ..... 1

### ФОРУМ

Иммунология XXI века —  
победы и достижения ..... 6

Химия жизни ..... 11

### ОБЗОРЫ

О. С. Петракова, Е. С. Черниогло, В. В. Терских,  
Е. Н. Калистратова, А. В. Васильев

Использование клеточных технологий  
в лечении патологий печени ..... 18

С. Н. Ломин, Д. М. Кривошеев, М. Ю. Стеклов,  
Д. И. Осолодкин, Г. А. Романов

Свойства рецепторов и особенности  
сигналинга цитокинов ..... 34

Ю. А. Книрель, А. П. Анисимов

**Липополисахарид чумного микроба  
*Yersinia pestis*: структура, генетика,  
биологические свойства . . . . . 49**

D. Lvovs, O. O. Фаворова, А. В. Фаворов

**Полигенный подход к исследованиям  
полигенных заболеваний . . . . . 62**

А. В. Максименко

**Кардиологические биофармацевтики  
в концепции направленного  
транспорта лекарств:  
практические результаты  
и исследовательские перспективы . . . . . 76**

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. И. Тухватулин, Е. В. Сысолятина,  
Д. В. Щепляков, Д. Ю. Логунов, М. М. Васильев,  
М. А. Юрова, М. А. Данилова, О. Ф. Петров,  
Б. С. Народицкий, G. E. Morfill, А. И. Григорьев,  
В. Е. Фортон, А. Л. Гинцбург, С. А. Ермолаева

**Низкотемпературная плазма  
вызывает р53-зависимый апоптоз  
клеток карциномы кишечника . . . . . 87**

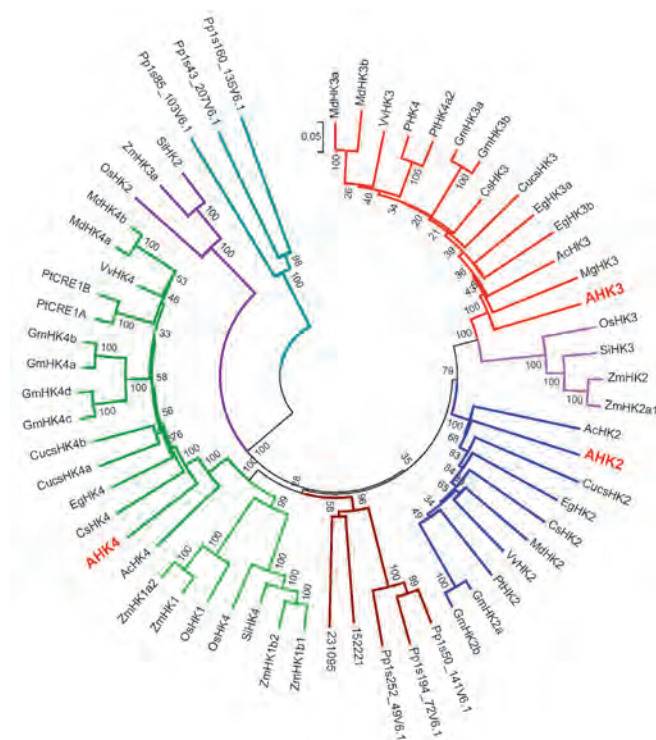
М. А. Савицкая, М. С. Вильданова,  
О. П. Кисурин-Евгеньева, Е. А. Смирнова,  
Г. Е. Онищенко

**Митохондриальный путь апоптоза  
в клетках эпидермоидной карци-  
номы человека A431 при действии  
 $\alpha$ -токоферилсукцината . . . . . 93**

Н. И. Гринева, Е. А. Духовенская,  
А. М. Тимофеев, Т. В. Ахлынина,  
Л. П. Герасимова, Т. Е. Манакова,  
Т. В. Боровкова, Д. А. Шмаров,  
Т. Г. Сарычева, Н. М. Найденова,  
А. Р. Гавричкова, Л. Ю. Колосова,  
Т. И. Колошейнова, Л. Г. Ковалева

**Экспрессия генов при пролиферации  
и дифференцировке гемопоэтических  
клеток с Ph-хромосомой *ex vivo* . . . . . 101**

**Правила для авторов . . . . . 121**



### РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Филогенетический анализ рецепторов цитокинов.  
(См. статью С.Н. Ломина и др.)

## Иммунология XXI века – победы и достижения

Этим летом в Москве прошла церемония награждения лауреатов Государственной премии Российской Федерации 2011 года в области науки и технологий. «Acta Naturae» публикует в научно-популярном разделе этого выпуска два интервью с лауреатами премии. О современном состоянии биомедицины рассказывает **Рахим Мусаевич Хаитов**, отмеченный премией за выдающиеся достижения в научном и практическом развитии отечественной иммунологии.

**– Рахим Мусаевич, в иммунологии Вы уже 40 лет. Как все началось?**

– Началось все в Государственном медицинском институте им. академика И.П. Павлова в г. Самарканде. В то время были очень популярны студенческие научные кружки, и я ходил в кружок «радиобиологии».

Тогда был расцвет этой науки и многие интересовались воздействием радиации на «живые системы». Меня заинтересовало влияние радиации на иммунитет. В то время только-только появлялись первые книги по этой теме. Одна из них – «Иммунология острого лучевого поражения» Рэма Викторовича Петрова – произвела на меня большое впечатление. В кружке я начал моделировать различные иммунные реакции: облучал животных, и по аналогии с другими заболеваниями пытался посмотреть – не появляются ли антитела против продуктов токсемии, которая возникает после облучения. Тогда понял, конечно, что никакой вакцины против лучевой болезни не создать и, наверное, наиболее правильный подход – это пересадка стволовых клеток костного мозга, тогда уже стали проводиться первые работы по стволовым клеткам. Главное, было научиться правильно подбирать донора и реципиента по генам иммунного

ответа. Я настолько этим заинтересовался, что бросил другие свои увлечения и обратил все внимание на иммунологию. К сожалению, в Самарканде в то время не было иммунологии. Не было иммунологии как самостоятельной науки и в стране, тогда СССР. Она была частью вирусологии, микробиологии, инфекционных специальностей, и ей уделялось буквально несколько часов на разных курсах и кафедрах. Тогда я решил найти институт, где мог бы проводить серьезные иммунологические исследования, и поехал в Москву – центр науки в СССР.

Я побывал в разных институтах, но темы иммунологических исследований были либо слабые, либо мне не интересны... Наконец, я оказался в Институте биофизики Минздрава СССР. В нем была лаборатория иммунологии, которой заведовал уже упомянутый выше профессор Р.В. Петров. Он в то время привез из Англии сложные методы хромосомного анализа. В нашей стране на тот момент эти методы не применялись. Профессор предложил мне наладить эти методы за 3 месяца и, если я справлюсь, меня возьмут в лабораторию. Я разработал их через две недели, меня взяли в лабораторию – и через несколько месяцев у меня были материалы, которые опубликовали не только в ведущих журналах

Советского Союза, но и за рубежом.

**– Вами проделана большая научно-исследовательская работа. Что Вы можете сказать о состоянии иммунной системы современного человека и человека начала XX века, произошли какие-то изменения?**

– Полагаю, что иммунные системы современного человека и человека XIX–XX веков принципиально не различаются. Просто меняются наши знания и представления об иммунной системе. Скажем, в XIX веке слово «иммунитет» уже существовало (термин «иммунитет» ввел Луи Пастер, слово происходит от латинского «immunitas») и обозначало невосприимчивость к инфекционным заболеваниям. Позже, в конце XIX века, люди начали понимать, что это не просто абстрактная невосприимчивость, она связана с совершенно конкретными вещами, специальными белками и антителами, которые обнаруживают бактерии или вирусы, и с клетками, которые их убивают. Иммунная система не меняется – изменяется ее реакция к внешнему миру, система реагирует на новые инфекции, на новые антигены. Есть всего две системы в организме, которые обладают памятью и способны обучаться – нервная и иммунная. Поэтому, например, если в XVIII веке не было какой-то инфекции,



Ирина Солдатович

скажем, вируса иммунодефицита человека или вируса Т-клеточного лейкоза, то естественно, что у иммунной системы не было клеток/белков, которые узнавали бы эти чужеродные элементы. А сегодня они есть, и иммунная система их уже знает.

**– По Вашей инициативе была создана иммунологическая карта России. Где и как она применяется?**

– Существует иммунный статус, который показывает состояние иммунной системы в комплексе. Иммунная система очень сложно организована: это центральные и периферические органы, огромное количество циркулирующих клеток – семейство Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, семейства моноцитов и макрофагов. Очень важно, чтобы все эти

Ражим Мусаевич Хаитов, директор Института иммунологии ФМБА России, Президент Российской ассоциации аллергологов и иммунологов, член Совета Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии, главный специалист Минздравсоцразвития России по аллергологии и иммунологии, академик РАН и РАМН, доктор медицинских наук, профессор. Дважды лауреат Государственной премии РФ и премии Правительства РФ.

клетки иммунной системы находились во взаимодействии друг с другом, подчинялись регуляции Т-клетками (я их называю «дирижерами иммунной системы»). Есть гены, которые управляют изначально всем этим иммунологическим оркестром и очень важно, чтобы у каждого человека все показатели иммунной системы были в норме. Мы задались вопросом: а одинаковы ли параметры иммунной системы у людей, живущих в разных регионах страны?

Например, завтра может приехать человек из Заполярья или спуститься с гор, прийти в институт и сказать: «Вы знаете, я болею, вы проверите у меня иммунную систему?». А если в регионе, откуда он приехал, и на новом месте разные показатели иммунной системы? Для оценки иммунного статуса мы открыли порядка 120 лабораторий клинической иммунологии в разных регионах страны. Оказалось, что показатели отличаются, но это норма, а не па-



тология. В одном месте больше Т-лимфоцитов, в другом – меньше, в третьем, наоборот, больше В-лимфоцитов. Различия, конечно, небольшие, но они есть и важно знать показатели данного региона, чтобы человек знал свою норму иммунного статуса.

**– Как известно, легче предупредить заболевание, чем его лечить. Какие меры предпринимает медицина по предупреждению заболеваний иммунной системы?**

– Существует национальный календарь прививок, в который входит энное количество вакцин. И если детям делать прививки, а как известно, иммунная система располагает памятью, то у них возникает невосприимчивость к этим заболеваниям. Это одна из форм борьбы с инфекцией. Иммунная система сама может болеть – быть ненормальной, патологической генетически, т.е. ребенок появляется на свет с врожденными дефектами иммунной системы. Также иммунная система может быть подавлена облучением, ожогами, травмами, очень сильным стрессом, голоданием, сильным воздействием вредных экологических факторов. И если иммунная система постоянно подавлена, то на этом фоне возникают самые разные заболевания – аутоиммунные, опухолевые и др. Иммунная система связана со всеми прочими системами организма, поэтому ее патологии часто приводят к патологиям во многих других системах организма, поэтому надо проверять состояние своей иммунной системы.

**– Как проверить?**

– Если вы почувствовали, что у вас с ней не порядок, надо что-то предпринимать. А какие первые признаки? В первую очередь, частые заболевания дыхательных путей и другие симптомы. В этом случае надо обращаться к врачу-иммунологу для определения иммунного статуса. Если

он подавлен, то назначаются иммуномодуляторы для того, чтобы восстановить состояние иммунной системы. Мы проделали значительную работу – выявили регионы, где большие группы населения страдали иммунодефицитом. В них мы проводили профилактическую иммунотерапию. Оказалось, что если восстанавливать показатели иммунной системы, то это резко снизит заболеваемость.

**– Рахим Мусаевич, не может ли применение иммуномодуляторов пойти во вред организму?**

– Если у вас нормальная иммунная система, иммуномодуляторы принимать не надо. Одну свою статью я так и назвал: «Я никогда не принимал иммуномодуляторы». Почему? Я проверяю свою иммунную систему раз в год, и если она в порядке, то зачем прибегать к лекарствам?

**– То есть не стоит перестраховываться?**

– Если иммунная система в порядке, то не надо, так как это чревато аутоиммунными заболеваниями, может вызвать аллергию – да все, что угодно! Другое дело, если врач – я подчеркиваю, не самоучка, а врач-иммунолог, диагностировал у вас иммунную недостаточность, в этом случае надо лечиться иммуномодуляторами.

**– А по поводу аллергических заболеваний – почему сейчас так много людей им подвержены? Многие заболевают уже в зрелом возрасте...**

– Вы правы, аллергических заболеваний сейчас стало гораздо больше. В начале прошлого века их было всего несколько процентов, а сегодня в каждой развитой стране аллергией страдают 25–30%. У нас в России есть регионы, где страдают по 15, а в некоторых и по 30% населения. Это очень высокие показатели! Если помните, в этом году весной было очень много аллергических за-

болеваний, весна была ранняя, теплая и когда появились «зеленые облака», то многие подумали, что разразилась экологическая катастрофа. На самом деле очень обильно цвели деревья: береза, ольха, орешник. Их пыльца вызывает так называемую «сезонную аллергию». В наш институт приходило множество больных с разными признаками аллергических заболеваний. Некоторые раньше никогда не болели аллергией. Тогда была первая волна, сейчас началась вторая – цветут другие растения, травы. А осенью будет третья волна.

**– И количество больных аллергией увеличивается...**

– Дело в том, что многое меняется в окружающем мире. Прежде было гораздо больше инфекционных заболеваний, а аллергических меньше. Раньше иммунная система постоянно боролась с инфекциями, а сейчас мы защищаем от них детей с раннего возраста. Место инфекции стало вакантным, и система переключилась на аллергены, которые, в принципе, не инфекции. Это, казалось бы, безобидные белки, вызывают неприятные, подчас очень опасные аллергические реакции. Кроме того, сейчас появилось много провокаторов аллергии – поллютанты, выхлопные газы автомобилей, экологические факторы. Многие из них не являются аллергенами, но провоцируют развитие аллергии.

Сейчас постоянно идет выпуск новых лекарств. Большинство из них – тоже сильные аллергены, так что лекарственная аллергия – одна из важнейших проблем современности. Бытует пищевая аллергия: раньше люди питались традиционной пищей, а сейчас появилось много новых продуктов питания. То есть фактически сегодня нет такого вещества, химического соединения, которые можно назвать безаллергенными.

– При этом, Рахим Мусаевич, у одного человека возникает аллергия, а у другого – нет...

– Почему это происходит избирательно, никто не знает. Ученым известно как возникает аллергия, что ее вызывает и что такое аллергены; понятны механизмы, по которым развиваются аллергии, как блокировать их развитие, но почему у одного возникает аллергия, предположим, на яичный белок, а у другого – нет, никто не знает. Я полагаю, что в этом виноваты гены. Например, один человек имеет гены, которые отвечают за устойчивость к яичному белку, а у другого есть ген, который, наоборот, делает его чувствительным и способствует развитию аллергической реакции. Вероятно, эти гены просто надо найти, и тогда проблема с аллергиями будет успешно решена.

– Вашей группой разработаны лекарства от аллергии. Насколько Вы довольны результатами? Есть ли у препаратов какие-либо побочные действия?

– Да, в нашем институте разработали лекарства против аллергии – аллерготропины, и они гораздо эффективнее, чем просто аллергены, которые используют для лечения аллергии. Особых побочных эффектов при клинических испытаниях мы не наблюдали. Сейчас все эти препараты мы отдали на производство и ожидаем, когда их зарегистрируют и начнут производить.

– И когда это произойдет?

– Это уже зависит от предприятия, которое должно все сделать для того, чтобы правильно оформить документацию и получить разрешение на производство и применение.

– Как они действуют?

– Наши препараты, во-первых, подавляют образование аллергических антител, а во-вторых, вызывают выработку защитных антител, которые блокируют ал-

лергические реакции, т.е. воздействуя специальными молекулами на разные точки в механизме развития аллергии, в конечном итоге мы пришли к разработке практически значимых препаратов.

– В чем их отличие от существующих препаратов для лечения аллергии?

– Препараты, существующие сегодня – антигистаминные препараты первого, второго и третьего поколений, лечат аллергию условно. Они подавляют аллергическую реакцию, и если вы перестанете принимать препараты, аллергия снова вас атакует. Другой вид лечения – аллерген-специфическая иммунотерапия. В чем она заключается? У больного определяют причинный аллерген, т.е. аллерген, вызывающий заболевание, и его очищенную форму очень долго вводят больному, по нарастающей, увеличивая дозу. Курс длится 2–3 месяца и его надо повторять несколько лет. В таком случае иногда возможно даже полное излечение от аллергии, но это тяжело, долго и чревато осложнениями. Разработанные нами препараты снижают длительность лечения до двух недель и 15-ти инъекций, также понижается более чем в два раза потребность в фармакотерапии.

– Насколько такое лечение будет доступно больным по стоимости?

– Не мы будем определять. Не думаю, что дороже, чем те аллергены, которые применяются для лечения.

– В Вашем институте ведутся разработки вакцины против СПИДа. На какой они стадии?

– Проблема, на самом деле, непростая – вакцину очень сложно получить, потому что вирус крайне быстро мутирует. И у каждого больного может образоваться новый вариант вируса. Поэтому многие считают, что поиск вакцины – тупиковый путь. Но так думают

далеко не все! Дело в том, что даже у вируса СПИДа есть участки, которые называются консервативными, они не подвергаются мутациям, поэтому определенные белки или их фрагменты остаются неизменными. Остается надежда на то, что на основе этих белков удастся сделать вакцину. Весь мир над этим работает, но пока не очень успешно. Некоторого результата удалось добиться только одной американо-французской группе – две их вакцины снижают заражаемость на 35%.

Я же уверен, что готовить вакцину нужно иным способом: брать консервативные антигены и соединять их с иммуностимуляторами, это обеспечит сильный иммунитет. Поскольку сейчас огромное количество зараженных людей, то вакцины от СПИДа должны быть не только профилактическими, но и терапевтическими. ВИЧ поражает иммунитет, а при пораженном иммунитете никакая вакцина не будет работать. Поэтому мы надеемся, что иммуномодулирующая прививка будет способствовать тому, что вакцина сможет оказать терапевтическое действие даже у инфицированных людей. Может быть, даже у больных. Наша группа разработала подобную вакцину, она называется «Вичрепол».

– Ее составляющие?

– Мы создали химерный белок генно-инженерными методами. В этом белке есть фрагменты разных белков вируса – поверхностные и внутренние, не подверженные мутациям. Сам по себе этот белок не вызывает иммунологические реакции, т.е. не может быть вакциной, поэтому его связали с иммуностимулятором. В таком виде он проявил очень сильные иммуностимулирующие свойства. Были успешно проведены обширные доклинические исследования и первая фаза испытаний на добровольцах. Сейчас

мы готовимся ко второй фазе, более расширенной.

**– Возникает вопрос: есть ли сложности при проведении клинических исследований? Находятся добровольцы?**

– Первую фазу надо делать исключительно на здоровых людях, чтобы убедиться, что вакцина безвредна и на самом деле вызывает две формы иммунного ответа: и антитела образуются, и киллеры, которые убивают вирусинфицированные клетки. Вторая фаза тоже будет проводиться на волонтерах. Поиск добровольцев – очень тяжелая проблема. Здоровые люди зачастую не хотят вакцинироваться, тем не менее, есть энтузиасты, особенно среди когорт, которые относятся к сексуальным меньшинствам.

**– А на какой фазе испытания проходят на больных людях?**

– Если вторая фаза пройдет успешно, нам разрешат перейти на следующую стадию и частично проводить испытания на инфицированных.

**– Если вакцина все же будет создана, то кто ее получит в первую очередь?**

– Каким образом победили оспу? Всех провакцинировали эффективной вакциной, и оспы не стало. Есть вакцина от гриппа, тоже достаточно эффективная, не такая, как от оспы, защищает на 70–80%. Эпидемии гриппа до сих пор появляются, и не только потому, что вирус мутирует. Дело в том, что вакцинируют лишь часть населения, «группу риска» – тех, чьи шансы заболеть выше, чем у других: школьников, детсадовцев, врачей, учителей, водителей общественного транспорта. Если бы вообще всех прививали, может быть, удалось бы справиться и с гриппом. Поэтому, если будет создана вакцина от СПИДа, учитывая колоссальный масштаб эпидемии, конечно, было бы оптимальным, если бы

вакцинировали всех. Сегодня распространено много венерических заболеваний – сифилис, гонорея. Все они радикально лечатся, с результатом 100%, но, тем не менее, постоянно возникают вспышки этих заболеваний. Почему? Потому что нет вакцины. Только вакцина способна глобально победить болезнь. Очень важно, что сама по себе вакцинация спасла гораздо больше жизней, чем вся остальная медицина в целом. Вообще вся. Сотни миллионов людей спасены благодаря вакцинации.

**– По Вашему мнению, Рахим Мусаевич, сколько еще времени потребуется для создания вакцины?**

– Это трудно прогнозировать, потому что за второй фазой испытаний последует третья, за третьей – четвертая. Латентный период у вируса СПИДа может длиться годами – от 2 до 10–20 лет. Это очень сложная инфекция. Прогнозы делать практически невозможно, надо работать.

**– Государство выделяет достаточно средств для проведения исследований?**

– Было очень хорошее постановление Правительства РФ по борьбе с инфекционными болезнями, в том числе и со СПИДом. На нашу программу выделили деньги, поэтому мы и создали вакцину. Но сейчас это постановление перестало действовать.

**– Уровень отечественных разработок в чем-то превосходит зарубежные?**

– Я бы сказал так: если говорить в целом, уровень биомедицины отстает по сравнению с западными странами: США, Западной Европой и т.д. В России есть прорывы. Скажем, мы очень многое сделали по изучению иммунного статуса. Никто в мире этим не занимался и не занимается. У нас много разработок по иммуномодуляторам – десятки препаратов, а на Западе лишь несколько. По вакцинам про-

тив СПИДа тоже большой прорыв: мы впервые разработали вакцины, в которые встроены иммуностимуляторы. В мире таких вакцин нет. В международном издании AIDS Vaccine Blueprint, которое каждый год публикует перспективные вакцины, наша вакцина упоминается в первой десятке.

В общем-то, много чего интересного делается – не только в иммунологии, но и в других направлениях биомедицины, генетики, молекулярной генетики, биохимии.

**– За последние 10 лет в России и по всему миру заболеваемость СПИДом увеличилась?**

– В России, к сожалению, растет, причем существенно. В некоторых странах, таких, как США, Канада, страны Западной Европы, Уганда, прирост удалось остановить профилактическими мерами.

**– Вы – научный руководитель. Хотелось бы узнать, кого Вы можете отметить из своих подопечных?**

– Под моим руководством много людей защитили кандидатские и докторские диссертации. Многие из них стали профессорами, некоторые – даже членами Академии наук, многие – лауреатами премии Правительства, Государственной премии. Имена я не буду называть. Я их всех уважаю, они все хорошие ребята. Вот назову одного-двух, а другие будут ревновать – это некрасиво, некорректно.

**– Как Вы представляете себе дальнейший путь развития иммунологии?**

– У нас в институте очень много идей, особенно в области молекулярной иммунологии, наноиммунологии, и сейчас нам нужен приток молодежи, а все остальное у нас есть – хорошее финансирование, прекрасное оборудование. ●

**Беседовала Мария Морозова**

## Химия жизни

О своих открытиях и дальнейших научных планах рассказывает **Борис Александрович Трофимов**, удостоенный Государственной премии РФ за определяющий вклад в разработку новых методологий тонкого органического синтеза для создания инновационных лекарственных средств и современных материалов, в том числе специального назначения.

– Борис Александрович, Вы – автор более 500 изобретений, какое из них для Вас самое дорогое и значимое?

– Точнее не автор, а соавтор. Изобретателей-одиночек сейчас осталось очень мало. Это нечто реликтовое. В науке сегодня работают, как правило, коллективно и любой сколько-нибудь серьезный научный результат – это обычно плод объединенных усилий специалистов разного профиля. Практически значимые идеи возникают чаще всего на стыке наук, поэтому и большинство наших изобретений носят междисциплинарный характер, являются результатом усилий моих ближайших учеников, сотрудников и коллег из смежных наук и технологий.

Какое из наших изобретений является для меня самым дорогим и значимым? Ответить на этот вопрос трудно, как вероятно, нелегко отцу большого семейства назвать любимое чадо. Тем более, что в данном случае отношение к тем или иным изобретениям, естественно, менялось со временем. Не все изобретения, казавшиеся важными и значимыми 20 или даже 40 лет назад, сейчас воспринимаются с тем же энтузиазмом. И, наоборот, некоторые, тогда на первый взгляд рядовые находки оказываются сейчас некими необработанными самородками. Естественно, мне более близки наши изобретения последних лет,



Борис Александрович Трофимов, директор Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, доктор химических наук, профессор, академик РАН. Лауреат премии имени А.М. Бутлерова, Государственной премии РФ.

как наиболее отвечающие потребностям современности, и все-таки несколько изобретений, на мой взгляд, являются действительно ключевыми, базовыми, давшими старт новым направлениям в химической науке и химической тех-

нологии и ставшими своего рода инкубатором новых идей и, следовательно, новых изобретений. Это, прежде всего, синтез пирролов из кетонов и ацетиленов, прямой бесхлорный синтез фосфорорганических соединений из элементного

фосфора и того же ацетилен и его производных, синтез дивинилхалькогенидов (например, дивинилсульфидов, дивинилселенидов, дивинилтеллуридов) непосредственно из элементарных халькогенов или их простейших соединений, таких, как сероводород, опять-таки с помощью ацетилен или его производных. К таким же базовым изобретениям я бы отнес способ получения «якорных» эпоксидов типа «Винилокса», на основе которых получены десятки новых марок эпоксидных смол со специальными техническими характеристиками.

– Синтез пирролов из кетонов и ацетилен назван **Вашим именем – реакцией Трофимова** и вошел во многие справочники, в том числе и в химико-технологическую энциклопедию США. Расскажите, пожалуйста, подробнее про реакцию и ее применение.

– На сегодня описаны десятки синтезов пирролов, однако, либо для них требуются дорогие и сложные исходные вещества, либо они включают несколько реакций (химики называют их многостадийными), либо выходы пирролов невелики, либо эти синтезы недостаточно универсальны, т.е. позволяют получать лишь ограниченное число производных пиррола. Наша реакция (см. схему), открытая в начале 1970-х годов (совместно с м.н.с. А.И. Михалевой, сегодня – профессором), требует для синтеза пирролов только кетоны – один из самых доступных и дешевых классов органических соединений, гидроксилламин и аце-

тилен – еще более дешевые промышленные продукты.

Например, всем известный ацетон (простейший кетон), взаимодействуя с гидроксилламином и ацетиленом в присутствии очень доступной суперосновной каталитической системы, состоящей из гидроксида калия и диметилсульфоксида (применяется в медицине), при небольшом нагревании образует альфа-метилпиррол и его N-винильное производное. Кстати, N-винилпирролы до открытия нашей реакции оставались вообще неизвестным, хотя и очень перспективным классом пиррольных соединений.

Пиррол и его производные – фундаментальные структуры важнейших жизнеобеспечивающих систем – хлорофилла, гемоглобина, природных антибиотиков, феромонов насекомых, многих лекарственных препаратов. Наш синтез пирролов сейчас находит все большее применение для получения лекарственных средств, биосенсоров, светочувствительных металлокомплексов для диагностики и терапии онкологических заболеваний, молекулярных систем для искусственного фотосинтеза, а также материалов для новых технологий (органических полупроводников, электро- и фотохромных материалов, оптоэлектронных устройств). На основе открытой нами реакции разработана первая в мире технология получения синтетического индола из циклогексанона и ацетилен. Проектируется опытно-промышленное

производство индола мощностью 200 тонн в год. Наша технология позволяет одновременно получать тетрагидроиндол (сейчас 1 грамм этого соединения стоит более 200 евро), его винильное производное и N-винилиндол – ценные продукты для синтеза лекарственных препаратов и уникальные мономеры, производство которых нигде в мире еще не налажено.

Индол находит широкое применение в синтезе лекарственных препаратов и важных биологически активных соединений, управляющих жизнедеятельностью теплокровных. Индол – основной структурный элемент таких важных для живой природы соединений, как триптофан (незаменимая аминокислота), серотонин (один из основных нейромедиаторов, «гормон счастья»), мелатонин (гормон, управляющий суточным ритмом человека). Его структура входит в состав других гормонов и галлюциногенов. Хорошо известны такие индольные лекарственные средства, как индопан, индометацин (противовоспалительные, жаропонижающие и анальгезирующие средства), резерпин (транквилизатор), стрихнин (стимулятор нервной системы). Находит широкое применение в практике индольный стимулятор роста растений – гетероауксин (β-индолилуксусная кислота).

– Почему все-таки Ваше внимание ученого-химика привлек ацетилен?

– Действительно, нами разработаны и развиты научные принципы оригинальных методов органического и элементоорганического синтеза на основе ацетилен. Ацетилен – простейший высокоэнергетический углеводород, обязательный продукт газо-, угле- и нефтепереработки, фундаментальный «кирпичик» органической материи. Астрономы обнаружили его даже в межзвездном пространстве. Он традиционно ис-

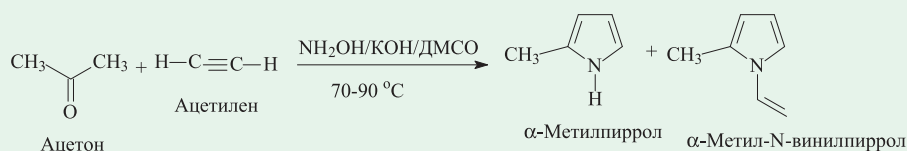


Схема. Синтез α-метилпиррола и α-метил-N-винилпиррола из ацетона и ацетилен.

пользовался и используется в промышленном и тонком органическом синтезе как исходное сырье. В XX веке на его основе получали все основные химические продукты. Сейчас он вытеснен пока еще более дешевыми нефтяными этиленом и пропиленом. Однако в связи с неуклонным удорожанием нефти и газа предсказывается его возврат в химическую промышленность в ближайшем будущем, так как его можно производить и из угля, которого человечеству хватит еще на сотни лет. В тонком органическом синтезе, направленном на получение сложных наукоемких молекул – биологически активных веществ, витаминов, лекарств и агропрепаратов, а также высокотехнологичных материалов, ацетилен только укрепляет свои позиции год от года, так как он обеспечивает кратчайшие и простейшие пути к веществам заданной структуры.

В начале 1960-х годов, когда создавалось Сибирское отделение АН СССР, член-корреспондент АН СССР Михаил Федорович Шостаковский, ближайший ученик выдающегося русского химика-органика академика Алексея Еврафовича Фаворского, перенес в Иркутский институт органической химии СО АН СССР тематику и традиции школы своего великого учителя. Так в Восточной Сибири появилась и стала быстро развиваться новая молодая ветвь школы академика Фаворского, научные интересы которого особо фокусировались на химии ацетилена и тонком органическом синтезе. При этом основное внимание всегда уделялось получению и модификации биологически активных веществ – терпеноидов, стероидов, алкалоидов, сахаров. Позже за результативное развитие научного наследия академика Фаворского Президиум РАН присвоил нашему институту имя этого выдающегося основателя химии

ацетилена. Я и мои ученики гордимся тем, что принадлежим к его школе.

**– Вы создали методологии тонкого органического синтеза, куда входят различные химические соединения: лекарственные препараты, красители, химические добавки, пестициды, ПАВ, синтетические ферменты. Какие лекарственные препараты, полученные методом тонкого органического синтеза, Вы можете отметить?**

– Точнее, мы принципиально дополнили методологию тонкого органического синтеза. Мы открыли ряд новых реакций и обосновали новые методологические принципы, например, применение суперосновных каталитических сред, реагентов и катализаторов. В результате появились ранее неизвестные возможности для получения полезных веществ. Мы, как и другие химики-синтетики, открываем новые законы образования химических связей, чтобы направленно и наиболее просто конструировать нужные людям высокотехнологичные материалы, инновационные вещества и лекарства, без которых невозможна сегодняшняя цивилизация. Неслучайно, недавняя Нобелевская премия по химии присуждена за методы образования углерод-углеродной связи путем замещения атомов – чаще всего галогенов – в присутствии благородных металлов. Наши методы базируются на другом типе реакций – реакциях присоединения, которые ускоряются природными ионами (натрия, калия, гидроксид-анион) или просто квантами света, поэтому, как правило, они не дают отходов, т.е. в наибольшей степени отвечают принципам зеленой химии, являются экологичными, энерго- и ресурсосберегающими (атом-экономными, как сейчас говорят химики).

Все это в полной мере относится и к новому типу реакций,

открытому и развитому моими коллегами академиками В.Н. Чарушиным и О.Н. Чупахиным, лауреатами той же Государственной премии. Их реакции – это замещение водорода в ароматическом или гетероароматическом кольце. Выделяющийся водород не загрязняет окружающую среду и может быть использован в качестве самого «чистого» энергоносителя и химического реагента. Эта новая химия позволила моим друзьям и коллегам завершить работы по регистрации и внедрению в медицинскую практику нового противоопухолевого препарата «Лизомустина», который сейчас успешно применяется в клиниках. Ими разработаны новые промышленные способы синтеза антибактериальных фторхинолоновых антибиотиков («Пефлоксацина» и «Левофлоксацина»). Недавно завершены доклинические испытания созданного ими оригинального противовирусного препарата «Триазавирина», способного защищать нас (на 90%) от ряда опасных вирусных инфекций, например, гриппа, вызываемого вирусами H5N1 и H1N1.

В нашем институте на базе N-винилимидазола, получаемого прямым винилированием одного из жизненно важных гетероциклов имидазола ацетиленом, разработан высокоэффективный антидот окиси углерода «Ацизол», эффективно защищающий человека от отравления этим коварным газом и другими продуктами горения. «Ацизол» включен в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств РФ. Его выпуск налажен фармацевтической фирмой «МАКИЗ Фарма» и контролируется фирмой ЗАО «Ацизол» (Москва). Сейчас, когда во всем мире все больше пожаров, это лекарство становится особо актуальным. В последние годы у «Ацизола» выявили еще целый ряд ценных лекарствен-

ных свойств: он оказался не только уникальным антигипоксантом, но и активным гепатопротектором на уровне лучших известных препаратов, а также антиаритмическим средством. Он позволяет вылечить особо упорные и опасные пневмонии и... даже снимает похмельный синдром.

Разработанный в институте высокоэффективный антисептик «Анавидин» выпускается сейчас специально созданной под него фирмой на установке мощностью 100 тонн в год. Динамично развивающаяся российская фармацевтическая компания «Фармасинтез» через несколько месяцев обещает вывести на рынок новый противотуберкулезный препарат «Перхлозон», активный против резистентных микобактерий. Этот оригинальный брендовый препарат «Перхлозон» разрабатывался в нашем институте в течение нескольких десятилетий (начиная с первого синтеза этой молекулы в лаборатории проф. Г.Г. Скворцовой) и, конечно, тоже является продуктом тонкого органического синтеза. Добавлю, что за последние десятилетия в фармацевтическую практику не введено ни одного противотуберкулезного препарата, способного сколь-нибудь эффективно противостоять новым агрессивным штаммам туберкулезных бактерий.

**– Борис Александрович, в Вашем институте разработаны новые экологические методы синтеза органических соединений фосфора и халькогенов. Какие лекарства изобретены на их основе?**

– Синтез лекарств, но чаще всего их прекурсоров (соединений-предшественников) и молекул – кандидатов в лекарства – важное направление фундаментальных исследований нашего института. Точнее, прикладное ответвление этих исследований. А главная наша цель – разработка новых методологий синтеза сложных ор-

ганических молекул вообще и выявление связи между строением синтезированных соединений и их полезными свойствами с тем, чтобы еще более направленно и экономично синтезировать то, что особенно нужно в настоящее время людям. А людям нужны не только лекарства. Прежде всего – здоровье. И лучше, чтобы человек был здоров без лекарств. Для этого нужно меньше загрязнять среду обитания, поскольку многие сегодняшние болезни – результат нашего безумного и даже преступного отношения к природе. Разработанные нами методы синтеза фосфор- и халькогенорганических соединений экологически более чистые, чем существующие, например, наша бесхлорная технология получения фосфорорганических соединений. А это значит – меньше вредного воздействия на здоровье человека, ему меньше требуется лекарств. Хотя, например, на основе нашего дивинилсульфида (продукт присоединения сероводорода к ацетилену) созданы высокоэффективные гемосорбенты для гемодиализа, которые используются в клинической практике. Первый оригинальный отечественный пестицид «Виндидат», созданный в нашем институте на основе ацетилена и соединений серы, выпускался в СССР на пилотной установке и до сих пор используется для защиты помещений и в пищевой промышленности.

**– Какие лекарственные препараты, полученные методом функционализации гетероциклов, уже запущены в производство? Расскажите о них, пожалуйста.**

– Функционализация гетероциклов уже давно является хорошо отработанным традиционным приемом в синтезе самых разнообразных лекарств. Это относится в полной мере и к лекарствам, синтезированным моими коллегам-

ми академиками О.Н. Чупахиным и В.Н. Чарушиным, а также к лекарствам, синтезированным в нашем институте. Например, препарат «Ацизол», о котором мы уже говорили, представляет собой широко распространенный в природе гетероцикл, функционализированный винильной группой прямой реакцией с ацетиленом. Новый противотуберкулезный препарат «Перхлозон», созданный совместно нашим институтом, институтом фтизиопульмонологии (Санкт-Петербург) и компанией «Фармасинтез», – это тоже очень распространенный гетероцикл (пиридин), в который введена через двойную связь тиосемикарбазидная функция. Между прочим, пиридины можно легко получить в одну стадию из ацетилена и простейших азотсодержащих соединений – аммиака, аминов, гидросиламина и др. Кстати, мы разработали удобный и простой метод получения пиридинов как раз из гидросиламина, ацетилена и кетонов. Реакция проходит в водно-щелочной среде, при этом не требуется катализировать реакцию тяжелыми или благородными металлами, что обычно для таких синтезов.

Новая группа функционализированных пирролов, содержащих ароматические и гетероароматические заместители с различными функциональными группами, легко получаемых по нашей реакции, оказалась еще одним перспективным классом противотуберкулезных препаратов. На этот класс сейчас обратили внимание многие химики-синтетики, связанные с фармацевтическими фирмами. Итальянские ученые уже нашли несколько препаратов-лидеров. Некоторые из них, видимо, уже скоро появятся на аптечных полках. Мы также работаем сейчас в этом направлении с фармацевтической компанией «Фармасинтез».

Пирролы с несколькими бензольными заместителями и функциональными группами, которые также можно получать из кетонов и ацетилена через кетоксимы, сокращая традиционные синтезы на несколько сложных и трудоемких стадий, являются основой одного из самых продаваемых в настоящее время препаратов – аторвастатина, известного под торговым названием «Липримар». Это известный гиполипидемик, т.е. препарат, снижающий содержание холестерина в крови.

Недавно мы с д.х.н. Л.Н. Собениной открыли новый простой путь введения самых разнообразных функций в пирролы и индолы, используя ацетиленовые кетоны, кислоты или их эфиры. Функционализированный ацетиленовый заместитель вводится в пиррольное или индольное кольцо при контакте реагентов на активных поверхностях, например при растирании на оксиде алюминия при комнатной температуре на воздухе. До сих пор такие реакции (их называют кросс-сочетанием) обычно проводят в присутствии палладиевых катализаторов и ряда вспомогательных реагентов в инертной атмосфере при нагревании. Как я уже упоминал, разработка реакций кросс-сочетания ацетиленов с галогенаренами на палладиевых катализаторах была отмечена Нобелевской премией (Р. Хек, Е. Негиши, А. Судзуки, 2010). Интересно, что другая Нобелевская премия присуждена за реакции на активных поверхностях (Г. Эртль, 2007).

Многие современные лекарства относятся к классу функционализированных имидазолов. Поэтому направленное введение нужных функциональных групп в имидазольное кольцо всегда остается актуальной задачей синтетиков и фармацевтов. Химия ацетилена и здесь пришла нам на помощь. В нашей лаборатории уже в те-

чение ряда лет систематически разрабатывается оригинальная, общая и эффективная стратегия функционализации имидазолов через цвиттер-ионные интермедиаты – аддукты имидазолов с цианацетиленами. Эта стратегия позволяет упростить синтезы некоторых известных лекарств или их прекурсоров, а также синтезировать новые перспективные лекарственные препараты.

**– За какое открытие Вы получили премию А.М. Бутлерова?**

Эту премию мы получили с моей ученицей д.х.н. А.Г. Малькиной за цикл работ по синтезу функционализированных иминодигидрофуранов – ключевых структурных элементов и аналогов аскорбиновой и пеницилловой кислот, природных сердечных гликозидов и некоторых синтетических препаратов, обладающих противораковой, противоязвенной, противоаллергической и анти-ВИЧ-активностью. Производные иминодигидрофуранов находят применение как нестероидные противовоспалительные средства и анальгетики.

Мы разработали простые и оригинальные методы синтеза таких соединений на основе цианацетиленовых спиртов, которые, в свою очередь, стали доступными благодаря нашим систематическим исследованиям. Сегодня они вошли в химию ацетилена и тонкий органический синтез на его основе как удобные универсальные реагенты. Кстати, академик А.Е. Фаворский, к школе которого мы принадлежим, был ближайшим учеником А.М. Бутлерова. Бутлеров и поручил своему аспиранту Фаворскому развивать ацетиленовую тематику. Таким образом, правильнее говорить, что наша химия ацетилена – это развитие традиций, подходов и методов классической русской школы Бутлерова – Фаворского.

**– Борис Александрович, хочется спросить о международном сотрудничестве – есть ли совместные проекты по выпуску лекарств?**

– Мы сотрудничали и сотрудничаем со многими зарубежными университетами и фирмами США, Англии, Германии, Франции, Испании, Нидерландов, Канады, Португалии, Китая, Южной Кореи, Тайваня. Однако это сотрудничество направлено главным образом на создание материалов для современных технологий, в том числе наноструктурированных – органических полупроводников, химических источников тока, высокочувствительных сенсоров, электрохромных материалов для тонкопленочных гибких дисплеев, полевых транзисторов и т.п. Международные фармацевтические фирмы предпочитают вести переговоры о покупке наших патентов или лицензий на лекарственные препараты (вести с нами совместные проекты им мешает «неповоротливость» нашей бюрократии). До недавнего времени академический институт не имел права продавать готовые разработки. Сейчас как будто в этом направлении что-то проясняется, но все еще много непонятного.

Мы участвуем в международном проекте Европейского экономического сообщества по созданию нового цинк-полимерного аккумулятора на ионных жидкостях. Кроме нас, в проекте принимают участие научные коллективы университетов и фирм Англии, Франции, Испании, Канады, Португалии, Голландии. Аккумулятор предназначен для электромобилей, т.е. в конечном счете для оздоровления окружающей среды и, следовательно, человечества. Он напрямую не связан с синтезом лекарств, но направлен на снижение их потребления. А это, по-моему, не менее важно,



чем лечить людей, задыхающихся в ядовитых выхлопах автомобилей, самолетов, теплоходов и тепловозов.

Пока еще мало кто задумывается над тем, что при сжигании 1 тонны углерода расходуется еще около 3 тонн кислорода, который не успевает восполняться из-за хищнической вырубке лесов. Мы все больше превращаем планету в искусственную газовую камеру, особенно это относится к мегаполисам.

**– Какие работы своих учеников Вы можете отметить?**

– Мне повезло в жизни. У меня много учеников, причем хороших и способных. Среди них – 26 профессоров и докторов наук, более 70 кандидатов наук. Особенно радуют молодые и талантливые, которые сегодня окружают меня. Это молодой доктор наук Елена Юрьевна Шмидт – мы с ней недавно открыли новую фундаментальную реакцию присоединения кетонов к ацетиленам в присутствии супероснований (эта реакция имеет все шансы в будущем тоже стать именной). Это молодой доктор наук Андрей Викторович Иванов, год назад защитивший докторскую диссертацию в 30 лет (сейчас, возможно, самый молодой доктор в Сибирском отделении РАН). Он уже один из моих заместителей по науке, занимается инновациями и молодежной

политикой. Среди моих молодых учеников и защитившая докторскую диссертацию в этом году и уже получившая утверждение – Олеся Александровна Шемякина, ей 32. Один из самых молодых моих учеников, Александр Викторович Артемьев, сейчас проводит прорывные исследования по синтезу селенофосфорорганических соединений при консультации проф. Н.К. Гусаровой. Мы надеемся, что он станет доктором наук лет в 27–28. Так что, есть кому развивать нашу химию дальше.

**– Борис Александрович, как Вам удается совмещать научную и административную работу?**

– О, это очень легко! Когда у тебя есть надежные опытные заместители, проверенные годами «смутного времени» и лихолетья, когда у тебя есть высококвалифицированные помощники – референты, секретари, ученые секретари, понимающие тебя с полуслова, в совершенстве владеющие несколькими языками, которые с компьютером на «ты» и печатают со скоростью звука, а главное – очень грамотно (что сейчас большая редкость). А именно такие у меня заместители и помощники. С ними я отрываю не так много времени от науки, как мне пришлось бы это делать без них. Благодаря им я каждый день имею возможность

бывать в лаборатории и вникать в детали почти каждого важного эксперимента. Для меня день потерян, если я не поговорю с сотрудниками о делах прямо у вытяжного шкафа.

А если совсем серьезно, то совмещать научную и административную работу сейчас становится все труднее и труднее. Бюрократический террор усиливается с каждым днем. Количество документов – анкет, запросов, отчетов, справок и т.д. и т.п., изобретаются новые, все более изощренные и усложненные формы, которые нужно было исполнить уже вчера или даже позавчера, – нарастает экспоненциально. На самом деле, все это очень грустно и серьезно. Это заставляет специалистов, часто очень высокого уровня, заниматься совершенно никчемной работой (это все равно что забивать гвозди микроскопом). Такой объем документов ни один чиновничий аппарат, даже такой чудовищный, как наш, просто не в состоянии переработать. Если не остановится этот всероссийский бумажный потоп, то вскоре остановится – утонет – вся наша наука.

Все-таки хотелось бы закончить наш разговор на оптимистической ноте. Уверен, что бумажный потоп все-таки остановится, ведь прекратился даже всемирный потоп. ●

**Беседовала Мария Морозова**

III МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**22 - 24 НОЯБРЯ 2012**

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) УНИВЕРСИТЕТ, Г. КАЗАНЬ

# ПОСТГЕНОМНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА В БИОЛОГИИ, ЛАБОРАТОРНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

**ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ ВКЛЮЧАЕТ  
СЛЕДУЮЩИЕ НАПРАВЛЕНИЯ:**

- ГЕНОМИКА
- ПРОТЕОМИКА
- БИОИНФОРМАТИКА
- КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
- НАНОТЕХНОЛОГИИ
- БИОМАРКЕРЫ
- ПЕРСОНИФИЦИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА
- РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ОРГАНИЗАТОРЫ:

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА РОССИИ  
ООО «ПАРК-МЕДИА»

УЧРЕДИТЕЛИ:

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО

Г. КАЗАНЬ, ТЕЛ.: +7 (960)055-62-72, POSTGENOM@GMAIL.COM Г. МОСКВА, ТЕЛ.: +7 (495) 930-88-50, INFO@POSTGENOM.RU WWW.POSTGENOM.RU

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ПАРТНЕРЫ



УДК 576

# Использование клеточных технологий в лечении патологий печени

О. С. Петракова<sup>1,2\*</sup>, Е. С. Черниогло<sup>1</sup>, В. В. Терских<sup>1</sup>, Е. Н. Калистратова<sup>2</sup>, А. В. Васильев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

<sup>2</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: PetrakovaOl@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.04.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Клеточная терапия находит все большее применение в современной клинической практике. Уже проходят клинические испытания (фазы II и III) клеточных продуктов, предназначенных для восстановления таких тканей, как кожа, роговица, гортань и др. Однако получение дифференцированных клеток, характерных для большинства органов, представляет собой более сложную задачу. Предметом лабораторных исследований остается получение функционирующих нейронов, кардиомиоцитов, клеток печени, поджелудочной железы и т.д. Применение клеточной терапии при патологиях печени – сложный многостадийный процесс, требующий детального понимания особенностей дифференцировки и регенерации гепатоцитов. В представленном обзоре проанализировано современное состояние клеточной терапии патологий печени, описано использование различных типов клеток, рассмотрены основные молекулярно-генетические механизмы дифференцировки гепатоцитов, а также проблемы и перспективы развития данного метода.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дифференцировка, клеточная терапия, печень, трансплантация клеток.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ES – Embryonic Stem cells (эмбриональные стволовые клетки); iPS – Induced Pluripotent Stem cells (клетки с индуцированной плюрипотентностью); SP – Side Population cells (SP-клетки); ГСК – гемопоэтические стволовые клетки; МСК – мезенхимные стволовые клетки.

## ВВЕДЕНИЕ

Терапия патологий печени представляет собой актуальную проблему современной медицины. По данным статистики, в Российской Федерации число больных с различными хроническими и острыми заболеваниями печени превышает 200000 человек в год. Несмотря на достижения современной медицины, использование стандартных терапевтических приемов при хронических и острых патологиях печени оказывается недостаточным, и смертность сохраняется на уровне 80–90%.

Основным способом лечения тяжелых заболеваний печени все еще остается пересадка органа или его части. В связи с недостатком донорского материала разрабатываются методики заместительной клеточной терапии заболеваний печени. Большое количество данных, накопленных за последние годы, показывает, что клеточную терапию можно рассматривать как одно из приоритетных направлений в современной биомедицине и биотехнологии.

Клеточная терапия имеет ряд существенных преимуществ:

1. Трансплантация клеток, в отличие от сложных хирургических операций, технически гораздо проще, менее инвазивна, не несет рисков отторжения и других осложнений.

2. Донорский материал для клеточной терапии более доступен, может быть заготовлен заранее и подвергнут длительному криохраниению.

3. Клеточная трансплантация не только компенсирует дисфункцию органа и способствует восстановлению функционирования собственных клеток больного, но и препятствует возникновению фиброза поврежденных тканей, восполняя утраченную клеточную нишу.

4. В случае аутологичных трансплантаций клетки не элиминируются иммунной системой и могут оказывать пролонгированный (либо постоянный) эффект. В случае аллогенных трансплантаций при наследственных патологиях донорский материал может компенсировать генетический дефект реципиента благодаря синтезу нормальных белков донорскими клетками.

Эффективность замещения дефектов тканей, способность стимулировать собственную регенерацию органа, отсутствие опасностей возникновения фиброзов зависят, главным образом, от используемых клеток. В ряде исследований показано, что при определенных условиях культивирования клетки различного типа способны экспрессировать специфичные для гепатоцитов маркеры. Однако истинная

функциональность тех или иных клеток остается недоказанной. Возникает вопрос: каким критериям должна удовлетворять трансплантируемая клетка, чтобы эффективно восполнять дисфункцию поврежденной печени? Прежде всего, это способность к выполнению синтетической и детоксикационной функций. Клетки должны быть способны экспрессировать специфичные для гепатоцитов белки, такие, как цитохромы P450, альбумин, а также к запасанию гликогена, синтезу мочевины, связыванию билирубина и др. Очевидно, что поиск оптимального источника клеток и получение функционально активных типов клеток в достаточном для трансплантации количестве остается одной из основных задач клеточной биологии. Используемые клетки должны быть легко доступными и способными к быстрой пролиферации *in vitro*, обладать способностью к длительному криохранению, быть иммуносовместимыми и способными к дифференцировке в функционально активные гепатоцитоподобные клетки.

Успех репарации зависит также от участия факторов роста, цитокинов и хемокинов, вовлеченных в комплексную систему сигналов, координирующих поведение клеток. Именно поэтому клетки, выделяющие подходящий набор факторов роста, могут быть предложены для стимуляции и коррекции репарации тех или иных тканевых дефектов. С другой стороны, используемые клетки могут внести значительный (во многих случаях – решающий) вклад в процесс репарации, благодаря трансдифференцировке в целевые дифференцированные и функциональные клетки ткани.

### МЕХАНИЗМЫ КЛЕТочНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

Печень обладает высокой скоростью самообновления и значительными способностями к восстановлению даже после резекции большей ее части. Эти свойства обусловлены наличием сложной системы регенерации (рис. 1), основными компонентами которой являются: способность дифференцированных гепатоцитов к пролиферации и продукции зрелых гепатоцитов, а также к трансдифференцировке в холангиоциты [1]; регенерация из тканевого резерва стволовых клеток; репарация кроветворными клетками посредством слияния миелоидных клеток с поврежденными гепатоцитами и/или дифференцировкой мезенхимных стволовых клеток костного мозга в гепатоцитоподобные клетки [2, 3].

Гепатоциты представляют собой дифференцированные полиплоидные клетки, однако их способность к пролиферации и поддержанию своей популяции приближает их к стволовым клеткам. Во взрослой печени гепатоциты находятся в основном в состоянии покоя (фаза G0 клеточного цикла), однако в слу-



Рис. 1. Гипотетическая схема механизмов клеточной регенерации постнатальной печени [2, 3].

чае возникновения необходимости в регенерации гепатоциты начинают дедифференцироваться, пролиферировать и воспроизводить дифференцированные гепатоциты. Более того, после повреждения клеток желчных протоков в печени крысы гепатоциты проявляли некоторую фенотипическую пластичность и были способны к трансдифференцировке в холангиоциты [1]. В период постнатального роста популяция гепатоцитов увеличивается без участия стволовых клеток [4]. В эмбриональном и раннем постнатальном периоде гепатоциты делятся путем обычного митоза, затем начинается процесс митотической полиплоидизации, в результате которого не только увеличивается число гепатоцитов, но и возрастает их плоидность. В первом цикле после репликации ДНК цитотомии не происходит, в результате чего возникает двуядерный гепатоцит. В следующем митотическом цикле после удвоения ДНК деление ядер происходит синхронно, хромосомы объединяются в одну митотическую пластинку, и возникают две одноядерные тетраплоидные клетки. Далее происходит чередование этих двух циклов с постепенно возрастающей плоидностью гепатоцитов [5]. Для обеспечения постнатального роста печени изначально диплоидные гепатоциты претерпевают всего пять-шесть полиплоидизирующих митозов. Однако при необходимости быстрой регенерации (например, после токсических или инфекционных воздействий и др.) митозы без цитокинеза временно исключают-

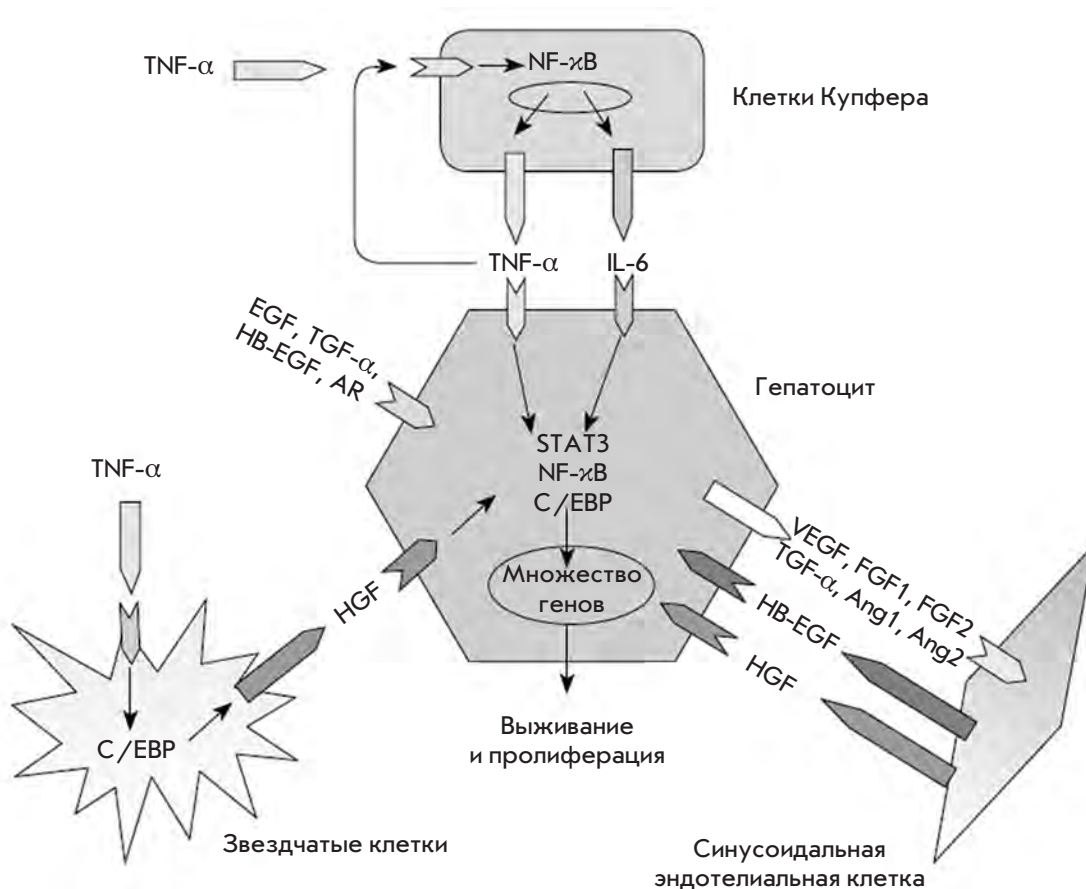


Рис. 2. Молекулярные механизмы поддержания популяции гепатоцитов и инициации их пролиферации [7].

ся, и деление клеток происходит по стандартному пути. Это предохраняет клетки печени от излишне высокой полиплоидизации. Основными факторами, регулируемыми пролиферацию гепатоцитов при репарации, являются интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухолей α (TNF-α), секретируемые клетками Купфера, фактор роста гепатоцитов (HGF), секретируемый звездчатыми клетками. Эти факторы инициируют переход гепатоцитов из фазы G0 в G1. Трансформирующий фактор роста β (TGF-β) подавляет вступление гепатоцитов в митоз после завершения регенерации. Для репликации и поддержания жизнедеятельности гепатоцитов важны также HGF, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), факторы роста фибробластов 1 и 2 (FGF1, FGF2), секретируемые эндотелиальными клетками [6, 7]. Основные молекулярные механизмы, обеспечивающие пролиферацию гепатоцитов, схематически изображены на рис. 2.

Стволовые клетки печени также играют значительную роль в процессе регенерации, если популяция гепатоцитов не способна восстановить поврежденную печень (при резекции критической

части органа, обширных токсических, инфекционных и др. повреждениях). В постнатальной печени существует ряд стволовых клеток, иерархические взаимоотношения которых до сих пор обсуждаются [8]. Основными предшественниками гепатоцитов и холангиоцитов являются овальные клетки. Обычно этим термином обозначают популяцию клеток небольшого размера (около 10 мкм), которые обладают бипотентным потенциалом дифференцировки и имеют высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. Овальные клетки происходят, предположительно, из каналов Геринга, которые, по мнению некоторых авторов, полностью состоят из стволовых клеток [9]. Овальные клетки экспрессируют альбумин, альфа-фетопротейн, цитокератин 19, специфический поверхностный маркер OV6 (A6 у мыши), эмбриональный маркер Delta-like/Pref-1, характерный также для гепатобластов [10]. Помимо этого овальные клетки продуцируют маркеры стволовых клеток: c-Kit, Sca-1, нестин, CD90 (Thy-1). По всей видимости, популяция данных клеток является гетерогенной и может содержать клетки разного происхождения. Часть клеток несет маркеры CD45, c-Kit, CD90, аль-

бумин. Популяции этих клеток, по-видимому, состоят из кроветворных стволовых клеток, которые проникают в печень из циркулирующей крови [11]. В целом популяция истинно овальных клеток, экспрессирующая маркеры OV6 и цитокератин 19, – это популяция коммитированных, временно пролиферирующих стволовых клеток печени. Предполагается, что во взрослой печени имеется компартмент менее дифференцированных клеток – изначальных стволовых клеток постнатальной печени. В одной из работ [12] получили популяцию стволовых клеток, экспрессирующих маркер адгезии эпителиальных клеток ЕpСAM. В эмбриональной печени эти клетки, названные гепатическими стволовыми клетками ЕpСAM<sup>+</sup> (hH<sub>p</sub>SCs), являются предшественниками гепатобластов, в постнатальной печени они локализуются в каналах Геринга. Гепатические стволовые клетки экспрессируют также NCAM, c-Kit, CD133/1, CD44H, цитокератин 19 и слабо позитивны по альбумину. Гепатические стволовые клетки не экспрессируют альфа-фетопротеин, CD45, маркеры зрелых гепатоцитов (цитохромы P450, молекулы внутриклеточной адгезии ICAM-1, трансферрин). При индукции дифференцировки *in vitro* клетки приобретали способность к синтезу альфа-фетопротеина и ICAM-1. При трансплантации гепатических клеток мышам NOD/SCID начинался синтез белков, характерных для зрелых гепатоцитов (альбумин, трансферрин). Авторы предположили, что данные клетки являются стволовыми клетками эмбриональной и постнатальной печени и, возможно, могут быть предшественниками овальных клеток [12]. В целом, иерархия стволовых клеток печени показана на рис. 3.

Стволовые клетки костного мозга также могут вносить вклад в регенерацию печени. Как известно, в эмбриональном и раннем постнатальном периоде печень является кроветворным органом. Во взрослом состоянии часть популяции овальных клеток представлена кроветворными клетками, позитивными по CD34, CD45, CD133, и при некоторых патологических процессах печень может стать органом экстрамедуллярного гемопоэза. Показано, что если летально облученным самкам мышей пересадить костный мозг от самцов, то через 6 мес. после трансплантации 1–2% гепатоцитов несли метку Y-хромосомы. Эти гепатоциты экспрессировали альбумин и могли быть как диплоидными, так и полипloidными [13]. При исследовании биопсийного материала печени шести женщин, которым трансплантировали кроветворные клетки из периферической крови доноров-мужчин, Y-хромосому в гепатоцитах выявляли с частотой от 0 до 7% [14]. Предполагали, что стволовые кроветворные клетки обладают способностью к дифференцировке в гепатоциты, однако в ряде работ было пока-

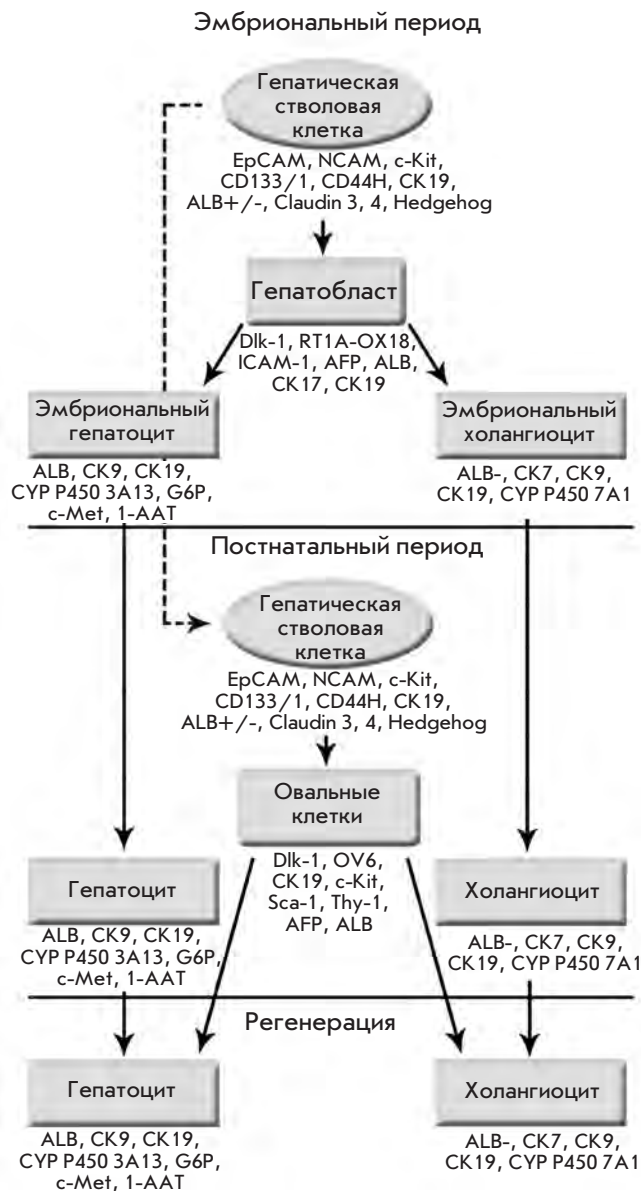


Рис. 3. Гипотетическая схема иерархии стволовых клеток печени [2, 115].

зано, что кроветворные клетки способны сливаться с гепатоцитами реципиента, предупреждая их гибель и стимулируя регенерацию [15, 16]. С гепатоцитами сливаются также клетки миелоцитарной линии, гранулоциты и моноциты-макрофаги [16]. Относительный вклад трансдифференцировки и клеточного слияния в процесс репарации печени стволовыми кроветворными клетками на данный момент обсуждается. Вероятно, в организме осуществляются оба эти процесса.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОНОРСКОЙ ПЕЧЕНИ

Трансплантация гепатоцитов может стать альтернативой применяемой в современной клинической практике трансплантации печени. Как известно, трансплантация печени может включать замену либо всего органа на донорский, либо его части. Однако недостаток донорских органов, плохая приживаемость и значительные осложнения, связанные с отторжением либо с недостаточной функцией пересаженной печени, существенно ограничивают применяемость данного метода. Кроме того, все еще не разработана достаточно эффективная методика длительного хранения печени как целого органа. В связи с этим трансплантация выделенных из донорской печени гепатоцитов становится перспективным направлением клеточной терапии патологий печени. К преимуществам этого метода относятся возможность использования как только что выделенных клеток, так и клеток после длительного криохранения, донорские клетки могут компенсировать патологии, обусловленные генетическими нарушениями, а также служить векторами для генной терапии. Трансплантация гепатоцитов гораздо менее инвазивная процедура, она практически не несет рисков отторжения. Пересаженные гепатоциты заполняют клеточные ниши, пустующие в результате массовой гибели собственных клеток больного (например, при остром токсическом или инфекционном воздействии), что значительно снижает риск образования фиброза. Кроме того, при трансплантации гепатоцитов нет необходимости удалять печень, поэтому со временем возможна регенерация собственного органа, например, при острой печеночной недостаточности.

Методика трансплантации гепатоцитов включает ряд стандартных процедур, разработанных по требованиям GMP (Good Manufactured Practice) [17]. Источником гепатоцитов может быть донорская печень, которая не подходит для трансплантации из-за жировой дистрофии, занимающей более 40–50% органа, затяжной ишемии, механического повреждения, разрывов капсулы, несоответствия группы крови, повреждения кровеносных сосудов и желчных протоков [18–20]. В редких случаях для трансплантации может использоваться печень плода [21]. Источником клеток может быть печень от доноров с остановкой сердца, печень, пораженная атеросклерозом или фиброзом. Стандартная процедура выделения гепатоцитов включает перфузию печени, ферментативную обработку для разрушения межклеточного вещества, промывку полученной клеточной суспензии. Жизнеспособность выделенных гепатоцитов обычно составляет около 70–90%, а выход –  $(1–17) \times 10^6$  клеток/г ткани (для клинического применения рекоменду-

ется использовать гепатоциты с жизнеспособностью не менее 60%). Полученные клетки охлаждают до  $+4^\circ\text{C}$  и как можно скорее ресуспендируют в растворе для инфузии для непосредственного введения либо в растворе для заморозки в случае последующего криохранения [22, 23]. Метаболические характеристики гепатоцитов проверяют по активности цитохромов P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2C9 и CYP2E1) и способности к синтезу мочевины [24].

Трансплантацию гепатоцитов, как правило, проводят через портальную вену, селезеночную вену или внутрибрюшинную трубку. При введении в брюшную полость, поджелудочную железу либо непосредственно в паренхиму печени наблюдается худшая выживаемость гепатоцитов. Наилучшим способом трансплантации считается введение через портальную вену, однако при осуществлении данной процедуры необходимо контролировать давление в портальной вене во избежание ее блокировки [25, 26]. Введение гепатоцитов в селезенку чаще применяется при хронических заболеваниях печени, когда фиброз препятствует приживлению вводимых клеток. Количество клеток, необходимое для трансплантации, зависит от вида патологии и составляет около 5–10% от теоретической массы печени ( $(2–4) \times 10^8$  клеток/кг веса тела), однако, за одну процедуру вводят не более 1% от количества гепатоцитов пациента. Печень взрослого человека содержит примерно  $2.8 \times 10^{11}$  гепатоцитов, таким образом, за одну трансплантацию рекомендуется вводить  $(2–4) \times 10^9$  донорских клеток [27]. По некоторым наблюдениям, в случае хронических заболеваний количество клеток может быть меньше, а для терапии наследственных патологий, напротив, необходимо увеличить число трансплантируемых клеток. Устойчивый терапевтический эффект достигается в течение 4–8 нед. после трансплантации и поддерживается 6–9 мес.

На данный момент трансплантация донорских гепатоцитов проведена более чем 80 больным в 13 медицинских центрах [18, 19, 28–30]. Из них около 30 (в том числе дети) имели наследственные нарушения метаболизма в печени, такие, как дефицит орнитинтранскарбамилазы либо гликогеноз. Трансплантация гепатоцитов привела к значительному улучшению состояния больных с наследственными нарушениями. Показано также, что трансплантация гепатоцитов может стабилизировать состояние детей, ожидающих донорскую печень [29, 31]. В ряде случаев, например при болезни Криглера–Найара, количество клеток, необходимое для устойчивого клинического эффекта, составляет до 12% от массы печени пациента, поэтому в связи с ограниченным количеством вводимых клеток требуется проводить повторные трансплантации. Трансплантация гепа-

тоцитов при нарушении обмена билирубина может успешно заменять пересадку всей печени на протяжении более 11 мес. [32–34]. При гликогенозе наблюдается восстановление нормального уровня глюкозы как у детей, так и у взрослых [19, 35].

Основной недостаток данного метода – дефицит донорского материала. К приоритетным задачам направления относятся – улучшение качества выделяемых гепатоцитов, оптимизация методик криохранения и повышение эффективности «заселения» печени. Не разработаны также оптимальные процедуры иммуносупрессии: как известно, пересаженные донорские гепатоциты элиминируются из печени через 6–9 мес. Одним из подходов может быть выбор оптимальных популяций стволовых клеток печени, способных к пролиферации и значительному увеличению своего количества *in vitro* с последующей дифференцировкой, а также создание соответствующих клеточных линий [36]. С другой стороны, остается актуальным поиск оптимального альтернативного источника клеток (в том числе и аутологичных) для терапии патологий печени.

### АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА

Необходимость в поиске альтернативных источников клеточного материала для терапии патологий печени обусловлена, прежде всего, дефицитом донорских органов, малой доступностью и недостаточным количеством пригодных для трансплантации гепатоцитов. Кроме того, клетки из альтернативных источников могут быть использованы в аутологичном варианте. Показано, что к трансдифференцировке в гепатоцитарном направлении способны в той или иной степени различные клеточные типы, однако, получить полноценно функционально активные клетки печени так и не удалось [37]. Наиболее хорошо изучены на данный момент, если говорить о проведении как экспериментальных, так и клини-

ческих испытаний, эмбриональные стволовые клетки (Embryonic Stem cells – ES) и клетки с индуцированной плюрипотентностью (Induced Pluripotent Stem cells – iPS) [38–41], стволовые и прогениторные клетки печени [12, 42]. Как клетки, способные к дифференцировке в гепатоциты, изучают мезенхимные клетки костного мозга [43, 44] и жировой ткани [45–47], клетки амниотической жидкости [48–50] и др. Однако во всех этих работах наблюдали лишь частичную трансдифференцировку и не было достигнуто функционально активное состояние, присущее гепатоцитам.

### Плюрипотентные клетки ES и iPS

Интерес к эмбриональным стволовым клеткам обусловлен прежде всего их широким дифференцировочным потенциалом: выделенные из внутренней клеточной массы бластоцисты, эмбриональные стволовые клетки сохраняют свойства плюрипотентности при длительном культивировании *in vitro* и могут дать начало клеткам всех трех зародышевых листков. На данный момент огромное количество работ посвящено дифференцировке ES-клеток в разные типы клеток взрослого организма. В то же время применение ES-клеток на практике может быть сопряжено с рядом нерешенных проблем, таких, как риски образования тератом, этические проблемы разрушения эмбрионов, длительные и трудоемкие дифференцировочные протоколы и т.д. Существуют данные о низкой иммуногенности ES-клеток человека, что также может представлять интерес. Однако не установлено сохранение низкой иммуногенности данными клетками при индукции дифференцировки в том или ином направлении [51].

Протоколы гепатоцитарной дифференцировки ES-клеток включают ряд основных этапов, имитирующих процессы, происходящие при развитии печени [52–54]. Основные стадии этого процесса представлены в *таблице*.

Основные этапы дифференцировки ES-клеток в гепатоцитарном направлении [55, 56]

Стадия дифференцировки	Длительность, дни	Основные дифференцировочные маркеры	Гепатоцитарные маркеры, характерные для данной стадии
Индукция образования энтодермы	3–4	Активин А	Sox17, Hnf-3β
Коммитирование клеток в гепатоцитарном направлении	4–7	BMP2, FGF4	Hnf-3β, альфа-фетопротеин
Пролиферация гепатобластоподобных клеток	5–10	HGF, KGF	Альбумин, альфа-фетопротеин, G6P, ТАТ
Созревание гепатоцитоподобных клеток	8–15	Онкостатин М, дексаметазон, N2, B27	Альбумин, G6P, ТАТ, РЕРСК, TDO, СУР Р450 и др.



Для повышения эффективности дифференцировки используют различные деметилирующие агенты. Идея применения деметилирующих агентов основана на их способности активировать экспрессию генов посредством снятия метилирования с ДНК: при снятии метилирования с промоторных зон активируется экспрессия генов, что значительно расширяет дифференцировочный потенциал клеток. Однако, поскольку деметилирование ДНК происходит случайным образом, для коммитирования клеток в определенном направлении деметилирующие агенты применяют в сочетании с факторами роста и цитокинами [32]. При использовании вальпроевой кислоты, ингибирующей гистон-деацетилазу, удалось повысить эффективность дифференцировки ES-клеток мыши [57]. Таким образом получили гепатоцитоподобные клетки, способные к синтезу альбумина, цитохромов P450, запасанию гликогена, в то время как при дифференцировке без вальпроевой кислоты получили структуры, напоминающие клетки желчных протоков. Однако в этом случае при инъекции дифференцированных в гепатоцитарном направлении ES-клеток мышам Balb/c nude не удалось избежать образования тератом [57]. Следует отметить, что при инъекции мышам с иммунодефицитом ES-клеток человека, прошедших дифференцировку в гепатоцитарном направлении, не наблюдали образования тератом, тогда как инъекции недифференцированных ES-клеток приводили к появлению тератом [55, 58].

Другой источник гепатоцитоподобных клеток – iPS-клетки. iPS-клетки – это индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, получаемые искусственно из соматических клеток взрослого организма, в которые вводят определенные гены и факторы, важные для достижения состояния плюрипотентности [59]. Как и ES-клетки, iPS-клетки способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, однако, в отличие от ES-клеток, существует возможность получать аутологичные iPS-клетки для заместительной клеточной терапии, а также iPS-клетки от больных с различными наследственными заболеваниями для моделирования патологического процесса *in vitro* и тестирования лекарственных средств [60, 61].

В целом, протоколы гепатоцитарной дифференцировки iPS- и ES-клеток сходны. В результате *in vitro*-дифференцировки iPS-клеток человека в гепатоцитарном направлении при помощи цитокинов и аденовирусных векторов, экспрессирующих ген *Hes*, который играет важную роль в развитии гепатоцитов, получены гепатоцитоподобные клетки, экспрессирующие маркеры эндодермы *Hnf-3 $\beta$*  и *Sox17*, а также альбумин и цитохромы P450 [60]. Показано также [54], что на 7-й день дифференцировки iPS-

клеток человека с использованием стандартного протокола примерно 60% клеток начинали продуцировать альбумин и альфа-фетопроtein; к 20-му дню клетки приобретали способность к синтезу мочевины (примерно 15% от уровня синтеза гепатоцитами) и запасанию гликогена [54], но доля гепатоцитоподобных клеток была невысокой (около 10%). Однако отсутствие онкогенных потенциалов при использовании данных клеток не было показано.

### Соматические клетки

**Стволовые и прогениторные клетки печени.** Мультипотентные постнатальные и прогениторные клетки печени могут служить альтернативным источником для клеточной терапии. Они эффективно пролиферируют *in vitro* (и/или *in vivo*), так что можно получить значительное их количество из небольшого биоптата. Эти клетки гораздо дольше сохраняют жизнеспособность и лучше выдерживают криохранение, чем зрелые гепатоциты, а также менее иммуногенны. Стволовые клетки печени способны как к дифференцировке в гепатоциты *in vivo*, так и к поддержанию своей популяции, что может пролонгировать терапевтический эффект от их введения. Стволовые клетки уже коммитированы в гепатоцитарном направлении и не требуют длительных дифференцировочных процедур. Основную сложность для широкого использования этих клеток представляет недостаток донорского материала.

На сегодняшний день основное внимание уделяется методам выделения стволовых клеток печени и поиску оптимальных клеточных популяций, обладающих наилучшим регенеративным потенциалом. При помощи проточной флуориметрии выделены гепатические клетки, несущие поверхностный маркер адгезии эпителиальных клеток EpcAM. Доля этих клеток у доноров всех возрастов составляет 0.5–2.5% клеток паренхимы печени. Они могут проходить более 150 пассажей *in vitro*, являются позитивными по цитокератинам 8, 18 и 19, CD133/1, CD44H, слабо позитивными по альбумину. Гепатические клетки не экспрессируют альфа-фетопроtein, маркеры взрослых гепатоцитов (цитохромы P450), молекулы внутриклеточной адгезии ICAM-1, маркеры гемопоэтических (CD45) и мезенхимных клеток (десмин, VEGFR $\alpha$ ). При индукции дифференцировки эти клетки приобретают способность к синтезу альфа-фетопроteина и ICAM-1. При трансплантации гепатических EpcAM<sup>+</sup>-клеток мышам NOD/SCID наблюдали формирование печеночных структур из клеток человека и синтез белков, характерных для зрелых гепатоцитов. Таким образом, предположили, что данные клетки являются стволовыми клетками постна-

тальной печени и могут использоваться для заместительной клеточной терапии [12]. В другой работе методом иммуномагнитного сортирования была отобрана положительная по Thy-1 (CD90) популяция клеток из печени взрослого донора. По всей видимости, эта популяция была гетерогенной и содержала клетки, позитивные по маркерам прогениторных клеток: гемопоэтических – CD34, стволовых – CD117, СК19, протоковых – СК14, овальных клеток – OV6. Популяция Thy-1-позитивных клеток обладала значительно более высоким дифференцировочным потенциалом, чем Thy-1-негативная, и могла дифференцироваться как в гепатоциты, так и в протоковые клетки. О функциональной активности данных клеток свидетельствует экспрессия HerPar 1 и альбумина человека после инъекции этих клеток мышам с иммунодефицитом [42]. В качестве еще одного подхода можно рассматривать выделение так называемых SP-клеток (Side Population cells – SP) методом проточной флуориметрии. Показано, что многие типы стволовых клеток содержат АТФ-зависимые ABC-транспортеры, ответственные за выброс из клетки различных цитостатиков и лекарственных средств, активность которых приводит к формированию феномена множественной лекарственной устойчивости. Одно из веществ, выбрасываемых из стволовых клеток, – краситель Hoechst 33342, использование которого позволяет отсортировать на проточном цитофлуориметре не окрашенные мелкие клетки, получившие название SP-клеток. Из печени человека получены CD45- и Hoechst 33342-негативные SP-клетки, способные к формированию колоний при культивировании *in vitro*. Через 2–3 нед. культивирования в колониях появлялись крупные клетки, содержащие много гранул, внутриклеточный липофусцин и часто двойное ядро. Культивируемые клетки были позитивными по маркерам гепатоцитов человека: HerPar, цитокератинам 8 и 18, цитохромам P450 и альбумину. Таким образом, SP-клетки, выделенные из печени взрослого донора, способны к дифференцировке в гепатоцитарном направлении *in vitro* [62].

**ГСК и МСК костного мозга, пуповинной крови и жировой ткани.** Интерес к стволовым клеткам костного мозга как потенциальному источнику гепатоцитов возник еще в ранних работах Петерсена [63]. После трансплантации костного мозга облученным мышам в их печени наблюдали клетки донора, которые в дальнейшем дифференцировались в гепатоцитоподобные клетки. Эти эксперименты подвергли сомнению существовавшее ранее предположение о возможности получения гепатоцитов исключительно из энтодермальных источников. Оказалось,

что у женщин, после трансплантации им мужского костного мозга, находили гепатоциты с мужским карิโอотипом [13]. Неизвестно, возникают ли гепатоциты из клеток костного мозга посредством трансдифференцировки, слияния или горизонтального переноса генов, это по-прежнему остается предметом дискуссий [64].

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) можно легко отсортировать по маркерам CD31 и CD34 и выделить из костного мозга, пуповинной крови или в некоторых случаях из периферической крови. Показано, что при поражении печени пересаженные человеческие ГСК приобретают способность производить альбуминсинтезирующие клетки в печени мышей и репарировать дефекты печени как посредством слияния [15], так и без слияния с клетками хозяина [65]. Напротив, у мезенхимных стволовых клеток (МСК) костного мозга не обнаружено феномена клеточного слияния [66]. МСК костного мозга, пуповинной крови и жировой ткани обладают иммуносупрессирующими и противовоспалительными свойствами, легко культивируются *in vitro*, а также синтезируют ряд цитокинов и факторов роста, способных стимулировать репарацию собственных клеток больного. Благодаря этим свойствам многие рассматривают МСК как удобный источник клеток для заместительной клеточной терапии [67–69]. Показано, что состояние мышей с острой печеночной недостаточностью, вызванной четыреххлористым углеродом, улучшается после введения МСК костного мозга. В опытной группе наблюдалась значительно более высокая выживаемость гепатоцитов по сравнению с контрольной группой, несмотря на то, что приживления МСК на момент наблюдения не происходило. Положительный эффект от введения МСК относят на счет их стимулирующего и противовоспалительного действия [70]. Интактные МСК из пуповинной крови человека вводили также в печень эмбрионов овцы, и через 56–70 дней после трансплантации зафиксировали экспрессию альбумина человека, доля человеческих клеток в печени ягнят составила при этом от 2.6 до 12.5% [71].

В ряде работ проведена дифференцировка МСК в гепатоцитарном направлении. При обработке МСК жировой ткани человека HGF, онкостатином М и дексаметазоном получена экспрессия альфа-фетопротейна и альбумина [45]. В другой работе при использовании гепатоцитарной ростовой среды и деметилирующего агента (20 мкМ 5-азацидин) МСК жировой ткани крысы дифференцировались в клетки, экспрессирующие альбумин, альфа-фетопротейн, цитохромы P450 1A1, цитокератины 18 и 19 [46]. Эти клетки также синтезировали мочевины. При дифференцировке МСК костного

мозга человека под действием FGF4, HGF и дексаметазона не удалось индуцировать гепатоцитарную дифференцировку *in vitro*. Однако при добавлении деметилирующего агента трихостатина А (1 мкМ) – ингибитора гистоновой деацетилазы, были получены эпителиоподобные клетки, экспрессирующие цитокератин 18. Клетки также синтезировали альбумин, характеризовались повышенной активностью цитохромов P450 и секрецией мочевины [43].

На данный момент произведено несколько трансплантаций клеток костного мозга с целью терапии патологий печени [72]. Некоторые из них включали использование гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) для мобилизации собственных стволовых клеток костного мозга и стимуляции регенерации печени без необходимости выделять костный мозг [73, 74]. Трансплантация аутологичных стволовых клеток костного мозга 27 пациентам с хроническими заболеваниями печени либо циррозом привела к увеличению секреции альбумина и снижению уровня билирубина [75–77].

Несмотря на некоторые успехи в применении стволовых клеток костного мозга при заболеваниях печени, механизм их действия еще предстоит выяснить. По-прежнему не решены проблемы безопасности, в частности, связанные с возможным развитием фиброзов при участии МСК, что может усугубить течение заболеваний [78]. Необходимо прояснить как влияют эти клетки на пораженную печень и механизмы их воздействия, прежде чем будут предприняты попытки их клинического использования.

**Клетки амниотической жидкости.** Амниотическая жидкость содержит гетерогенную популяцию клеток фетального происхождения, в которой присутствуют стволовые клетки, позитивные по мезенхимным маркерам (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105), нейральным маркерам (нестин,  $\beta$ -3-тубулин, NEFH), а также по некоторым из маркеров плюрипотентности (Oct4, Nanog). Эти клетки интересны прежде всего своим широким дифференцировочным потенциалом: они дифференцируются *in vitro* в остеогенном, адипогенном, нейральном, эндотелиальном, гепатоцитарном и др. направлениях [50, 79–82]. Недавно показали, что одновременно с мезенхимными маркерами стволовые клетки амниотической жидкости экспрессируют и эпителиальные маркеры: кератин 19, кератин 18 и p63 [83]. Это опровергло ранее существующее представление о стволовых клетках амниотической жидкости как о МСК. И хотя статус этих клеток активно обсуждается, можно предположить, что способность к образованию фиброзных поражений при использовании клеток амниотической жидкости будет ниже, чем в случае клеток истинно мезенхимного проис-

хождения. К недостаткам данного источника клеток относятся их малая доступность, ограниченное количество донорского материала и необходимость производить забор на определенной стадии беременности, что не всегда возможно.

Была показана возможность дифференцировки клеток амниотической жидкости в гепатоцитарном направлении. Клетки культивировали на чашках, покрытых матригелем или коллагеном, в присутствии HGF, FGF4, инсулина, онкостатина М и дексаметазона. На 7-й день дифференцировки наблюдалось изменение морфологии клеток: они приобретали полигональную форму без отростков. На 45-й день выявлен синтез альбумина, альфа-фетопротейна, Hnf-4 $\alpha$ , с-Met рецептора HGF. Уровень синтезируемой мочевины возрастал с 50 нг/ч на клетку в контрольной культуре до 1.21 x 10<sup>3</sup> нг/ч на клетку в дифференцированной культуре [49]. Сравнили способность к дифференцировке МСК костного мозга человека и стволовых клеток амниотической жидкости. Клетки культивировали на чашках, покрытых коллагеном типа 1, в присутствии дифференцировочных агентов: 0–2 день – FGF4, 3–5 день – HGF, 6–18 день – HGF + инсулин-трансферрин-селенит + дексаметазон и трихостатин А (ингибитор гистоновых деацетилаз). Начиная с седьмого дня в обеих культурах наблюдались морфологические изменения: форма клеток становилась округлой, полигональной. В дальнейшем форма клеток амниотической жидкости гораздо быстрее и стабильнее изменялась на эпителиоподобную. Количественный ПЦР-анализ показал, что в обеих культурах клеток экспрессия гепатоцитарных маркеров, таких, как альфа-фетопротейн, альбумин, цитокератин 18, Hnf-1 $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ , CYP1A1, изначально была незначительной либо отсутствовала. На начальном этапе дифференцировки экспрессия данных маркеров практически не изменялась, однако на стадии созревания гепатоцитов экспрессия гепатоцитарных маркеров значительно возросла, причем на 14-й день дифференцировки экспрессия всех маркеров в культуре клеток амниотической жидкости была значительно выше, чем в культуре МСК костного мозга. На стадии созревания гепатоцитов экспрессия всех маркеров, за исключением альфа-фетопротейна, увеличивалась. Экспрессия альфа-фетопротейна достигала максимального значения к 14-му дню дифференцировки, затем начала снижаться, в то время как максимум экспрессии альбумина наблюдался к 28-му дню дифференцировки. Экспрессия альбумина в клетках амниотической жидкости была примерно в 1.3 раза выше, чем в МСК костного мозга. Иммунофенотипический анализ показал, что в культуре клеток амниотической жидкости доля клеток, позитивных по гепатоцитарным марке-

рам, достоверно выше, чем в культуре МСК. Эти клетки также обладали способностью к синтезу мочевины и запасанию гликогена [50].

Все эти данные говорят о перспективности использования стволовых клеток амниотической жидкости в клеточной терапии, однако необходимо лучше понимать их дифференцировочный статус и способность к образованию фиброзов.

**Клетки энтодермального происхождения.** На сегодняшний день активно изучается возможность трансдифференцировки клеток в пределах одного зародышевого листка. Плюсы данного подхода понятны: близкие по гистогенетическому происхождению клетки проявляют значительно большую фенотипическую пластичность в пределах одного зародышевого листка; они быстрее и глубже трансдифференцируются в другие типы клеток данного зародышевого листка, не требуя длительных и трудоемких дифференцировочных протоколов.

Накоплено достаточно много сведений о трансдифференцировке клеток энтодермы *in vitro* и *in vivo*. Протоковые клетки поджелудочной железы, пересаженные в печень крысы, дифференцируются в гепатоциты [84]. Овальные клетки также могут дифференцироваться в эндокринные и экзокринные клетки поджелудочной железы [85]. В культуре *in vitro* тоже может происходить дифференцировка островковых клеток в гепатоциты при увеличении плотности посева [86]. Показано, что при воздействии дексаметазона ацинарные клетки поджелудочной железы могут дифференцироваться в гепатоциты [87]. Таким образом, клетки энтодермы проявляют способность к взаимной трансдифференцировке и могут возмещать функциональную недостаточность другой ткани в пределах энтодермального зародышевого листка. Однако как для клеток печени, так и для клеток поджелудочной железы существует проблема дефицита донорского материала. Именно поэтому актуальным остается поиск оптимального источника клеток энтодермы для заместительной клеточной терапии.

Один из возможных источников клеток энтодермы – клетки слюнной железы. Слюнная железа закладывается как зачаток эктодермы, затем в нее мигрируют клетки энтодермального происхождения [88]. Будучи функциональным аналогом экзокринных клеток поджелудочной железы, клетки слюнной железы могут служить удобным источником энтодермальных клеток для заместительной терапии при патологиях печени и поджелудочной железы. На данный момент накоплено достаточно сведений о культивировании *in vitro* клеток слюнной железы, выделенных от человека и животных. Культивируемые *in vitro* клетки слюнной железы представ-

ляют собой активно пролиферирующую культуру, способную проходить значительное число пассажей [89]. Клетки слюнной железы человека и животных (мышь, крыса, свинья) позитивны по цитокератинам 18 и 19 и зачастую по альфа-фетопротеину [90, 91]. При определенных условиях культивирования клетки слюнной железы приобретают способность к синтезу альбумина [92]. Однако этот источник клеточного материала остается относительно малоизученным. Детальное выяснение механизмов дифференцировки клеток слюнной железы в гепатоцитарном направлении, а также их вклад в репарацию патологий печени еще предстоит выяснить.

#### **Методика прямой дифференцировки – использование генетических конструкций для перепрограммирования соматических клеток**

Методика прямой дифференцировки клеток основана на использовании генетических конструкций для перепрограммирования различных типов клеток сразу в целевые, минуя возвращение в плюрипотентное состояние. Одно из основных преимуществ данного подхода перед использованием плюрипотентных ES- и iPS-клеток – отсутствие рисков образования тератом. Этот относительно новый подход, требующий детального понимания молекулярно-генетических механизмов той или иной клеточной дифференцировки, активно развивается в последнее время.

Выполнен ряд работ, указывающих на возможность прямого перепрограммирования клеток различного происхождения [93]. Например, функционирующие  $\beta$ -клетки можно получать из экзокринных клеток поджелудочной железы мыши. Опытным путем с помощью реэкспрессии ключевых регуляторных генов *in vivo* найдена комбинация минимального количества генов (*Ngn3*, *Pdx1* и *Mafa*), с помощью которых можно перепрограммировать дифференцированные клетки взрослого организма в клетки, проявляющие свойства эндокринных клеток поджелудочной железы. Такие клетки неотличимы от эндогенных  $\beta$ -клеток по размеру, форме и ультраструктуре, они экспрессируют гены, необходимые для функционирования  $\beta$ -клеток, и могут уменьшать гипергликемию, активно секретируя инсулин и способствуя перестройке локальных кровеносных сосудов [94].

Что касается клеток печени, то работ, посвященных получению функционально активных гепатоцитоподобных клеток методом прямой дифференцировки, пока немного. Это связано в основном со сложностью и многостадийностью гепатоцитарной дифференцировки, что затрудняет поиск ключевых дифференцировочных генов. Однако первые успехи в этой области уже получены. При индукции гепато-

цитарной дифференцировки фибробластов из хвоста мыши использовали лентивирусную трансфекцию 14 генов, играющих ключевую роль в развитии печени [95]. После анализа опубликованных данных были отобраны две комбинации генов, индуцирующих эпителиальный фенотип фибробластов и экспрессию гепатоцитарных маркеров. Первая комбинация состояла из шести генов: *Foxa2*, *Foxa3*, *Hnf-1 $\alpha$* , *Hnf-4 $\alpha$* , *Hnf-6* и *Gata4*; а вторая – из восьми, включая *Foxa1* и *Hlf* [96, 97]. При исключении из комбинации *Hnf-6* наблюдали значительное увеличение числа эпителиоподобных колоний, а исключение *Hnf-4 $\alpha$*  еще более способствовало образованию эпителиоподобных колоний. Оставшиеся гены также разделили на комбинации: *Gata4*, *Hnf-1 $\alpha$* , *Foxa3* и *Gata4*, *Hnf-1 $\alpha$* , *Foxa2*, причем первая комбинация показала лучший результат. Интересно, что при использовании комбинации *Gata4*, *Hnf-1 $\alpha$*  и *Foxa3* наблюдали появление экспрессии генов эндогенных факторов *Foxa2* и *Foxa3*, а исключение из этой комбинации любого из генов блокировало гепатоцитарное перепрограммирование. Полученные индуцированные гепатоцитоподобные клетки были названы iНер. Данные клетки были позитивными по Е-кадгерину и белку плотных контактов Tjp1. На 14-й день 23% эпителиоподобных клеток были позитивными по альбумину. iНер были также позитивными по альфа-фетопротейну, цитокератинам 18 и 19, *Hnf-4 $\alpha$* , цитохромам P450. Маркеры панкреатической дифференцировки замечены не были, iНер не проявляли свойств клеток иных типов, кроме гепатоцитарных. iНер также были способны к запасанию гликогена и секреции альбумина в среду. При внутриселезеночной инъекции клеток iНер мышам *Fah<sup>-/-</sup>*, у которых нарушен метаболизм тирозина и которые могут жить только, если корм содержит 2-(2-нитро-4-трифторметилбензол)-1,3-циклогександион, наблюдалась значительная репопуляция клеток печени (от 5 до 80%). Эти мыши могли жить, не получая 2-(2-нитро-4-трифторметилбензол)-1,3-циклогександион, тогда как при инъекции интактных фибробластов наблюдалась гибель мышей и отсутствовала репопуляция печени [95]. Все эти данные свидетельствуют об эффективности прямой дифференцировки фибробластов мыши в гепатоцитоподобные клетки с помощью регуляторных факторов *Gata4*, *Hnf-1 $\alpha$*  и *Foxa3*. Тем не менее подобный подход требует дальнейшего изучения, так как при использовании репрограммированных фибробластов возникает повышенный риск образования фиброза, который может быть инициирован примесью не репрограммированных фибробластов в культуре. При использовании клеток с минимальными способностями к образованию фиброза (например, эпите-

лиальных) оптимальный набор регуляторных генов может быть другим.

Еще один подход к стимуляции регенерации печени – использование генетических векторов, несущих ключевые гены, которые усиливают пролиферацию клеток печени (рис. 2), уменьшают апоптоз либо восполняют генетические дефекты печени [7]. Однако этот подход требует детального изучения, в том числе создания оптимальных и безопасных векторов для переноса генов, разработку методик доставки векторов в печень и т.д.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕПАТОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Дефинитивная энтодерма дает начало большинству органов пищеварительного тракта, включая печень [53]. До активации органоспецифических генов экспрессируются несколько ранних маркеров энтодермы, в том числе *Otx2*, *Hesx1*, *Hesx*, *Cdx2*. Затем в первичной полоске клетки мезоэнтодермы начинают продуцировать ряд факторов, таких, как GSC, *Hnf-3 $\beta$* , *Cxcr4*, *Sox17a/b*, *Brachyury*, Е-кадгерин, VEGFR2, VE-кадгерин, PDGFR $\alpha$ , *Gata4*, *Gata6*, которые определяют дифференцировку клеток дефинитивной энтодермы и мезодермальных предшественников. Печень возникает из латеральной энтодермы развивающегося вентрального отдела передней кишки (примерно на стадии E8.5 развития мыши и около третьей недели беременности человека) [97]. Ростовые факторы, выделяемые сердечной мезодермой и мезенхимой поперечной перегородки (FGF, BMP) стимулируют дальнейшую дифференцировку подлежащей энтодермы в гепатоцитарном направлении. В энтодерме экспрессия генов семейства *Hnf-3* (*Foxa*) обеспечивает запуск гепатоцитарной дифференцировки, индуцированной сигналами от FGF [98]. Однако экспрессия Wnt и FGF4 мезодермой задних отделов кишки на данном этапе ингибирует гепатоцитарную дифференцировку [99]. На поздних стадиях (при формировании гепатоцитов и холангиоцитов) Wnt, напротив, стимулирует пролиферацию и дифференцировку. Критическую роль для фетальных клеток печени играет HGF, необходимый для дальнейшего роста и пролиферации клеток печеночного зачатка. Подобная регуляция осуществляется через с-Met-рецептор к HGF. HGF препятствует коммитированию гепатобластов в холангиоциты через блокировку Notch. Показано, что эндотелиальные клетки стимулируют развитие печени, в том числе благодаря секреции HGF [100]. Ген *Tbx3* способствует развитию гепатобластов через супрессию p19<sup>ARF</sup> [101]. Когда гепатобласты формируются, их форма меняется с кубической на вытянутую, затем происходит образование псевдомногослойного эпителия.

Этот процесс регулируется геном *Hex*. Затем базальная мембрана разрушается, и клетки пролиферируют в окружающей строме. Эти более поздние морфологические изменения контролируются генами *Prox1*, *Hnf-6/OC-1* и *OC-2*. *Hnf-6* и *OC-2* регулируют E-кадгерин, тромбоспондин-4 и *Spp1*, которые контролируют адгезию и миграцию клеток во многих типах тканей [102]. *Notch* определяет переключение развития гепатобластов с гепатоцитарного направления в сторону формирования желчных протоков [103]. Для созревания гепатоцитов также важен гемопоэз. После того как печеночный зачаток выступит из кишечной трубки, в него мигрируют гемопоэтические клетки, которые секретируют онкостатин М и IL-6 [104]. Онкостатин М стимулирует экспрессию гепатоцитарных дифференцировочных маркеров, индуцирует морфологические изменения клеток печеночного зачатка и способствует активации синтетических и детоксикационных свойств печени, регулирует клеточную адгезию. Глюкокортикоиды также способствуют созреванию печени, поддерживают пролиферацию и функционирование дифференцированных гепатоцитов. Показано, что физиологические концентрации дексаметазона (синтетического глюкокортикоида) в фетальной печени супрессируют продукцию альфа-фетопротеина и инициируют синтез альбумина [104], способствуют запасанию гликогена [105]. Основные этапы развития клеток печени отображены на рис. 4.

Специфический профиль транскрипции, характерный для гепатоцитов, поддерживается рядом ге-

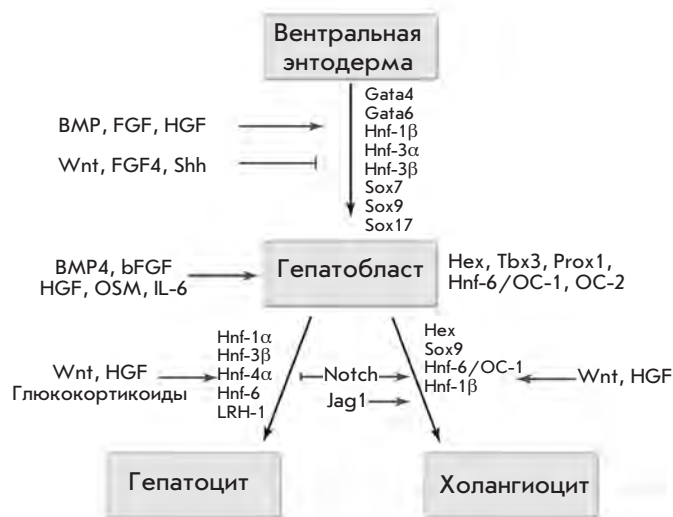


Рис. 4. Основные этапы развития клеток печени [97, 116].

нов, в том числе семейством *Hnf*, кодирующим ядерные факторы гепатоцитов. В число ключевых генов этого семейства входят *Hnf-1* – член семейства ROU гомеобоксных генов; *Hnf-3* – ДНК-связывающий домен; *Hnf-4* – член суперсемейства рецепторов стероидных гормонов; и *Hnf-6*.

Варианты *Hnf-1α* и *Hnf-1β* (или *vHnf-1*) фактора *Hnf-1* взаимодействуют с ДНК в виде гомо- или гетеродимеров. Эти белки имеют одинаковые ДНК-связывающие домены, но активируют транскрипцию разных генов. *Hnf-1β* экспрессируется в энтодерме передней кишки (на стадии E5–E6 у мыши), *Hnf-1α* активируется позже (на стадии E11 у мыши), в период формирования паренхимы печени. Экспрессия *Hnf-1α* в эмбриональной печени ниже, чем *Hnf-1β*, однако, после рождения уровень экспрессии *Hnf-1α* становится выше. *Hnf-1* активирует более 1000 специфических для печени генов, содержащих в промоторной области сайт связывания этого фактора, при этом *Hnf-1* негативно регулирует свою собственную экспрессию. *Hnf-4* является позитивным регулятором *Hnf-1*, способным активировать экспрессию этого гена, но экспрессию целевых генов эти факторы регулируют независимо друг от друга [106].

Подсемейство *Hnf-3* состоит из трех белков: *Hnf-3α*, *Hnf-3β* и *Hnf-3γ* (они же *Foxa1*, *Foxa2* и *Foxa3* соответственно), которые связываются с ДНК в виде мономеров. Члены данного подсемейства имеют строгую гомологию области ДНК-связывающих доменов, они способны узнавать одни и те же нуклеотидные последовательности. *Hnf-3α* и *Hnf-3β* регулируют экспрессию генов в гепатоцитах, желудочном, кишечном и бронхиальном эпителии. *Hnf-3γ* также играет важную роль в экспрессии генов в клетках печени, кишечника, семенников. *Hnf-3β* появляется на 7-й день эмбрионального развития мыши в первичной полоске, *Hnf-3α* имеет схожую динамику экспрессии, но его концентрация ниже. *Hnf-3γ* начинает экспрессироваться на стадии E12 развития мыши.

*Hnf-4* включает три основных члена: *Hnf-4α*, *Hnf-4β*, *Hnf-4γ* и множество переходных вариантов. *Hnf-4* принадлежит к суперсемейству ядерных рецепторов стероидных гормонов, он связывается с ДНК в виде гомодимера. *Hnf-4β* обладает меньшей ДНК-связывающей активностью, чем *Hnf-4α* и является более слабым трансактиватором. *Hnf-4α* экспрессируется в печени, почках, поджелудочной железе. *Hnf-4β* экспрессируется не только в этих органах, но и в желудке, кишечнике, легких, яичниках и семенниках, в то время как *Hnf-4γ* – в почках, поджелудочной железе, семенниках, но не в печени. *Hnf-4* является ключевым регулятором тканеспецифической экспрессии генов в висцеральной энтодерме, необходимым для нормальной экспрессии секре-

тируемых факторов, таких, как альфа-фетопротеин, аполипопротеины, ретинолсвязывающий белок и др. Некоторые авторы считают, что Hnf-4α играет ведущую роль, запуская каскад реакций и поддерживая специфическую для гепатоцитов транскрипцию. Hnf-4α связывается примерно с 12% генов, экспрессируемых в гепатоцитах, в то время как другие транскрипционные факторы связываются не более чем с 2.5% промоторных регионов [106]. Hnf-4α как один из наиболее ранних маркеров энтодермы появляется в мышинных эмбрионах на 5-й день развития. До стадии E9 экспрессия Hnf-4α ограничена экстраэмбриональной висцеральной энтодермой, затем он появляется в печени и кишечнике. Во взрослом организме Hnf-4α экспрессируется в печени, почках, кишечнике и поджелудочной железе.

Hnf-6 принадлежит к семейству One Cut факторов транскрипции (известных также как ОС-1). Hnf-6 связывается с CREB-связывающим белком (СВР), экспрессируется в печени, поджелудочной железе и нервной системе. Hnf-6 выявляется на 9-й день эмбрионального развития, в печени эмбрионов мыши исчезает между 12.5 и 15-м днем, а после 15-го дня появляется снова. Во взрослом организме Hnf-6 экспрессируется в печени, поджелудочной железе, головном мозге, яичках. Интересно, что Hnf-3β и Hnf-6 потенциально регулируют экспрессию одних и тех же генов, они критичны для функционирования гепатоцитов. Hnf-6 узнает область -138...-126 промотора *Hnf-3β*, он необходим для активации этого промотора. При этом Hnf-3β способен связываться с промотором Hnf-6 и репрессировать его [107]. Hnf-6 способствует дифференцировке гепатобластов в клетки желчных

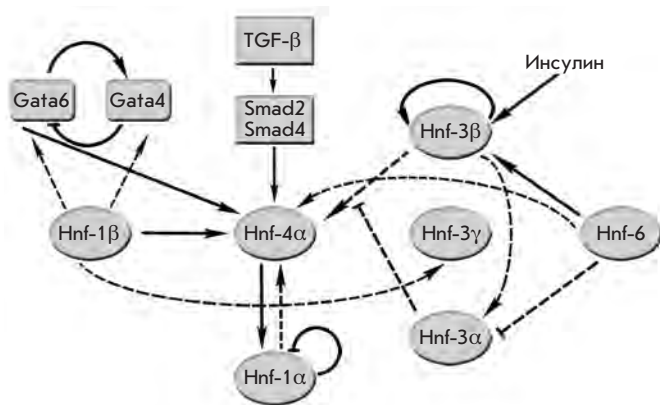
протоков, тогда как Hnf-3β играет ключевую роль в дифференцировке и функционировании гепатоцитов.

Экспрессию ядерных гепатоцитарных факторов и других маркеров висцеральной энтодермы в эмбриональном развитии индуцирует Gata6. Факторы семейства TGF-β также способны индуцировать экспрессию этих маркеров. Гипотетические регуляторные пути, обеспечивающие поддержание специфического для печени паттерна экспрессии генов, представлены на рис. 5 [108].

**ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ**

Одна из основных проблем при трансплантации донорских гепатоцитов – плохая их приживаемость и элиминация иммунной системой в течение нескольких месяцев после трансплантации. Показано, что важную роль в выживании и приживаемости вводимых клеток играет межклеточный матрикс. В работе по исследованию влияния межклеточного матрикса на приживаемость донорских гепатоцитов в печень крысы перед трансплантацией донорских клеток интрапортально вводили коллаген или фибронектин. Через 4 дня после трансплантации доля прижившихся гепатоцитов в печени повышалась более чем в 10 раз в случае, если предварительно был введен коллаген или фибронектин [109]. Совместное введение гепатоцитов и факторов роста (TGF-α) также может увеличить количество прижившихся клеток [110]. Известно, что приживаемость клеток зависит от наличия соответствующей «клеточной ниши». В опытах на макаках использовали временную блокировку портальной вены, что вызвало ишемию и частичную гибель клеток печени. При последующей трансплантации донорских гепатоцитов их доля в печени реципиента составила около 10% от ее массы [111]. Однако целесообразность клинического применения данного подхода остается под вопросом.

Для увеличения времени жизни трансплантированных гепатоцитов в организме пациента подбирают доноров, совместимых по антигенам АВО и HLA. В настоящее время иммуносупрессию часто обеспечивают при помощи моноклональных антител к рецептору IL-6 в сочетании с небольшими дозами фармакологических препаратов такролимус и сиролимус [112]. Важное значение для элиминации введенных гепатоцитов имеют натуральные киллеры (НК). Показано, что блокирование НК-клеток в печени при помощи специфической или локальной иммуносупрессии улучшает приживаемость и пролиферацию трансплантированных гепатоцитов [113]. Кроме того, использование стволовых клеток печени может иметь более продолжительный эффект за счет того, что стволовые клетки зачастую не элиминируются



**Рис. 5.** Транскрипционная иерархия гепатоцитарных факторов роста. Сплошными стрелками показаны универсальные регуляторные пути, пунктирными – регуляция на определенных стадиях развития [108].

иммунной системой реципиента, могут долгое время поддерживать свою популяцию и давать популяцию дифференцированных клеток.

Актуальным также остается улучшение качества выделяемых гепатоцитов. Использование раствора Celsior® для хранения и транспортировки биоптатов печени предотвращает деградацию и гибель гепатоцитов [22]. Перфузия донорской ткани N-ацетилцистеином также позволила повысить качество выделяемых клеток [114].

Ключевыми для современной клеточной терапии остаются вопросы биологической безопасности и эффективности. При использовании плюрипотентных клеток (ES и iPS) необходимо иметь надежный протокол удаления недифференцированных клеток из трансплантата, поскольку плюрипотентные ES- и iPS-клетки способны к образованию тератом. Проблемой остается и оценка риска образования фиброза при использовании тех или иных типов клеток. При изучении способности МСК костного мозга восполнять клетки печени при остром и хроническом повреждении определяли долю донорских МСК и степень их гепатоцитарной дифференцировки. Через 4 нед. после трансплантации вклад донорских клеток оказался невысоким (около 0.08% от общего количества клеток печени при остром повреждении и около 3–4% при хроническом повреждении), при этом лишь 5–10% из них имели гепатоцитарный фенотип. Значительная доля донорских клеток (около 35%) имела миофибробластный фенотип, многие из них располагались в зонах фиброзных септ [78]. Становится очевидным, что необходимо количественно оценивать эффективность гепатоцитарной дифференцировки при использовании тех или иных типов клеток и выяснять риск образования ими фиброза. Одна из основных задач клеточной биологии – поиск доступного источника клеток с низким профиброгенным потенциалом и высокой

способностью к гепатоцитарной дифференцировке. Кроме того, необходимо, чтобы эти клетки можно было использовать как в аллогенном, так и в аутологичном вариантах.

Перспективным представляется использование прямой дифференцировки клеток, однако, для разработки стандартных протоколов необходимо хорошо понимать молекулярные механизмы процессов, происходящих при развитии и дифференцировке гепатоцитов. Определение основных «дифференцировочных» генов, оптимальных для трансдифференцировки клеток из различных гистогенетических источников, является одной из ключевых задач данного направления.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на данный момент активно разрабатывается ряд принципиально различных подходов к терапии патологий печени с использованием клеточных технологий. Проводится *in vitro* и *in vivo* тестирование разных типов клеток, подбираются оптимальные процедуры дифференцировки. Несмотря на некоторые обнадеживающие результаты, полученные на лабораторных животных, еще не найден достаточно безопасный и эффективный подход. Дефицит донорской печени и донорских гепатоцитов заставляет искать альтернативные источники клеточного материала, однако, на данный момент клетки, способные выполнять в достаточной степени функции гепатоцитов, все еще не получены. Предстоит провести поиск оптимального типа клеток и разработку процедур дифференцировки, удовлетворяющих критериям биологической безопасности и функциональной эффективности. ●

Работа выполнена при поддержке РФФИ  
(проект № 11-04-12061-офи-М-2011).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michalopoulos G.K., Barua L., Bowen W.C. // *Hepatology*. 2005. V. 41. № 3. P. 535–544.
2. Урываева И.В. Стволовые клетки в регенерации печени. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. М.: Медицина, 2009. Т. 2. 456 с.
3. Conigliaro A., Brenner D.A., Kisseleva T. // *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. 2010. V. 3. P. 39–47.
4. Dabeva M.D., Shafritz D.A. // *Semin. Liver Dis.* 2003. V. 23. № 4. P. 349–362.
5. Урываева И.В. // *Цитология*. 1979. Т. 21. С. 1427–1437.
6. Roskams T. // *J. Hepatol.* 2006. V. 45. № 1. P. 1–4.
7. Hussein M.A. // *World J. Gastroenterol.* 2010. V. 28. № 16. P. 4019–4030.
8. Michalopoulos G.K. // *J. Cell Physiol.* 2007. V. 213. № 2. P. 286–300.
9. Thorgeirsson S.S., Factor V.M., Grisham J.W. // *Handbook of Stem Cells*. 2004. V. 2. P. 497–512.
10. Jensen C.H., Jauho E.I., Santoni-Rugiu E., Holmskov U., Teisner B., Tygstrup N., Bisgaard H.C. // *Am. J. Pathol.* 2004. V. 164. № 4. P. 1347–1359.
11. Corcelle V., Stieger B., Gjinovci A., Wollheim C.B., Gauthier B.R. // *Exp. Cell Res.* 2006. V. 10. № 312. P. 2826–2836.
12. Schmelzer E., Zhang L., Bruce A., Wauthier E., Ludlow J., Yao H., Moss N., Melhem A., McClelland R., Turner W., et al. // *J. Exp. Med.* 2007. V. 204. № 8. P. 1973–1987.
13. Theise N.D., Badve S., Saxena R., Henegariu O., Sell S., Crawford J.M., Krause D.S. // *Hepatology*. 2000. V. 31. № 1. P. 235–240.
14. Korbling M., Katz R.L., Khanna A., Ruifrok A.C., Rondon G., Albitar M., Champlin R.E., Estrov Z. // *N. Engl. J. Med.* 2002. V. 7. № 346. P. 738–746.



15. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S., Grompe M. // *Nature*. 2003. V. 24. № 422. P. 897–901.
16. Camargo F.D., Finegold M., Goodell M.A. // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 113. № 9. P. 1266–1270.
17. Pareja E., Martinez A., Cortes M., Bonora A., Moya A., Sanjuan F., Gomez-Lechon M.J., Mira J. // *Cirugia Espanola*. 2010. V. 87. № 3. P. 139–147.
18. Bilir B.M., Guinette D., Karrer F., Kumpe D.A., Krysl J., Stephens J., McGavran L., Ostrowska A., Durham J. // *Liver Transpl.* 2000. V. 6. P. 32–40.
19. Muraca M., Gerunda G., Neri D., Vilei M.T., Granato A., Feltracco P., Meroni M., Giron G., Burlina A.B. // *Lancet*. 2002. V. 359. P. 317–318.
20. Alexandrova K., Griesel C., Barthold M., Heuft H.G., Ott M., Winkler M. // *Cell Transplant.* 2005. V. 14. P. 845–853.
21. Habibullah C.M., Syed I.H., Qamar A., Taher-Uz Z. // *Transplantation*. 1994. V. 58. P. 951.
22. Donato M.T., Serralta A., Jimenez N., Perez G., Castell J.V., Mir J. // *Drug Metab. Dispos.* 2005. V. 33. P. 108–114.
23. Gomez-Lechon M.J., Lahoz A., Jimenez N., Bonora A., Castell J.V., Donato M.T. // *Cell Transplantation*. 2008. V. 17. P. 887–897.
24. Donato M.T., Lahoz A., Montero S., Bonora A., Pareja E., Mir J. // *Cell Transplantation*. 2008. V. 17. P. 1211–1219.
25. Baccarini U., Adani G.L., Sanna A., Avellini C., Sainz-Barriga M., Lorenzin D. // *Transpl. Int.* 2005. V. 18. P. 750–754.
26. Sokal E.M. // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006. V. 29. P. 426–430.
27. Selden C., Hodgson H. // *Transpl. Immunol.* 2004. V. 12. P. 273–288.
28. Horslen S.P., McCowan T.C., Goertzen T.C., Warkentin P.I., Cai H.B., Strom S.C., Fox I.L. // *Pediatrics*. 2003. V. 111. P. 1262–1267.
29. Dhawan A., Mitry R.R., Hughes R.D., Lehec S., Terry C., Bansal S., Arya R., Wade J.J., Verma A., Heaton N.D., et al. // *Transplantation*. 2004. V. 78. P. 1812–1814.
30. Horslen S.P., Fox I.J. // *Transplantation*. 2004. V. 77. P. 1481–1486.
31. Mitry R.R., Dhawan A., Hughes R.D., Bansal S., Lehec S., Terry C., Heaton N.D., Karani J.B., Mieli-Vergani G., Rela M. // *Transplantation*. 2004. V. 77. P. 1614–1616.
32. Khan A.A., Parveen N., Mahaboob V.S., Rajendraprasad A., Ravindrakrishna H.R., Venkateswarlu J., Rao P., Pande G., Narusu M.L., Khaja M.N., et al. // *Transplant. Proc.* 2008. V. 40. P. 1148–1150.
33. Lysy P.A., Najimi M., Stephenne X., Bourgeois A., Smets F., Sokal E.M. // *World J. Gastroenterol.* 2008. V. 14. P. 3464–3470.
34. Smets F., Najimi M., Sokal E.M. // *Pediatr. Transplant.* 2008. V. 12. P. 6–13.
35. Lee K.W., Lee J.H., Shin S.W., Kim S.J., Joh J.W., Lee D.H., Kim J.W., Park H.Y., Lee H.H., et al. // *Cell Transplant.* 2007. V. 16. P. 629–637.
36. Fitzpatrick E., Mitry R.R., Dhawan A. // *J. Internal. Med.* 2009. V. 266. P. 339–357.
37. Snykers S., Henkens T., De Rop E., Vinken M., Fraczek J., De Kock J., De Prins E., Geerts A., Rogiers V., Vanhaecke T. // *J. Hepatol.* 2009. V. 51. P. 187–211.
38. Rambhatla L., Chiu C.P., Kundu P., Peng Y., Carpenter M.K. // *Cell Transplant.* 2003. V. 12. № 1. P. 1–11.
39. Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N., Rivas-Carrillo J.D., Chen Y., Yamatsuji T., Tanaka N., Kobayashi N. // *Cell Transplant.* 2006. V. 15. № 4. P. 335–341.
40. Hay D.C., Fletcher J., Payne C., Terrace J.D., Gallagher R.C., Snoeys J., Black J.R., Wojtacha D., Samuel K., Hannoun Z., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 26. № 105. P. 12301–12306.
41. Mizumoto H., Aoki K., Nakazawa K., Ijima H., Funatsu K., Kajiwara T. // *Transplant. Proc.* 2008. V. 40. № 2. P. 611–613.
42. Weiss T.S., Lichtenauer M., Kirchner S., Stock P., Aurich H., Christ B., Brockhoff G., Kunz-Schughart L.A., Jauch K.W., Schlitt H.J., et al. // *Gut*. 2008. V. 57. P. 1129–1138.
43. Snykers S., Vanhaecke T., De Becker A., Papeleu P., Vinken M., van Riet I., Rogiers V. // *BMC Dev. Biol.* 2007. V. 2. № 7. P. 24.
44. De Kock J., Vanhaecke T., Rogiers V., Snykers S. // *Aatex*. 2008. V. 14. P. 605–611.
45. Seo M.J., Suh S.Y., Bae Y.C., Jung J.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 328. P. 258–264.
46. Sgodda M., Aurich H., Kleist S., Aurich I., Konig S., Dollinger M.M., Fleig W.E., Christ B. // *Exp. Cell Res.* 2007. V. 313. P. 2875–2886.
47. Stock J., Staeger M.S., Muller L.P., Sgodda M., Volker A., Volkmer I., Lutzendorf J., Christ B. // *Transplant. Proc.* 2008. V. 40. P. 620–623.
48. Давыдова Д.А., Воротеляк Е.А., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д., Романов Ю.А., Кабаева Н.В., Терских В.В., Васильев А.В. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 2. С. 112–119.
49. Dawn M.D., De Coppi P., Bartsch G., Atala A. // *Meth. Enzymol.* 2006. V. 419. P. 426–438.
50. Zheng Y.B., Gao Z.L., Xie C., Zhu H.P., Peng L., Chen J.H., Chong Y.T. // *Cell Biol. Internat.* 2008. V. 32. № 11. P. 1439–1448.
51. Drukker M., Katchman H., Katz G., Even-Tov Friedman S., Shezen E., Hornstein E., Mandelboim O., Reisner Y., Benvenisty N. // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 221–229.
52. Agarwal S., Holton K.L., Lanza R. // *Stem Cells*. 2008. V. 26. P. 1117–1127.
53. Charles E.M., Gordon K. // *Cell*. 2008. V. 132. P. 661–680.
54. Song Z., Cai J., Liu Y., Zhao D., Yong J., Duo S., Song X., Guo Y., Zhao Y., Qin H., et al. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 1233–1242.
55. Cai J., Zhao Y., Liu Y., Ye F., Song Z., Qin H., Meng S., Chen Y., Zhou R., Song Y., et al. // *Hepatology*. 2007. V. 45. P. 1229–1239.
56. Kheolamai P., Dickson A.J. // *BMC Mol. Biol.* 2009. V. 10. P. 35.
57. Dong X.J., Zhang G.R., Zhou Q.J., Pan R.L., Chen Y., Xiang L.X., Shao J.Z. // *World J. Gastroenterol.* 2009. V. 7. № 15. P. 5165–5175.
58. Lavon N., Yanuka O., Benvenisty N. // *Differentiation*. 2004. V. 72. P. 230–238.
59. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663–676.
60. Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., et al. // *Mol. Therapy*. 2011. V. 19. № 2. P. 400–407.
61. Chun Y.S., Chaudhari P., Jang Y.Y. // *Int. J. Biol.* 2010. V. 14. № 6. P. 796–805.
62. Hussain S.Z., Strom S.C., Kirby M.R., Burns S., Langemeijer S., Ueda T., Hsieh M., Tisdale J.F. // *Dig. Dis. Sci.* 2005. V. 50. № 10. P. 1755–1763.
63. Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S., Goff J.P. // *Science*. 1999. V. 284. P. 1168–1170.
64. Brulport M., Schormann W., Bauer A., Hermes M., Elsner C., Hammersen F.J., Beerheide W., Spitkovsky D., Harting W., Nussler A., et al. // *Hepatology*. 2007. V. 46. P. 861–870.
65. Jang Y.Y., Collector M.I., Baylin S.B., Diehl A.M., Sharkis S.J. // *Nat. Cell Biol.* 2004. V. 6. P. 532–539.
66. Aurich I., Mueller L.P., Aurich H., Luetzendorf J., Tisljar K., Dollinger M.M., Schormann W., Walldorf J., Hengstler J.G., Fleig W.E., et al. // *Gut*. 2007. V. 56. P. 405–415.
67. Lange C., Bassler P., Lioznov M.V., Bruns H., Kluth D., Zander A.R., Fiegel H.C. // *Transplant. Proc.* 2005. V. 37. P. 276–279.
68. Ryan J.M., Barry F.P., Murphy J.M., Mahon B.P. // *J. Inflamm.* 2005. V. 26. № 2. P. 8.

69. Le Blanc K., Ringden O. // *J. Intern. Med.* 2007. V. 262. P. 509–525.
70. Kuo T.K., Hung S.P., Chuang C.H., Chen C.T., Shih Y.R., Fang S.C., Yang V.W., Lee O.K. // *Gastroenterology*. 2008. V. 134. P. 2111–2121.
71. Chamberlain J., Yamagami T., Colletti E., Theise N.D., Desai J., Frias A., Pixley J., Zanjani E.D., Porada C.D., Almeida-Porada G. // *Hepatology*. 2007. V. 46. P. 1935–1945.
72. Houlihan D.D., Newsome P.N. // *Gastroenterology*. 2008. V. 135. P. 438–450.
73. Gaia S., Smedile A., Omede P., Olivero A., Sanavio F., Balzola F., Ottobrelli A., Abate M.L., Marzano A., Rizzetto M., et al. // *J. Hepatol.* 2006. V. 45. P. 13–19.
74. Gordon M.Y., Levcicar N., Pai M., Bechellier P., Dimarakis I., Al-Allaf F., M'Hamdi H., Thalji T., Welsh J.P., Marley S.B., et al. // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 1822–1830.
75. Lyra A.C., Soares M.B., da Silva L.F., Fortes M.F., Silva A.G., Mota A.C., Oliveira S.A., Braga E.L., de Cervalho W.A., Genser B., et al. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. P. 1067–1073.
76. Mohamadnejad M., Namiri M., Bagheri M., Hashemi S.M., Ghanaati H., Zare Mehrijardi N., Kazemi Ashtiani S., Malekzadeh R., Baharvand H. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. P. 3359–3363.
77. Levcicar N., Pai M., Habib N.A., Tait P., Jiao L.R., Marley S.B., Davis J., Dazzi F., Smadja C., Jensen S.L., et al. // *Cell Prolif.* 2008. V. 41. P. 115–125.
78. Di Bonzo L.V., Ferrero I., Cravanzola C., Mareschi K., Rustichell D., Novo E., Sanavio F., Cannito S., Zamara E., Bertero M., et al. // *Gut*. 2008. V. 57. P. 223–231.
79. Prusa A.R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstschlager M. // *Hum. Reprod.* 2003. V. 18. P. 1489–1493.
80. Tsai M.S., Hwang S.M., Tsai Y.L., Cheng F.C., Lee J.L., Chang Y.J. // *Biol. Reprod.* 2006. V. 74. P. 545–551.
81. Perin L., Sedrakyan S., Da Sacco S., De Filippo R. // *Meth. Cell Biol.* 2008. V. 86. P. 85–99.
82. Zhang P., Baxter J., Vinod K., Tulenko T.N., Dimuzio P. // *Stem Cells Develop.* 2009. V. 18. P. 1299–1308.
83. Давыдова Д.А. // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2010. № 5. С. 517–526.
84. Dabeva M.D., Hwang S.G., Vasa S.R., Hurston E., Novikoff P.M., Hixson D.C., Gupta S., Shafritz D.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 8. № 94. P. 7356–7361.
85. Slack J.M. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. № 5. P. 369–378.
86. Zulewski H., Abraham E.J., Gerlach M.J., Daniel P.B., Moritz W., Muller B., Vallejo M., Thomas M.K., Habener J.F. // *Diabetes*. 2001. V. 50. P. 521–533.
87. Tosh D., Shen C.N., Slack J.M. // *Hepatology*. 2002. V. 36. P. 534–543.
88. Бабаева А.Г., Шубникова Е.А. Структура, функция и адаптивный рост слюнных желез. М.: Изд-во МГУ, 1979. 192 с.
89. Гвазава И.Г., Васильев А.В., Балан О.В., Терских В.В. // *Цитология*. 2011. № 53. С. 129–134.
90. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. // *Hepatology*. 2004. V. 39. P. 667–675.
91. Sato A., Okumura K., Matsumoto S., Hattori K., Hattori S., Shinohara M., Endo F. // *Cloning Stem Cells*. 2007. V. 9. P. 191–205.
92. Matsumoto S., Okumura K., Ogata A., Hisatomi Y., Sato A., Hattori K., Matsumoto M., Kaji Y., Takahashi M., Yamamoto T., et al. // *Cloning Stem Cells*. 2007. V. 9. P. 176–190.
93. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Sudhof T.C., Wernig M. // *Nature*. 2010. V. 25. № 463. P. 1035–1041.
94. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. // *Nature*. 2008. V. 2. № 455. P. 627–632.
95. Huang P., He Z., Ji S., Sun H., Xiang D., Liu C., Hu Y., Wang W., Hui L. // *Nature*. 2011. V. 475. P. 386–389.
96. Kyrnizi I., Hatzis P., Katrakili N., Tronche F., Gonzalez F.J., Talianidis I. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 2293–2305.
97. Zaret K.S. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. P. 329–340.
98. Lee C.S., Friedman J.R., Fulmer J.T., Kaestner K.H. // *Nature*. 2005. V. 16. № 435. P. 944–947.
99. McLin V.A., Rankin S.A., Zorn A.M. // *Development*. 2007. V. 134. № 12. P. 2207–2217.
100. LeCouter J., Moritz D.R., Li B., Phillips G.L., Liang X.H., Gerber H.P., Hillan K.J., Ferrara N. // *Science*. 2003. V. 299. P. 890–893.
101. Suzuki A., Sekiya S., Buscher D., Izpissua Belmonte J.C., Taniguchi H. // *Development*. 2008. V. 135. P. 1589–1595.
102. Margagliotti S., Clotman F., Pierreux C.E., Beaudry J.B., Jacquemin P., Rousseau G.G., Lemaigre F.P. // *Dev. Biol.* 2007. V. 311. P. 579–589.
103. Zong Y., Panikkar A., Xu J., Antoniou A., Raynaud P., Lemaigre F., Stanger B.Z. // *Development*. 2009. V. 136. P. 1727–1739.
104. Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N., Caballero-Corbalan J., Tanaka N., Kobayashi N. // *Acta Med. Okayama*. 2008. V. 62. P. 63–68.
105. Yabaluri N., Bashyam M.D. // *J. Biosci.* 2010. V. 35. P. 473–484.
106. Nagaki M., Moriwaki H. // *Hepatology Res.* 2008. V. 38. P. 961–969.
107. Rausa F.M., Tan Y., Costa R.H. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 437–449.
108. Lazarevich N.L. // *Biochemistry*. 2000. V. 65. P. 117–133.
109. Kumaran V., Joseph B., Benten D., Gupta S. // *Gastroenterology*. 2005. V. 129. P. 1643–1653.
110. Kosone T., Takagi H., Horiguchi N., Kakizaki S., Sato K., Watanabe Y., Mori M. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008. V. 23. P. 260–266.
111. Dagher I., Boudechiche L., Branger J., Coulomb-Lhermine A., Parouchev A., Sentilhes L., Lin T., Groyer-Picard M.T., Vons C., Hadchouel M., et al. // *Transplantation*. 2006. V. 82. P. 1067–1073.
112. Shapiro A.M., Lakey J.R., Ryan E.A., Korbitt G.S., Toth E., Warnock G.L., Kneteman N.M., Rajotte R.V. // *N. Engl. J. Med.* 2000. V. 343. P. 230–238.
113. Wesolowska A., Olszewski W.L., Durluk M. // *Transplant. Proc.* 2003. V. 35. P. 2358–2360.
114. Sagias F., Mitry R.R., Hughes R.D., Dhawan A. // *40th Annu. Meet. Espghan*. 2007. V. 3. P. 58.
115. Walkup M.H., Gerber D.A. // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 1833–1840.
116. Behbahan I.S., Duan Y., Lam A., Khoobyari S., Ma X., Ahuja T.P., Zern M.A. // *Stem Cell Rev. Rep.* 2011. V. 7. P. 748–759.

УДК 581.1

# Свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов

С. Н. Ломин<sup>1</sup>, Д. М. Кривошеев<sup>1</sup>, М. Ю. Стеклов<sup>1</sup>, Д. И. Осолодкин<sup>2</sup>, Г. А. Романов<sup>1,3\*</sup><sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35<sup>2</sup>Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

\*E-mail: gar@ippras.ru

Поступила в редакцию 19.04.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Цитокинины – одни из самых важных и известных гормонов растений. Открытые более полувека назад, цитокинины неизменно привлекают внимание исследователей многообразием своего действия на рост и развитие растений, участием в адаптации к внешним условиям, возможностью применения в биотехнологии, сельском хозяйстве, медицине и даже в косметике. Однако молекулярный механизм действия цитокининов долгое время оставался неизвестным, он начал проявляться только в 21 веке после открытия рецепторов этих фитогормонов. Как оказалось, растения адаптировали для сигналинга цитокининов двухкомпонентную систему передачи сигнала, позаимствованную у прокариотических организмов. В обзоре рассмотрены достижения последних лет в области изучения молекулярных основ восприятия и трансдукции цитокининового сигнала. Основное внимание уделено рецепторам цитокининов, их доменной и пространственной структуре, субклеточной локализации, сигнальной активности и влиянию мутаций, лигандсвязывающим свойствам и филогении.

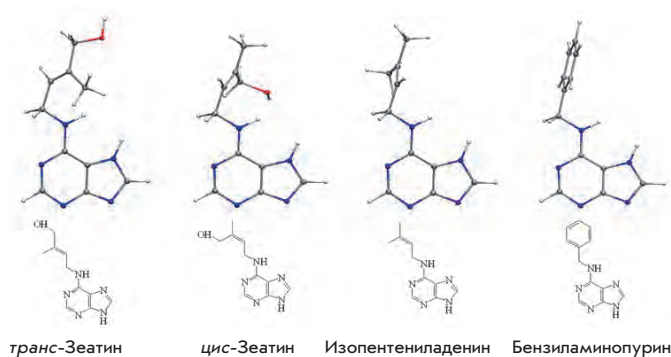
**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** цитокинины, рецепторы, сенсорные гистидинкиназы, двухкомпонентные системы, передача сигнала.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** НК – гистидинкиназа; НР – фосфотрансмиттер; RR – регулятор ответа; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

## ВВЕДЕНИЕ

Цитокинины, наряду с ауксинами, гиббереллинами, абсцизовой кислотой и этиленом, относятся к классическим гормонам растений. Цитокинины обнаружили в лаборатории Ф. Скуга в 1955 г. [1] и назвали так из-за их способности активировать деление (цитокinesis) растительных клеток *in vitro*. По структуре природные цитокинины представляют собой производные аденина с небольшим заместителем в N<sup>6</sup>-положении (рис. 1). У большинства цитокининов в этом положении находится изопентенильная группа (например, у зеатина, изопентениладенина), хотя заместитель может быть и ароматическим (N<sup>6</sup>-бензиладенин, кинетин). Цитокининовой активностью обладают также отдельные синтетические производные фенилмочевины (тидазулон и др.). Цитокинины влияют на целый ряд физиологических процессов: стимулируют деление и рост клеток, дифференцировку пластид, задерживают старение листьев, активируют приток

метаболитов, а также образование побегов из каллусов в культуре (см. обзоры [2–5]). Цитокинины активно используются в биотехнологии и агропроизводстве для выращивания культур клеток растений в биореакторах, микроразмножения (клонирования) полезных растений, получения трансгенных растений, регуляции пола растений, дефолиации хлопчатника и др. [4, 5]. Цитокинины участвуют в минеральном питании растений, формировании азотфиксирующих клубеньков на корнях, влияют на устойчивость растений к неблагоприятным факторам, а также на размер зерна злаков, т.е. на урожайность [6–8]. В последние годы цитокинины и родственные им соединения находят все более широкое применение в медицине и косметологии, их используют в качестве противоопухолевых средств и ингибиторов нейродегенеративных процессов, а также как активный ингредиент в мазях для предотвращения возрастных изменений кожного покрова [4, 9, 10].



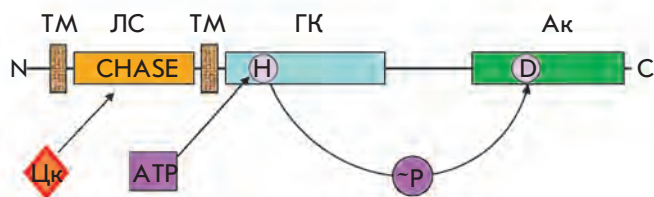
**Рис. 1.** Структуры типичных цитокининов. Вверху показаны наиболее вероятные пространственные конфигурации цитокининов, внизу – их химическое строение в традиционном представлении.

За последние 15 лет достигнут заметный прогресс в выяснении молекулярного механизма действия цитокининов, причем важную роль сыграло секвенирование генома модельного растения *Arabidopsis thaliana* [11]. Особое значение имело обнаружение ключевых компонентов восприятия и передачи гормонального сигнала в клетке – рецепторов. В 2001 г. были опубликованы четыре статьи, посвященные идентификации и характеристике рецепторов цитокининов арабидопсиса [12–15]. Был охарактеризован рецептор, получивший название CRE1 (Cytokinin Response 1), или АНК4 (*Arabidopsis* Histidine Kinase 4). Еще раньше обнаружили мутацию, которая проявлялась укорочением корня арабидопсиса при отсутствии там флоэмы (*wooden leg*, или сокращенно *wol*). Эта мутация затрагивала тот же самый ген, названный *WOL* [16]. Наряду с геном *CRE1/АНК4/WOL* в геноме арабидопсиса выявили два его паралога, названные *АНК2* и *АНК3* [13, 14, 16, 17]. Таким образом, у арабидопсиса обнаружены три рецептора цитокининов, которые представляют собой сходные по структуре трансмембранные белки с массой более 100 кДа.

В настоящем обзоре рассмотрены основные вопросы, связанные с узнаванием и сигналингом цитокининов: доменная структура рецепторов; биохимические основы восприятия и передачи сигнала; субклеточная локализация, лигандсвязывающие свойства и влияние мутаций на свойства рецепторов; пространственная структура рецепторов; появление и эволюция рецепторов у растений.

### ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ

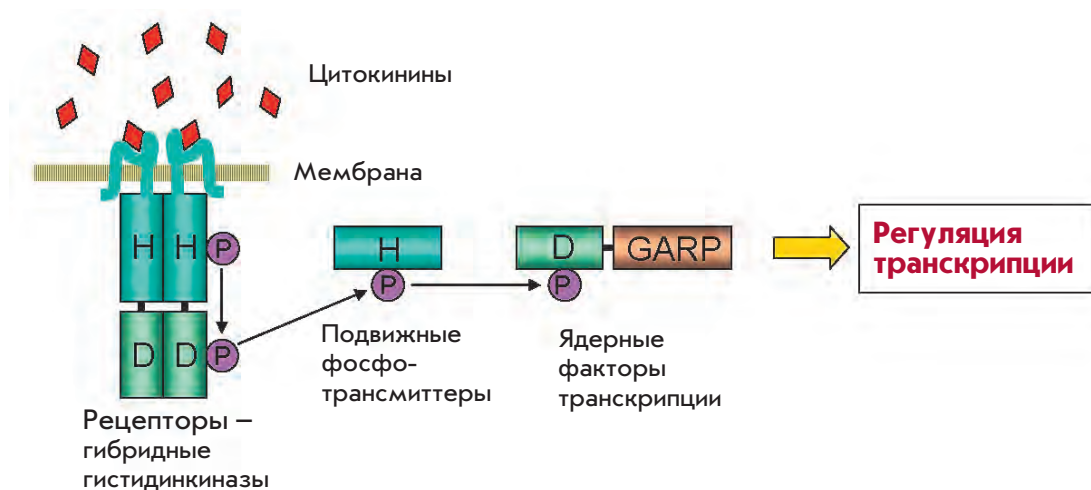
Рецепторы цитокининов относятся к типу каталитических рецепторов, они имеют сложную мульти-



**Рис. 2.** Доменная структура рецептора цитокининов (на примере CRE1 / АНК4 арабидопсиса). Домены белка: ТМ – трансмембранный; ЛС – лигандсвязывающий (CHASE); ГК – гистидинкиназный; Ак – акцепторный; Цк – цитокинины; (H) – консервативный остаток гистидина; (D) – консервативный аспартат. N и C – N- и C-концы белка. Стрелки справа указывают на сайты фосфорилирования и переноса высокоэнергетического фосфата ( $-P$ ).

доменную структуру (рис. 2). Гормонсвязывающей активностью обладает так называемый CHASE-домен (Cyclase/Histidine kinase Associated Sensory Extracellular) [18, 19], расположенный на N-конце молекулы рецептора. С двух сторон этого сенсорного домена находятся два или более трансмембранных домена. За последним трансмембранным доменом следует каталитический домен с гистидинкиназной активностью. Коровая часть этой области состоит из димеризационного домена и АТФ/АДП-связывающего фосфотрансферного домена. Димеризационный домен (А-домен) состоит из двух примыкающих друг к другу так называемых *two-stranded coiled-coils*. А-домены двух рецепторов могут взаимодействовать, образуя четырехспиральный узел. Согласно современным представлениям, каждая из гистидинкиназ в димере фосфорилирует другую (реакция *in trans*) [20]. В фосфотрансферном домене имеется консервативный сайт (H-box) общей структуры  $-ATVSH $\underline{E}$ IRTP-$ , в центре которого располагается фосфорилируемый остаток гистидина.

В связывании АТФ участвуют четыре консервативных мотива: N-, G1-, F- и G2-боксы. Возможно, они участвуют также в катализе и переносе остатка фосфата. На C-конце рецептора находится ресиверный (принимающий) домен с остатком консервативного акцепторного аспартата в последовательности, обозначаемой как DD-D-K. У цитокининовых рецепторов между областью гистидинкиназы и ресиверным доменом находится псевдоресиверный домен, сходный по структуре с ресиверным, но не способный к приему фосфата от консервативного остатка гистидина [21, 22]. Функция псевдоресиверного домена пока не ясна.



**Рис. 3.** Схема передачи цитокининового сигнала по принципу многоступенчатого (His-Asp-His-Asp) фосфопереноса. Фосфорилирование ядерных факторов транскрипции (регуляторов ответа типа В) приводит к их активации и воздействию на транскрипцию генов первичного ответа.

Таким образом, по своей общей структуре рецепторы цитокининов принадлежат к группе мембранных сенсорных гистидинкиназ и обладают гомологией с некоторыми другими сенсорными белками растений: рецепторами этилена и фитохромами [22, 23].

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПЕРЕДАЧИ ЦИТОКИНИНОВОГО СИГНАЛА

Рецепторы цитокининов структурно и функционально родственны сенсорным гистидинкиназам двухкомпонентных систем передачи сигналов, широко распространенным у прокариот и найденным также у ряда эукариот, кроме животных [20, 24]. Классическая двухкомпонентная система прокариот состоит из двух белков: сенсорной гистидинкиназы и регулятора ответа (обычно фактора транскрипции). Под влиянием внешних воздействий гистидинкиназа активируется, автофосфорилируется и далее передает высокоэнергетический фосфат регулятору ответа. В двухкомпонентных системах фосфат переносится от консервативного остатка гистидина одной белковой молекулы (гистидинкиназы) на консервативный остаток аспартата другой (ресиверного домена регулятора ответа) (phosphorelay). Фосфорилирование регулятора ответа вызывает его активацию, что, в свою очередь, включает транскрипцию определенного гена или набора генов [25].

В случае рецепции цитокининов схема передачи сигнала усложнена, так как ресиверный домен включен в состав сенсорной гистидинкиназы (гибридный тип белка). При этом сигнал передается по эстафетному принципу многоступенчатого (His-Asp-His-Asp) фосфопереноса (multistep phosphorelay) (рис. 3). При связывании гормона с сенсорным CHASE-доменом происходит фосфорилирование консерва-

тивного остатка гистидина в образованном димере гистидинкиназ. Затем этот фосфат переносится внутримолекулярно на остаток консервативного аспартата ресиверного домена гистидинкиназы, а оттуда на консервативный остаток гистидина подвижного низкомолекулярного белка-фосфотрансмиттера (АНР), который постоянно курсирует между цитоплазмой и ядром клетки [26]. Когда фосфорилированный фосфотрансмиттер оказывается в ядре, он передает высокоэнергетический фосфат на остаток консервативного аспартата в ресиверном домене регулятора ответа. Данный белок, являющийся, как правило, фактором транскрипции, при фосфорилировании переходит в активное состояние и становится способным регулировать (обычно активировать) транскрипцию генов первичного ответа [27–29]. Регуляция биосинтеза мРНК гена первичного ответа цитокининами зависит только от (нетранскрибируемого) промотора, т.е. происходит на стадии инициации транскрипции [4].

### ОСОБЕННОСТИ СИГНАЛИНГА ЦИТОКИНИНОВ У АРАБИДОПСИСА

Первые рецепторы цитокининов были обнаружены у арабидопсиса, а их способность воспринимать гормональный сигнал подтвердили в опытах с трансформированными бактериями и дрожжами. Экспрессия цитокининовых рецепторов растений в этих одноклеточных организмах приводила к появлению у них способности активно реагировать на низкие (гормональные) концентрации цитокининов [12–14, 30, 31]. Роль этих белков *in vivo* как рецепторов подтвердили при изучении инсерционных мутантов арабидопсиса. В целом, выключение одного рецептора не приводило к каким-либо заметным изменениям фенотипа рас-

тений. Однако выключение двух и особенно всех трех рецепторов имело серьезные последствия. При инактивации всех рецепторов тройной мутант оказывался нечувствительным к цитокипинам и представлял собой стерильное карликовое растение с пониженной жизнеспособностью [32–34].

Рецепторы функционально дополняют друг друга, хотя в ряде процессов они не равнозначны. Рецептор CRE1/АНК4 активно экспрессируется в корнях, тогда как АНК3 превалирует в листьях. В соответствии с этим цитокининовые эффекты в надземной части растения больше зависят от рецептора АНК3, тогда как в подземной – от CRE1/АНК4 [4]. У арабидопсиса среди элементов двухкомпонентной системы идентифицировано пять типичных фосфотрансмиттеров (АНР) и 22 регулятора ответа. Фосфотрансмиттеры представляют собой небольшие белки размером около 17 кДа [35]. Как и рецепторы, белки АНР функционируют аддитивно в передаче цитокининового сигнала, а мутант по всем пяти генам обладал резко сниженной чувствительностью к цитокипинам и фенотипически напоминал тройной мутант по рецепторам [36–39]. Основную роль в передаче цитокининового сигнала играют АНР 1, 2, 3 и 5. Согласно современным представлениям, белки АНР постоянно курсируют между ядром и цитоплазмой, и паттерн их локализации не зависит от их фосфорилирования [26, 35, 40].

Еще один белок арабидопсиса, структурно напоминающий фосфотрансмиттер, – АНР6. Однако этот белок относится к псевдоАНР, так как не содержит консервативного остатка гистидина, необходимого для переноса фосфата. При этом АНР6 может связываться как с рецепторами, так и с регуляторами ответа, ингибируя их взаимодействие с типичными фосфотрансмиттерами и являясь таким образом негативным регулятором передачи сигнала цитокинина [41].

Регуляторы ответа арабидопсиса подразделяют на три группы – А, В и С, при этом существует еще группа белков-псевдорегуляторов [42]. Настоящими транскрипционными факторами являются регуляторы ответа В-типа (ARR-В), которые содержат как фосфорилируемый N-концевой ресиверный домен, так и особый В-мотив, который включает ДНК-связывающий GARP-домен и глутамин-богатый домен [43–46]. Благодаря сигналам ядерной локализации (NLS) регуляторы ответа В-типа локализируются в ядре. Всего насчитывается 11 генов *ARR-В*, однако регуляторы ответа В-типа не равнозначны в передаче цитокининового сигнала. Особое значение имеют гены *ARR1*, *10* и *12*: тройной мутант с нокаутом этих генов фенотипически сходен с тройным мутантом по цитокининовым рецепторам [47–49]. Экспрессия генов регуляторов ответа В-типа цитоки-

пинами не регулируется [28, 29, 50, 51]. Важно отметить, что получены прямые доказательства взаимодействия белков – компонентов передачи сигнала, их способности отдавать и принимать фосфат как предусмотрено схемой на рис. 3 [13, 36, 38].

В отличие от ARR-В, гены регуляторов ответа А-типа (ARR-А) быстро активируются цитокипинами и относятся к генам первичного ответа на эти гормоны [27–29, 52]. ARR-А состоят из типичного ресиверного домена и небольшого С-концевого фрагмента. Регуляторы ответа А-типа могут принимать фосфат с фосфотрансмиттеров подобно регуляторам В-типа, но при этом они не способны вызвать характерный транскрипционный ответ. Совокупность наблюдений позволяет заключить, что ARR-А играют роль негативных регуляторов передачи сигнала, причем консервативный остаток аспартата необходим для реализации их ингибиторного эффекта [53–55]. Комплексный мутант по генам регуляторов ответа А-типа характеризуется повышенной чувствительностью к цитокинину. Предполагается, что регуляторы ответа А-типа могут подавлять передачу сигнала цитокинина с белков АНР, конкурируя с регуляторами В-типа за высокоэнергетический фосфат. Таким образом, с участием ARR-А в системе передачи цитокининового сигнала осуществляется отрицательная обратная связь. Регуляторы ответа С-типа, хотя и сходны по структуре с ARR-А, не индуцируются цитокипинами и, по-видимому, не играют заметной роли в передаче цитокининового сигнала [42, 56]. Отметим, что рецептор CRE1/АНК4 в отсутствие цитокинина функционирует как фосфатаза, удаляя фосфат с АНР-белков и тем самым выключая передачу сигнала и с других цитокининовых рецепторов [57]. В целом, многочисленные исследования на растениях арабидопсиса убедительно показывают, что передача цитокининового сигнала осуществляется по типу двухкомпонентных систем с гибридными гистидинкиназами в качестве рецепторов.

### СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

Цитокининовый рецептор является интегральным трансмембранным белком, CHASE-домен которого расположен по одну сторону от мембраны, а гистидинкиназный и ресиверный домены – по другую. Вначале полагали, что рецепторы цитокининов локализованы на плазматической мембране, при этом считалось очевидным, что CHASE-домен должен располагаться вне клетки, а остальная часть белка – внутри клетки. Данное предположение отчасти основывалось на предсказании субклеточной локализации с помощью компьютерных программ [12, 14, 16], а также на аналогии с бактериальной клеткой, у которой CHASE-домен сенсорных белков находит-

ся вне клетки (что отражено в самом названии домена). В подтверждение этому появилось сообщение о локализации цитокининового рецептора в плазмалемме, основанное на результатах экспрессии конструкции *АНК3-GFP* в протопластах арабидопсиса [58]. Локализация рецепторов цитокининов на плазматической мембране предполагает, что цитокининовый сигнал поступает в клетку из окружающей среды за счет внеклеточных цитокининов. С другой стороны, определение рН-зависимости связывания цитокинина рецепторами показало, что это связывание оптимально в нейтральной и слабощелочной среде, типичной для цитоплазмы, и резко снижается в условиях закисления, характерных для внеклеточного пространства (апопласта) [59]. Это, наоборот, указывало на внутриклеточную локализацию рецептора. Поэтому изучение субклеточной локализации рецепторов цитокининов было продолжено.

Недавно опубликовали сразу три статьи о том, что рецепторы (по крайней мере, основная их часть) локализованы внутри клетки на мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР) [60–62]. Опыты с субклеточными органеллами выявили высокоаффинные сайты связывания  $^3\text{H}$ -*транс*-зеатина во фракции мембран (микросом), но не во фракциях митохондрий и хлоропластов [60]. После разделения микросом в водной полимерной двухфазной системе на плазмалемму и эндомембраны оказалось, что высокоаффинные сайты приурочены в основном к фракции эндомембран как у арабидопсиса [61], так и у кукурузы [60]. С учетом преобладания эндомембран в клетке рассчитали, что более 90% сайтов связывания гормона находятся внутри клетки.

Изучение локализации сшитых с флуоресцентными белками рецепторов арабидопсиса, экспрессированных в листьях табака [61, 62], и рецептора кукурузы *ZmHK1* в протопластах из листьев кукурузы [60] показало, что распределение флуоресценции соответствует сети эндоплазматического ретикулума. В случае рецептора *АНК3* картина флуоресценции совпала с картиной маркера эндоплазматического ретикулума, но не маркера плазмалеммы [61, 62]. Кроме того, белок *АНК3* был гликозилирован *in vivo* по сайтам, чувствительным к гликозидазе эндоН, что указывает на локализацию в ЭР [62]. В контрольных экспериментах аналогичное гликозилирование регистрировалось у рецептора этилена *ERS1*, интегрированного в ЭР [63, 64], тогда как у гистидинкиназы *АНК1*, локализованной в плазмалемме, потенциальные эндоН-сайты не гликозилировались [62].

Важно отметить, что выявленная с помощью флуоресценции внутриклеточная локализация цитокининовых рецепторов наблюдалась при различных условиях экспрессии встроенных генов с использо-

ванием промоторов разной силы. Однако наиболее убедительный результат получен при анализе локализации рецепторов, экспрессируемых в естественных условиях. Такой подход был реализован с применением иммуноблотинга с антителами против рецептора кукурузы *ZmHK1*. Анализировали мембранные фракции, полученные после их разделения в градиенте сахарозы в присутствии и в отсутствие катионов магния [60]. В отсутствие магния рибосомы диссоциируют от ЭР, что смещает положение ЭР к верхней части градиента. Такое смещение не происходит в присутствии в среде магния. Этот эффект, известный как Mg-сдвиг, характерен именно для ЭР, но не для других мембран, не связанных с рибосомами. Анализ фракций из клеток кукурузы показал, что белок *ZmHK1* претерпевает Mg-сдвиг и колокализуется с белком-маркером ЭР (*BiP*) [60].

Получены стабильные трансформанты арабидопсиса, экспрессирующие гены рецепторов *АНК2* или *АНК3* под собственными промоторами и с Мус-пептидом на С-конце белка. Экспрессия этих конструкций компенсировала фенотип двойного мутанта арабидопсиса по генам *ahk2* и *ahk3*, что свидетельствовало о функциональности таких модифицированных рецепторов. При анализе мембранных фракций с помощью иммуноблотинга с антителами против Мус были также выявлены типичный Mg-сдвиг и корреляция с маркером ЭР [61].

Совокупность всех этих данных дает основание заключить, что рецепторы цитокининов в основном локализованы в эндоплазматическом ретикулуме. Этот результат, вместе с данными о способности ЭР-локализованных рецепторов связывать цитокинины и типичной для цитоплазматических белков рН-зависимости этого связывания, может указывать на то, что рецепция цитокининового сигнала происходит главным образом внутри клетки, и решающую роль в этом процессе играют внутриклеточные цитокинины. Однако при этом нельзя исключить присутствия небольшого количества рецепторов и на плазматической мембране. Эти рецепторы могут отвечать за восприятие сигнала внеклеточных цитокининов. Для оценки функциональных качеств каждого пула цитокининовых рецепторов необходимы дальнейшие исследования.

### ЛИГАНДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ

Цитокинины (как и гиббереллины) представлены в растении большим количеством изоформ (рис. 1), среди которых обычно преобладают *транс*- и *цис*-зеатины, изопентениладенин, дигидрозеатин (основания), их  $\text{N}^9$ -рибозидные производные (рибозиды) и  $\text{N}^9$ -рибозидфосфатные производные (нуклеотиды). Встречаются также ароматические цитокинины, та-

Таблица 1. Ряды аффинности цитокининов для рецепторов арабидопсиса и кукурузы

Вид	Рецептор*	Ряд аффинности цитокининов**
<i>Zea mays</i>	ZmHK1	iP ≥ BA >> tZ ≥ cZ >> DZ >> Ade
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CRE1/АНК4	iP ≥ tZ > BA > DZ > cZ >> Ade
<i>Zea mays</i>	ZmHK2	tZ ≥ iP > DZ > BA > cZ >> Ade
<i>Arabidopsis thaliana</i>	АНК3	tZ > DZ > iP > cZ > BA >> Ade
<i>Zea mays</i>	ZmHK3a	iP > tZ > BA > cZ >> DZ >> Ade
<i>Arabidopsis thaliana</i>	АНК2	iP > tZ > BA > cZ > DZ >> Ade

\*Рецепторы-ортологи сгруппированы попарно.

\*\*Цитокинины: iP – изопентениладенин; BA – N<sup>6</sup>-бензиламинопурин; tZ – транс-зеатин; cZ – цис-зеатин; DZ – дигидрозеатин. Ade – аденин.

кие, как N<sup>6</sup>-бензиладенин и производные, тополины и некоторые другие [4, 5, 65]. Цитокинины перемещаются в растении по транспортным каналам: снизу вверх из корня в побег по ксилеме и сверху вниз и в других направлениях по флоэме. При этом наборы цитокининов в ксилеме и флоэме различны: в ксилеме преобладают цитокинины транс-зеатинового типа, в основном транс-зеатин-рибозид, тогда как во флоэме – цитокинины изопентенильного типа нередко плюс цис-зеатин [66–68].

Физиологическая роль каждой изоформы цитокининов определяется ее сродством к рецептору, поэтому изучение взаимодействия цитокинин–рецептор и лигандной специфичности рецепторов имеет важное значение. Лигандсвязывающие свойства цитокининовых рецепторов исследовали главным образом с помощью гетерологичных модельных систем, при экспрессии генов рецепторов в трансформированных клетках бактерий (*Escherichia coli*) или дрожжей. При этом рецепторы растений оказались способными функционально замещать мутантные сенсорные гистидинкиназы одноклеточных организмов сходной (гибридной) структуры [12, 13, 30].

На основе указанных модельных систем проводили как функциональные тесты [13, 15, 30, 69, 70], так и опыты по связыванию рецептора с гормоном [59, 60, 71, 72]. В целом, как и ожидалось, сродство гормона к рецептору положительно коррелировало со способностью гормона вызывать биологический ответ [59, 71]. транс-Зеатин является одним из самых активных лигандов большинства изученных рецепторов, с  $K_d$  гормон–рецепторного комплекса в диапазоне 1–10 нМ. Такие значения констант характерны для высокоаффинных гормон–рецепторных взаимо-

действий. Заметим, что эти значения констант близки к измеренным концентрациям транс-зеатина в живых растениях [34, 66, 68, 73]. Скотчардовский анализ показал наличие одного сайта связывания лиганда рецептором, без признаков кооперативности взаимодействия [59, 74]. При этом природные (производные N<sup>6</sup>-аденина) и синтетические (тидиазурон – производное фенилмочевины) цитокинины связывались с одним и тем же сайтом рецептора [59].

Однако рецепторы различаются по предпочтению разных изоформ цитокининов [59, 60, 75]. Так, рецепторы арабидопсиса CRE1/АНК4 и АНК2 имеют высокое и сходное сродство к транс-зеатину и изопентениладенину, но существенно более низкое сродство к дигидрозеатину. Рецептор АНК3, напротив, имеет относительно высокое сродство к дигидрозеатину, но более низкое – к изопентениладенину. Все три рецептора арабидопсиса способны связывать, хотя и с низким сродством, также и цис-зеатин. Глюкозилирование цитокинина по атомам азота N3 или N7, а также кислорода боковой цепи блокирует связывание гормона с рецептором [30, 59].

Лигандная специфичность рецепторов цитокининов изучена также у однодольного растения кукурузы, три рецептора которой являются ортологами рецепторов двудольного арабидопсиса: ZmHK1 – ортолог CRE1/АНК4; ZmHK2 – ортолог АНК3; ZmHK3 – ортолог АНК2 [76]. У рецепторов кукурузы обнаружили черты сходства и различий с рецепторами арабидопсиса [60, 76]. В целом, ряды относительной активности лигандов оказались довольно сходными у ортологов кукурузы и арабидопсиса (табл. 1). Если в отношении ZmHK1 и ZmHK3 изопентениладенин более активен, чем транс-



зеатин, то в случае ZmHK2 наблюдалась обратная картина. Еще более резкое различие между рецепторами кукурузы проявляется при их взаимодействии с дигидрозеатином: сродство ZmHK2 к этому цитокинину более чем на два порядка выше, чем у ZmHK1 и ZmHK3. Особенностью рецепторов кукурузы является их относительно высокое сродство к *цис*-зеатину, при этом у ZmHK1 сродство к *транс*- и *цис*-зеатинам практически одинаково. Эта особенность рецепторов кукурузы согласуется с повышенной концентрацией *цис*-зеатина в растениях данного вида [77, 78].

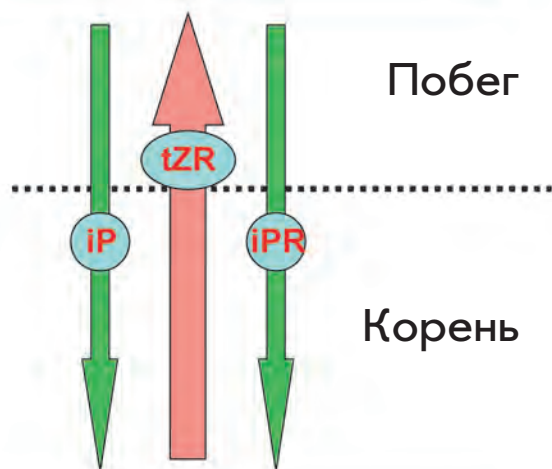
Закономерности лигандной специфичности рецепторов можно объяснить с учетом их возможной роли в дальнедистанционной сигнализации в растении. Рецепторы арабидопсиса ANK3 и их кукурузные ортологи ZmHK2 экспрессируются в основном в побеге и контролируют процессы метаболизма в листьях. Эти рецепторы «настроены» в первую очередь на цитокинины типа *транс*-зеатина, т.е. на цитокинины, поступающие в побег из корней. В свою очередь, рецепторы CRE1/ANK4 и ZmHK1, преобладающие в корнях, активно реагируют на изопентениладенин, главный цитокинин флоэмы, поступающий в корни из побега вместе с флоэмным соком (рис. 4). Таким образом может осуществляться сигнальный обмен между разными частями и органами растительного организма, при котором цитокининовые сигналы отдаленного органа оказываются более значимыми для клетки, чем сигналы из близкорасположенных тканей [4, 59, 79].

#### ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ НА АКТИВНОСТЬ РЕЦЕПТОРОВ

Открытие рецепторов цитокининов связано с обнаружением мутации арабидопсиса, названной *wooden leg* (*wol*). Мутантные растения отличались от растений дикого типа уменьшением длины и нарушением развития проводящей системы главного корня: она была представлена только протоксилемой (формирования метаксилемы и флоэмы не происходило), а общее число клеток было значительно снижено. Кроме того, у растений отсутствовали боковые корни и наблюдалось усиленное образование придаточных корней. Фенотипическое проявление этой мутации впервые описали в 1995 г. [80].

Впоследствии установили, что мутация *wol* локализована в гене сенсорной гистидинкиназы CRE1/ANK4 и представляет собой замену треонина-278 (по современной нумерации треонина-301) на изолейцин в гормонсвязывающем CHASE-домене [12, 15, 16]. Позднее с помощью химического мутагенеза получили мутацию *wol-2*, при которой лейцин-529 заменяется на фенилаланин [81], *wol-3*, при которой метионин-459 меняется на изолейцин [82], а также

«Листовые» рецепторы чувствительны к Цк tZ-типа



«Корневые» рецепторы чувствительны к Цк iP-типа

Рис. 4. Модель дальнедистанционного действия цитокининов. Стрелка в центре – перемещение цитокининов (Цк) *транс*-зеатинового типа из корня в побег по ксилеме. Латеральные стрелки – перемещение цитокининов изопентенильного типа из побега в корень по флоэме.

*cre1-1*, в которой глицин-490 заменен на аспаратат [12]. Все эти мутации также имеют типичный *wol*-фенотип, обусловленный недоразвитием проводящей системы вследствие уменьшения числа инициальных клеток в меристеме по причине блокирования клеточных делений [16]. В результате дефектов проводящей системы затруднено поступление ауксинов к перикарпу, вследствие чего не закладываются боковые корни. Вместе с тем нарушение проводящей системы главного корня ведет к накоплению ауксинов в области гипокотыля, что, в свою очередь, стимулирует образование придаточных корней. Интересно отметить, что у мутантов *wol-3* в придаточных корнях, в отличие от главного, наблюдалось нормальное развитие проводящей системы [82].

С использованием радиолигандного метода показано, что мутация *wol* приводит к потере рецептором способности связывать цитокинины [15]. Однако введение стоп-кодона в мутантный ген CRE1/ANK4 восстанавливало фенотип дикого типа у растений *wol* [57]. Поэтому было логично предположить, что му-

тантный рецептор CRE1/АНК4 не просто перестает участвовать в передаче цитокининового сигнала, но и подавляет передачу этого сигнала от других рецепторов, АНК2 и АНК3. Ранее установили, что некоторые гистидинкиназы бактерий обладают не только киназной, но и фосфатазной активностью, действие которой приводит к дефосфорилированию фосфопротеинов [83]. В опытах *in vitro* и с использованием трансгенных дрожжей было показано, что CRE1/АНК4 также обладает конститутивной фосфатазной активностью, а его гистидинкиназная активность проявляется только в присутствии цитокининов [57]. Таким образом, мутация *wol*, лишаящая CRE1/АНК4 способности связывать цитокинин, блокирует его гистидинкиназную активность при сохранении фосфатазной. Вследствие этого CRE1/АНК4 с мутацией *wol* дефосфорилирует белки-фосфотрансмиттеры, фосфорилированные рецепторами АНК3 и АНК2, блокируя тем самым передачу цитокининового сигнала. CRE1/АНК4 превалирует в клетках корня [17, 32], поэтому мутантный *wol*-фенотип проявляется в основном в корнях.

Аналогичные мутации в CHASE-доме рецепторов АНК3 и АНК2 не приводили к появлению *wol*-подобного фенотипа [31]. Это указывает на отсутствие фосфатазной активности у рецепторов АНК2 и АНК3.

Таким образом, выявлен ряд мутаций рецептора CRE1/АНК4, приводящих к возникновению типичного *wol*-фенотипа. Показано, что при всех этих мутациях рецептор прекращает передавать цитокининовый сигнал, хотя только мутация *wol* (*wol-1*) локализуется в CHASE-доме. Мутация *wol-3* расположена в участке, лежащем между вторым трансмембранным и гистидинкиназным доменами, а *wol-2* и *cre1-1* – в гистидинкиназном домене.

В целом, анализ мутаций позволил подтвердить и уточнить функции отдельных частей цитокининовых рецепторов. Изолированный CHASE-дом с соседствующими трансмембранными доменами сохранял способность к высокоаффинному связыванию цитокинина, тогда как рецептор без CHASE-домена этой способности лишался [84]. Другие мутации в этом домене также подавляли связывание гормона рецептором [84]. Таким образом, не вызывает сомнений, что именно CHASE-домен выполняет функцию связывания гормона.

Хотя мутации CHASE-домена в абсолютном большинстве случаев нарушали функционирование рецепторов, у рецептора АНК3 найдена мутация этого домена, приводящая к конститутивной активности гистидинкиназы [58]. При этой мутации, названной *ore12-1*, пролин-243, расположенный в самой середине CHASE-домена, заменялся на серин. Предпо-

лагается, что подобная замена аминокислот может приводить к изменению структуры CHASE-домена, сходному с изменением, которое вызывает связывание цитокинина [58].

Известно, что особую функцию в молекулах сенсорных гибридных гистидинкиназ выполняют консервативные остатки гистидина и аспартата, фосфорилирование которых происходит в ходе передачи сигнала. Замены этих остатков (His482Gln и Asp996Asn) приводили к потере как гистидинкиназной активности, так и способности CRE1/АНК4 реагировать на цитокинины [12]. Замена Asp996Asn приводила также к полной утрате фосфатазной активности, в то время как замена гистидина – лишь к ее незначительному снижению [57]. Кроме того, замена His482Gln не влияла на способность рецептора связывать цитокинины [84].

С использованием ПЦП получен ряд мутаций в CRE1/АНК4: Gly435Cys, Phe436Ser, Met447Thr во втором трансмембранном домене, Val471Ala на участке между вторым трансмембранным и гистидинкиназным доменами и Met494Leu в гистидинкиназном домене. Все эти мутации расположены на коротком участке длиной примерно 60 аминокислотных остатков между лигандсвязывающим доменом и консервативным остатком гистидина, важным для автофосфорилирования белка [31]. Эти мутации приводили к появлению у CRE1/АНК4 конститутивной гистидинкиназной активности, т.е. этот рецептор приобретал способность посылать сигнал вне зависимости от присутствия цитокининов в среде. При этом мутантные рецепторы сохраняли способность связывать цитокинины, что подтверждено опытами по связыванию меченного тритием изопентениладенина данными рецепторами в составе мембран *Schizosaccharomyces pombe*. Интересно отметить, что рецептор CRE1/АНК4 с мутацией Phe436 сохранял свою конститутивную гистидинкиназную активность даже при дополнительном введении мутации *wol*, несмотря на потерю способности связывать цитокинин. Таким образом, при наличии данных конститутивных мутаций способность рецептора связывать цитокинины не имеет значения для передачи сигнала [31].

Введение мутаций в те же области других рецепторов цитокининов также может привести к сходному результату. Так, замены консервативных гидрофобных аминокислот в рецепторах АНК2 (Ile586Ala) и АНК3 (Val449Ala), аналогичные замене Val471Ala в рецепторе CRE1/АНК4, приводили к появлению у рецепторов конститутивной гистидинкиназной активности [31]. Возможно, что замены аминокислот во втором трансмембранном домене и нижележащем (*downstream*) участке приводят к конформационным изменениям в молекуле белка, аналогичным тем, ко-

торые возникают при связывании рецептором цитокинина, стимулируя тем самым гистидинкиназную активность в отсутствие гормона.

Исходя из структуры цитокининового рецептора, естественно ожидать, что мутации, удаляющие ресиверный домен или нарушающие его структуру, будут приводить к инактивации рецептора. Действительно, были получены растения *A. thaliana* с мутациями в гене рецептора CRE1/АНК4, названные *cre1-3* и *cre1-7*, в которых произошла замена триплетов, кодирующих Trp1026 и Gln475 соответственно, на стоп-кодона [85]. Очевидно, что при таких мутациях синтезируется «укороченный» рецептор, лишенный целого ресиверного домена или его части. Еще у одного мутанта, *cre1-6*, замена нуклеотидов, приводившая к замене Gly493Ala, видимо, вызывала нарушения в ходе сплайсинга, в результате чего также образовывался «укороченный» рецептор. У мутанта *cre1-4* произошла замена Thr1008Ile, а у *cre1-9* – Ala1032Thr, при этом образовались полноразмерные белки, но с мутациями в ресиверном домене [85]. У полученных мутантных растений проверили реакцию на фосфатное голодание, которую в норме подавляют цитокинины. В мутантных растениях, в отличие от контрольных, эффект цитокининов в этом биотесте практически не проявлялся. Таким образом, мутации, приводящие к образованию «укороченных» рецепторов CRE1/АНК4, и мутации ресиверного домена приводят к подавлению у растений чувствительности к цитокининам в биотесте на фосфатное голодание [85].

Сходные мутации цитокининового рецептора MtCRE1 получены и изучены у люцерны *Medicago truncatula* [86]. Эти мутации затрагивали гистидинкиназный домен рецептора, при этом в случае мутации *mtcre1-1* триплет, кодирующий Trp573, расположенный в середине домена, заменялся на стоп-кодон, что приводило к образованию укороченного белка. Мутация *mtcre1-2* заключалась в замене Thr642Ile в консервативном G2-мотиве домена, а при мутации *mtcre1-3* замена Gly545Glu локализовалась в вариабельном участке домена. В биотесте на подавление роста корня было показано, что мутанты *mtcre1-1* и *mtcre1-2*, в отличие от *mtcre1-3*, теряли чувствительность к цитокинину. У мутантов *mtcre1-1* и *mtcre1-2* нарушалось формирование клубеньков при их инфицировании симбиотическими бактериями [86]. Все это еще раз подчеркивает важную роль каждого из консервативных доменов для нормального функционирования рецептора.

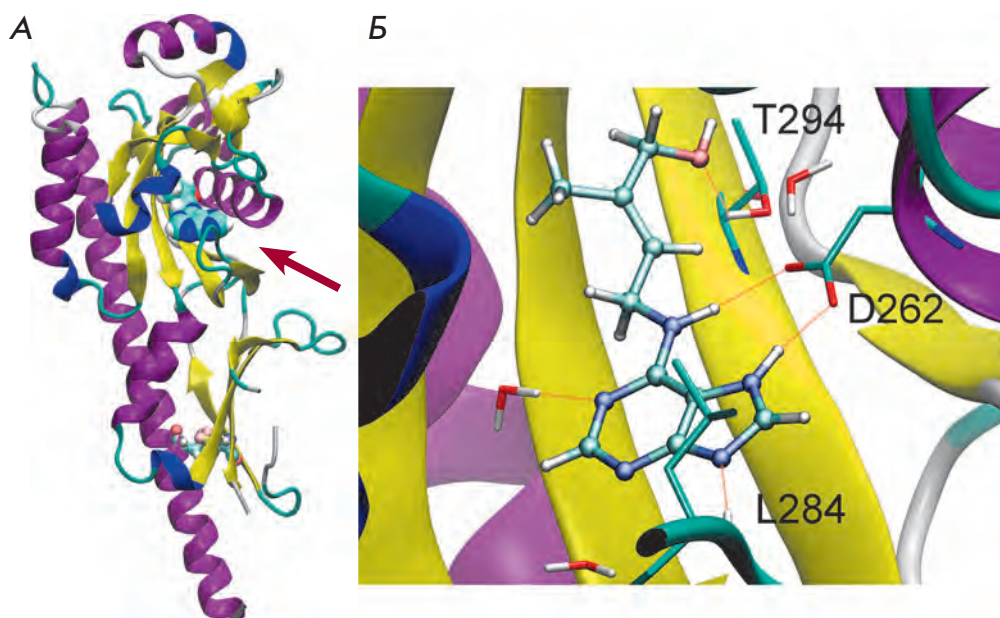
### ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА РЕЦЕПТОРА

Для ясного понимания особенностей строения и функционирования рецептора необходимо иметь

представление о пространственной структуре изучаемого белка. Самый распространенный способ ее изучения – рентгеноструктурный анализ (РСА), для проведения которого необходимо иметь монокристалл нужного белка. Однако рецепторы цитокининов представляют собой высокомолекулярные трансмембранные белки, что делает их кристаллизацию затруднительной, поэтому к сегодняшнему дню полная трехмерная структура не получена ни для одного из этих рецепторов.

Более реально установить пространственную структуру какого-либо домена рецептора. Работы в этом направлении проводились в отношении лигандсвязывающего [79, 87–89] и ресиверного [90, 91] доменов. Попытка предсказать третичную структуру CHASE-домена рецептора CRE1/АНК4 была предпринята еще в 2004 г. [87]. В этой работе использовали моделирование структуры CHASE-домена на основе его гомологов, пространственное строение которых определили методом РСА. В качестве шаблонов были выбраны лигандсвязывающие области сенсорных гистидинкиназ бактерий *E. coli* (PDB ID: 1OJG) и *Klebsiella pneumoniae* (PDB ID: 1P0Z). Затем для выявления потенциального сайта связывания гормона проводили молекулярный докинг цитокининов *транс*-зеатина и кинетина в предполагаемый сайт связывания построенной модели. Согласно полученным результатам, CHASE-домен соответствовал так называемому PAS-типу, а сайт связывания полностью охватывал молекулу цитокинина. Отмечен ряд аминокислотных остатков, отвечающих за связывание белка с лигандом [87], в том числе Thr278, замена которого на Ile (мутация *wol*) приводила к инактивации рецептора. Однако предложенная модель оказалась неверной, по-видимому, из-за слишком далекого родства белковых структур, взятых в качестве шаблонов для моделирования CHASE-домена.

Изучение возможной структуры сайта связывания гормона в CHASE-домене было продолжено с использованием метода эволюционной протеомики, т.е. поиска консервативных аминокислот CHASE-домена, необходимых для узнавания и связывания лиганда [84]. Найдено несколько аминокислотных остатков – потенциальных участков взаимодействия с гормоном, и проведены замены пяти из них на аланин в рецепторе CRE1/АНК4. При экспрессии таких мутантных рецепторов в *E. coli* две замены из пяти (Phe281Ala и Thr294Ala) привели к полному исчезновению способности связывания гормона с рецептором, еще в двух случаях (Trp221Ala и Arg282Ala) связывание заметно уменьшилось по сравнению с интактным рецептором CRE1/АНК4. Мутация Lys274Ala не дала эффекта. Отмечается, что большинство результативных мутаций локализованы вблизи предсказанных



**Рис. 5.** Пространственная структура CHASE-домена рецептора цитокинина CRE1/АНК4 арабидопсиса. Общий вид (А) и строение сайта связывания с молекулой *транс*-зеатина (Б). Молекула цитокинина показана в виде модели с заполнением пространства, цистиновый мостик показан в виде шаростержневой модели. Стрелкой показано положение связанного цитокинина.

центральных  $\beta$ -структур домена, что предполагает важную роль этих  $\beta$ -структур для связывания гормона. Впоследствии эти результаты были в основном подтверждены при расшифровке пространственной структуры CHASE-домена в комплексе с гормоном [89]: аминокислотные остатки Thr294, Phe281 и Arg282 действительно находились в контакте с цитокинином, тогда как Lys274 в контакте с гормоном прямо не участвовал.

Решающий успех в определении пространственной структуры CHASE-домена был достигнут в 2011 г., когда ученым из Salk Института (США) удалось получить кристалл CHASE-домена рецептора CRE1/АНК4, подходящий для РСА [89]. В результате была определена структура лигандсвязывающего CHASE-домена рецептора CRE1/АНК4 в комплексе с различными гормонами (PDB ID: 3T4J, 3T4K, 3T4L, 3T4O, 3T4Q, 3T4S, 3T4T; разрешение 1.53–2.30 Å). Согласно этим данным (рис. 5), N-конец домена представляет собой длинную  $\alpha$ -спираль, рядом с которой находятся два петлеобразных домена типа PAS, соединенные между собой спиральными линкерами. Последняя  $\beta$ -структура, ближайшая к С-концу PAS-домена, ковалентно связана с N-концевой  $\alpha$ -спиралью через дисульфидный мостик, что делает структуру домена более жесткой и компактной. Интересно отметить, что сходные третичные структуры сенсорных доменов описаны ранее у гистидинкиназ некоторых бактерий (*Bacillus subtilis*, PDB ID: 2FOS, 4DBJ; *Sinorhizobium meliloti*, PDB ID: 3E4P; *Shewanella oneidensis*, PDB ID: 3LIC), несмотря на низкий уровень сходства последовательностей бактериальных рецепторов и CRE1/АНК4 [92]. Сенсорные домены

как CRE1/АНК4, так и их бактериальных гомологов кристаллизовались в виде гомодимеров. Установлено, что для узнавания цитокининов CRE1/АНК4 использует удаленный от мембраны PAS-домен. Лигандсвязывающая полость рецептора полностью охватывает лиганд, что показано для ряда наиболее известных цитокининов: изопентениладенина (3T4J), N<sup>6</sup>-бензиламинопурина (3T4K), *транс*-зеатина (3T4L) и кинетина (3T4S); различия между структурами рецептора в комплексе с различными гормонами пренебрежимо малы. «Нижняя» часть цитокининсвязывающего сайта сформирована центральной  $\beta$ -структурой PAS-домена и облицована небольшими гидрофобными аминокислотными остатками. Замена этих остатков на аминокислоты с более объемными радикалами перекрывает область связывания цитокининов и тем самым инактивирует рецептор. Именно это происходит в случае самой известной мутации *wol* при замене небольшого остатка Thr278 на Ile, боковая цепь которого длиннее. Две короткие  $\beta$ -структуры формируют «верхнюю» часть активного центра и вносят дополнительные гидрофобные связи. Водородные связи образуются между адениновой частью цитокинина и остатком Asp262 (эта связь критична для связывания), Leu284, Tyr250, Thr286, причем две последние аминокислоты контактируют с молекулами воды, которые, в свою очередь, взаимодействуют с атомами цитокинина. Остальные аминокислоты участвуют в гидрофобных взаимодействиях как с адениновой, так и, особенно, с хвостовой частью цитокинина (табл. 2). Всего лигандсвязывающий карман формируют примерно 20 аминокислот ([89] и Nothern M., личное сообщение).

Таблица 2. Аминокислотные остатки рецептора CRE1/АНК4, формирующие сайт связывания цитокина

Область контакта с гормоном	Аминокислотные остатки полости CHASE-домена, окружающие связанный N <sup>6</sup> -изопентениладенин*												
	G200	M226	V248	Y250	L251	D262	F281	R282	L283	L284	T286	V292	A322
Адениновая часть	1	1	2	H*H*	3	HH	1	1	3	H; 2	H*	3	3
Хвостовая часть	3	3	3	3	3	3	3	3	3				

\* 1, 2 и 3 – условная сила гидрофобных взаимодействий iP с CRE1/АНК4, H и HH – 1–2 водородные связи, а H\* – водородная связь, образуемая с участием молекулы воды.

Важные для связывания аминокислоты оказались достаточно консервативными у разных цитокиновых рецепторов; замены этих консервативных аминокислот в CHASE-доме CRE1/АНК4 приводили, как правило, к инактивации рецептора [89].

В растениях цитокинины могут быть гликозилированы по атомам азота в адениновом кольце, а OH-группа изопреноидной части лиганда может подвергаться ацилированию или гликозилированию. Как уже отмечалось выше, все эти модификации делают цитокинины неактивными [30, 59]. Пространственная структура рецептора подтверждает эти результаты, так как ограниченная полость, в которой происходит связывание лиганда, не может вместить цитокинины, обладающие дополнительными гликозильными или другими группами.

Транс-зеатин, в отличие от цис-зеатина, образует дополнительную водородную связь через OH-группу бокового радикала с Thr294 [89], что объясняет, почему CRE1/АНК4 с большим сродством связывает транс-, а не цис-зеатин. На примере кинетина и бензиламинопурина показано, как рецептор связывается с цитокининами, обладающими более объемными ароматическими хвостовыми группами (как в случае кинетина). Фурфурильный фрагмент кинетина, как и изопренильная группа транс-зеатина, образует водородную связь с Thr294, которая в кинетине реализуется с участием молекулы воды. А на примере тидиазурона (структура ЗТ4Т) подтверждено, что рецептор CRE1/АНК4 использует для связывания с синтетическими и природными цитокининами один и тот же сайт, при этом синтетические цитокинины образуют водородные связи с теми же аминокислотами, что и цитокинины – производные N<sup>6</sup>-аденина. Приведены общие принципы дизайна соединений с цитокининовой активностью: у таких соединений должна быть плоская кольцевая структура, занимающая «адениновую» часть лигандсвязывающей полости, с линкером, способным образовывать водородные связи с Asn262 и присоединяющим пло-

скую алифатическую или ароматическую хвостовую группу небольшого размера [89].

### ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ

До сих пор рецепторы цитокининов основательно изучали в основном у двух видов растений, правда, филогенетически достаточно отдаленных: арабидопсиса и кукурузы. Поэтому представляет интерес выяснить, каковы особенности аппарата рецепции цитокининов у растений других видов, а также проследить становление цитокининовой сигнальной системы в ходе эволюции растений. Такое исследование стало возможным благодаря расшифровке полных геномов целого ряда видов растений.

Результаты филогенетического анализа ряда геномов привели к заключению о том, что способ рецепции и трансдукции цитокининового сигнала на основе двухкомпонентной системы возник у многоклеточных растений после их выхода на сушу, видимо, как один из элементов их биохимической адаптации к новым условиям существования [93]. Гены, кодирующие сенсорные гистидинкиназы с CHASE-доменом и регуляторы ответа А-типа, в геномах изученных видов низших и высших растений обнаруживались, начиная со мхов и плаунов. У более высокоорганизованных растений число компонентов системы сигналинга цитокининов, как правило, возрастало по сравнению с более примитивными. Особенно это касалось фосфотрансмиттеров и регуляторов ответа. Отмечено, что рецепторы цитокининов всех проанализированных цветковых растений подразделяются на три филогенетически отдельные ветви, соответствующие рецепторам арабидопсиса CRE1/АНК4, АНК3 и АНК2. При этом рецепторы архегониальных растений (мох, плаун) располагались в эволюционном древе особняком, что указывало на появление трех основных типов рецепторов скорее всего в период появления цветковых растений, но еще до их разделения на однодольные и двудольные [93].

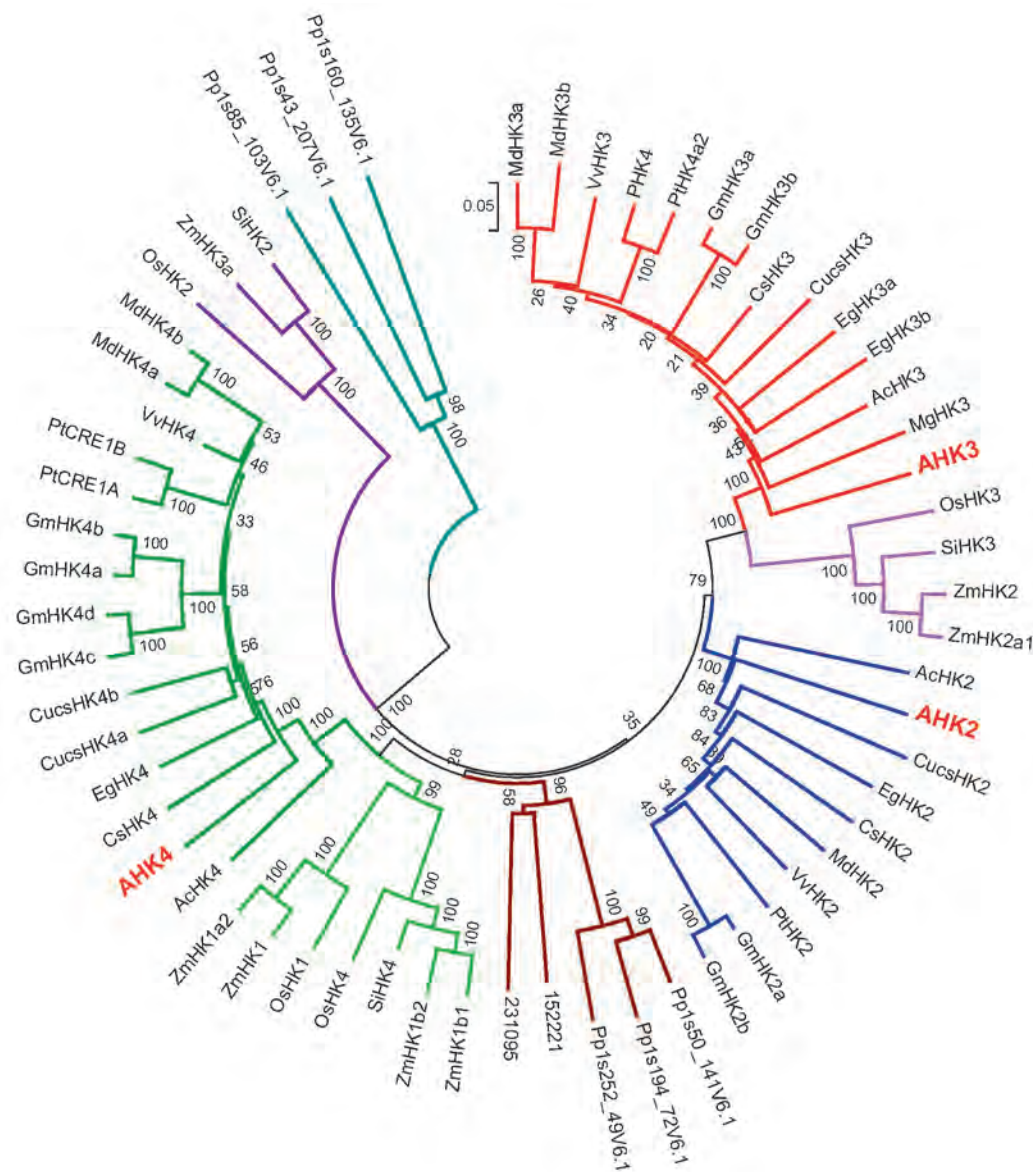


Рис. 6. Филогенетический анализ рецепторов цитокининов. Для выравнивания последовательностей белков использовали программу Clustal W, для построения филогенетического дерева – программу MEGA5.05, бутстрэп-анализ с 1000 случайными выборками. Числа в узлах показывают вероятность (%) формирования отходящих ветвей.

Проведенный нами более широкий филогенетический анализ на основе секвенированных геномов 30 видов наземных многоклеточных растений позволил дополнительно прояснить ряд вопросов эволюции цитокининовых рецепторов. Среди аннотированных генов выявлено 112, кодирующих белки с типичной для цитокининовых рецепторов структурой, включающей CHASE-домен, гистидинкиназный и ресерверный домены (рис. 6). Гены таких сенсорных гистидинкиназ представлены во всех расшифрованных геномах высших растений. Число сенсорных гистидинкиназ с CHASE-доменом варьировало от одного у картофеля *Solanum tuberosum* и губастика крапчатого *Mimulus guttatus* до восьми у сои культурной *Glycine max*. Филогенетический анализ позволил выявить у цветковых растений несколько ветвей

близкородственных рецепторов. Наиболее представительными снова оказались три ветви, соответствующие рецепторам арабидопсиса ANK2, ANK3 и CRE1/ANK4. Внутри этих ветвей наблюдалось подразделение на группы однодольных и двудольных ортологов. Кроме того, некоторые небольшие ветви стояли особняком, в частности группа однодольных ортологов *ZmHK3*. В целом, рецепторы цитокининов можно разделить филогенетически на три группы у двудольных и четыре у однодольных. При этом рецепторы одного вида растений, входящие в разные группы, более сходны с ортологами других видов своей группы, чем между собой. У разных видов растений рецепторы в этих группах представлены по-разному. Как уже отмечалось выше, у двудольных – картофеля и губастика крапчатого – найдено

всего по одному рецептору, относящихся к ортологам CRE1/АНК4 и АНК3 соответственно. Не исключено, что у этих видов могут быть и другие рецепторы, если в их геномах будут идентифицированы новые гены. При этом в рецепторе картофеля StНК4 вместо консервативного Tyr318 находится фенилаланин. Правда, прямых доказательств важности этой аминокислоты для функционирования рецептора не представлено [89]. Интересно, что у томата, близкого родственника картофеля, имеются нормальные представители рецепторов всех трех основных эволюционных ветвей. В семействе бобовых наблюдается дубликация ортолога CRE1/АНК4, причем у сои найдены четыре ортолога CRE1/АНК4, по два в каждой группе дубликации (рис. 6). В двух других ветвях имеются по два представителя рецепторов сои. У люцерны *Medicago truncatula* единственный ортолог CRE1/АНК4 относится к одной из двух групп дубликации. Фасоль обыкновенная *Phaseolus vulgaris* и *Lotus japonicus* имеют по два представителя ортолога CRE1/АНК4, но лишены ортологов АНК3 и АНК2 соответственно. Однако в белке PvНК4а фасоли в позиции 284 вместо высококонсервативного лейцина находится триптофан, что ставит под сомнение функцию этого белка в качестве рецептора цитокининов. Отдельные замены консервативных аминокислот выявлены также у некоторых других видов двудольных (апельсин *Citrus sinensis*, огурец *Cucumis sativus*, маниок *Manihot esculenta*). Общим свойством всех видов двудольных, за исключением губастика крапчатого, является обязательное присутствие ортологов рецептора CRE1/АНК4.

У однодольных риса и кукурузы также имеются представители двух эволюционных ветвей рецепторов, ортологов АНК3 и АНК4, при этом группу АНК4 можно разделить на две подгруппы, условно ZmНК1a и ZmНК1b. У кукурузы в каждую из этих групп/подгрупп входят по два рецептора. Однако у щетинника итальянского *Setaria italica* отсутствуют ортологи CRE1/АНК4 в одной из подгрупп (ZmНК1a), а у сорго *Sorghum bicolor* и *Brachypodium distachyon* отсутствуют ортологи ZmНК3a (рис. 6). Таким образом, все известные геномы однодольных растений кодируют хотя бы один представитель ортологов CRE1/АНК4. Стоит отметить, что ортологи CRE1/АНК4 представлены в доступных геномах практически всех однодольных в двух вариантах, однако не исключено, что эта особенность характерна только для семейства злаков, геномы которых уже известны, а в прочих семействах однодольных содержится иное число изоформ CRE1/АНК4. Однако в любом случае ортологи CRE1/АНК4 сейчас представляются наиболее важными рецепторами цитокининов у цветковых растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные гормоны растений известны уже с середины 20 века, но именно в последние десятилетия исследования фитогормонов переживают период ренессанса. В первую очередь, это связано с раскрытием молекулярного механизма их действия на клетку: обнаружением рецепторов и кодирующих их генов, возможностью клонирования генов рецепции, биосинтеза и сигнальной трансдукции, а также получения направленных мутаций [94–101]. Фундаментальные основы внутриклеточного сигналинга фитогормонов аналогичны основам сигналинга гормонов животных и человека: для восприятия гормона служат рецепторы, которые при формировании гормон-рецепторных комплексов меняют некоторые свои свойства, что приводит к передаче сигнала на первичную клеточную мишень с помощью соответствующей системы сигнальной трансдукции. Как и у животных, в клетках растений рецепторы располагаются в основном в двух компартментах: в составе мембран или (растворимые) внутри ядра. Основной клеточной мишенью сигналинга гормонов растений, как и гормонов животных, служит узкий набор генов первичного ответа, специфичный для каждого из фитогормонов. Но, как оказалось, молекулярные механизмы сигналинга гормонов у животных и растений существенно различаются. У растений обнаружены такие пути внутриклеточной передачи сигнала, которые не встречаются у животных. Благодаря этому результаты изучения растений существенно обогатили молекулярную гормонологию как науку в целом.

Для сигналинга цитокининов растения используют аналог двухкомпонентной системы передачи сигнала, позаимствованной у цианобактерий [20, 24, 94, 102]. Как полагают, именно симбиоз цианобактерий и эукариотических клеток позволил растениям обрести хлоропласты и попутно использовать бактериальные гены для своих нужд [103, 104]. Переход к наземному образу жизни дал многоклеточным растениям мощный стимул для формирования новых гормональных систем регуляции, в том числе и цитокининовой. В животной же клетке органелл типа хлоропластов нет. По-видимому, из-за отсутствия симбиоза с соответствующими бактериальными прародителями (цианобактерии) этих органелл системы двухкомпонентной передачи сигнала животным не достались.

Большой прогресс в раскрытии молекулярных механизмов действия фитогормонов достигнут в 21-м «постгеномном» веке не случайно, а именно благодаря работам по расшифровке полных геномов растений, начало которым положило секвенирование генома арабидопсиса в 2000 г. [11]. В результате арабидопсис является пока единственным видом, у которого к сегодняшнему дню детально охарактеризован аппарат

рецепции и трансдукции цитокининового сигнала. Однако даже и здесь остается еще много нерешенных вопросов. В этой связи стоит отметить, что работы по изучению цитокининовой системы регуляции проводятся в настоящее время широким фронтом, на разных объектах, с применением самых современных методов молекулярной биологии, гормонологии, геномной инженерии, биоинформатики и других. Не вызывает сомнений то, что скоро мы станем свидетеля-

ми новых открытий в этой интригующей и перспективной области изучения жизни на нашей планете. ●

*Исследования авторов обзора поддержаны Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 10-04-00638, 11-04-00614 и 11-04-90491).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller C.O., Skoog F., von Saltza N.M., Strong F.M. // J. Am. Chem. Soc. 1955. V. 77. P. 1392.
2. Mok M.C. Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press, 1994. P. 155–166.
3. Taiz L., Zeiger E. Plant Physiology, 5<sup>th</sup> Ed. Sunderland (USA): Sinauer Associates, Inc. 2010. <http://5e.plantphys.net/chapter.php?ch=21>
4. Романов Г.А. // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 295–319.
5. Romanov G.A. // McGraw Hill Encyclopedia of Science & Technol. 2012. V. 5. P. 205–207.
6. Choi J., Choi D., Lee S., Ryu C.-M., Hwang I. // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 388–394.
7. Zalabák D., Pospíšilová H., Smehilová M., Mrízová K., Frébort I., Galuszka P. // Biotechnol. Advances. 2012. In press. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.12.003.
8. Ha S., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L.S. // Trends Plant Sci. 2012. V. 17. P. 172–179.
9. Gold-von Simson G., Goldberg J.D., Rolnitzky L.M., Mull J., Leyne M., Voustantiounk A., Slaugenhaupt S.A., Axelrod F.B. // Pediatr. Res. 2009. V. 65. P. 341–346.
10. Kolyachkina S.V., Tararov V.I., Alexeev C.S., Krivosheev D.M., Romanov G.A., Stepanova E.V., Solomko E.S., Inshakov A.N., Mikhailov S.N. // Collect. Czech. Chem. Commun. 2011. V. 76. P. 1361–1378.
11. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. // Nature. 2000. V. 408. P. 796–815.
12. Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. // Nature. 2001. V. 409. P. 1060–1063.
13. Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 107–113.
14. Ueguchi C., Sato S., Kato T., Tabata S. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 751–755.
15. Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 1017–1023.
16. Mähönen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N., Helariutta Y. // Genes Dev. 2000. V. 14. P. 2938–2943.
17. Ueguchi C., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 231–235.
18. Anantharaman V., Aravind L. // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26. P. 579–582.
19. Mougél C., Zhulin I.B. // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26. P. 582–584.
20. Wolanin P.M., Thomason P.A., Stock J.B. // Genome Biol. 2002. V. 3. P. 3013.1–3013.8.
21. Heyl A., Schmölling T. // Cur. Opin. Plant Biol. 2003. V. 6. P. 480–488.
22. Maxwell B.B., Kieber J.J. // Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action / Ed. Davies P.J. Dordrecht. The Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 2005. P. 321–349.
23. Schaller G.E., Kieber J.J., Shiu S.-H. // The Arabidopsis Book. 2008. № 6. P. 1–12.
24. Schaller G.E., Shiu S.-H., Armitage J.P. // Current Biol. 2011. V. 21. P. R320–R330.
25. West A.H., Stock A.M. // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26. P. 369–376.
26. Punwani J.A., Hutchison C.E., Schaller G.E., Kieber J.J. // Plant J. 2010. V. 62. P. 473–482.
27. Brandstatter I., Kieber J.J. // Plant Cell. 1998. V. 10. P. 1009–1020.
28. Rashotte A.M., Carson S.D.B., To J.P.C., Kieber J.J. // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 1998–2011.
29. Brenner W.G., Romanov G.A., Köllmer I., Bürkle L., Schmölling T. // Plant J. 2005. V. 44. P. 314–333.
30. Spíchal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmölling T. // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 1299–1305.
31. Miwa K., Ishikawa K., Terada K., Yamada H., Suzuki T., Yamashino T., Mizuno T. // Plant Cell Physiol. 2007. V. 48. P. 1809–1814.
32. Higuchi M., Pischke M.S., Mähönen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 8821–8826.
33. Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 1365–1377.
34. Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmölling T. // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 40–54.
35. Shi X., Rashotte A.M. // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. P. 789–799.
36. Tanaka Y., Suzuki T., Yamashino T., Mizuno T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004. V. 68. P. 462–465.
37. Hutchison C.E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M.W., Maxwell B.B., Perdue T.D., Schaller G.E., Alonso J.M., Ecker J.R., Kieber J.J. // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 3073–3087.
38. Dortay H., Mehnert N., Bürkle L., Schmölling T., Heyl A. // FEBS J. 2006. V. 273. P. 4631–4644.
39. Deng Y., Dong H., Mu J., Zheng B., Ji Z., Yang W.-C., Liang Y., Zuo J. // Plant Cell. 2010. V. 22. P. 1232–1248.
40. Lu J.M., Deschenes R.J., Fassler J.S. // Eukaryot. Cell. 2003. V. 2. P. 1304–1314.
41. Mähönen A.P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K.M., Kinoshita K., Törmäkangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T., Helariutta Y. // Science. 2006. V. 6. P. 94–98.
42. Gupta S., Rashotte A.M. // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. P. 801–812.
43. Lohrmann J., Sweere U., Zabaleta E., Bäurle I., Keitel C., Kozma-Bognar L., Brennicke A., Schäfer E., Kudla J., Harter K. // Mol. Genet. Genomics. 2001. V. 265. P. 2–13.
44. Sakai H., Aoyama T., Bono H., Oka A. // Plant Cell Physiol.



1998. V. 39. P. 1232–1239.
45. Sakai H., Aoyama T., Oka A. // *Plant J.* 2000. V. 24. P. 703–711.
46. Hosoda K., Imamura A., Katoh E., Hatta T., Tachiki M., Yamada H., Mizuno T., Yamazaki T. // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 2015–2029.
47. Mason M.G., Mathews D.E., Argyros D.A., Maxwell B.B., Kieber J.J., Alonso J.M., Ecker J.R., Schaller G.E. // *Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 3007–3018.
48. Ishida K., Yamashino T., Yokoyama A., Mizuno T. // *Plant Cell Physiol.* 2008. V. 49. P. 47–57.
49. Argyros R.D., Mathews D.E., Chiang Y.-H., Palmer C.M., Thibault D.M., Etheridge N., Argyros D.A., Mason M.G., Kieber J.J., Schaller G.E. // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 2102–2116.
50. Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Kiba T., Ueguchi C., Sugiyama T., Mizuno T. // *Plant Cell Physiol.* 1999. V. 40. P. 733–742.
51. Che P., Gingerich D.J., Lall S., Howell S.H. // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 2771–2785.
52. D'Agostino I.B., Deruère J., Kieber J.J. // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 1706–1717.
53. Hwang I., Sheen J. // *Nature.* 2001. V. 413. P. 383–389.
54. To J.P., Haberer G., Ferreira F.J., Deruère J., Mason M.G., Schaller G.E., Alonso J.M., Ecker J.R., Kieber J.J. // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 658–671.
55. Lee D.J., Park J.Y., Ku S.J., Ha Y.M., Kim S., Kim M.D., Oh M.H., Kim J. // *Mol. Genet. Genomics.* 2007. V. 277. P. 115–137.
56. Müller B. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 3273–3288.
57. Mähönen A.P., Higuchi M., Törmäkangas K., Miyawaki K., Pischke M.S., Sussman M.R., Helariutta Y., Kakimoto T. // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. P. 1116–1122.
58. Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 814–819.
59. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmülling T. // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 4051–4058.
60. Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A., Sakakibara H. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 5149–5159.
61. Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A., Schmülling T. // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 1808–1818.
62. Caesar K., Thamm A.M., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J., Harter K. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 5571–5580.
63. Chen Y.-F., Randlett M.D., Findell J.L., Schaller G.E. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 19861–19866.
64. Grefen C., Städele K., Růžicka K., Obrdlík P., Harter K., Horák J. // *Mol. Plant.* 2008. V. 1. P. 308–320.
65. Mok D.W.S., Mok M.C. // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. V. 52. P. 89–118.
66. Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T. // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. P. 85–93.
67. Corbesier L., Prinsen E., Jackmard A., Lejeune P., van Onckelen H., Perilleux C., Bernier G. // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2511–2517.
68. Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 75–83.
69. Higuchi M., Kakimoto T., Mizuno T. // *Plant Hormones: Methods and Protocols.* 2<sup>nd</sup> Ed. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2009. V. 495. P. 101–109.
70. Spíchal L. // *Plant Kinases: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* Springer Science+Business Media, 2011. V. 779. P. 139–147.
71. Romanov G.A., Spíchal L., Lomin S.N., Strnad M., Schmülling T. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 347. P. 129–134.
72. Romanov G.A., Lomin S.N. // *Plant Hormones: Methods and Protocols.* 2<sup>nd</sup> Ed. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2009. V. 495. P. 111–120.
73. Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H. // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 1053–1062.
74. Ломин С.Н., Романов Г.А. // *Физиология растений.* 2008. Т. 55. С. 283–299.
75. Stolz A., Riefler M., Lomin S.N., Achazi K., Romanov G.A., Schmülling T. // *Plant J.* 2011. V. 67. P. 157–168.
76. Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 1654–1661.
77. Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W.S., Malbeck J., Vankova R., Mok M.C. // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. P. 1374–1380.
78. Vyroubalová S., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 433–447.
79. Heyl A., Riefler M., Romanov G.A., Schmülling T. // *Eur. J. Cell Biol.* 2012. V. 91. P. 246–256.
80. Scheres B., Di Laurenzio L., Willemsen V., Hauser M.T., Janmaat K., Weisbeek P., Benfey P.N. // *Development.* 1995. V. 121. P. 53–62.
81. De Leon B.G., Franco Zorrilla J.M., Rubio V., Dahiya P., Paz-Ares J., Leyva A. // *Plant J.* 2004. V. 38. P. 70–79.
82. Kuroha T., Ueguchi C., Sakakibara H., Satoh S. // *Plant Cell Physiol.* 2006. V. 47. P. 234–243.
83. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. // *Annu. Rev. Biochem.* 2000. V. 69. P. 183–215.
84. Heyl A., Wulfetange K., Pils B., Nielsen N., Romanov G.A., Schmülling T. // *BMC Evol. Biol.* 2007. V. 7. P. 62.
85. Franco-Zorrilla J.M., Martin A.C., Solano R., Rubio V., Leyva A., Paz-Ares J. // *Plant J.* 2002. V. 32. P. 353–360.
86. Plet J., Wasson A., Ariel F., Le Signor C., Baker D., Mathesius U., Crespi M., Frugier F. // *Plant J.* 2011. V. 65. P. 622–633.
87. Pas J., von Grotthuss M., Wyrwicz L.S., Rychlewski L., Barciszewski J. // *FEBS Lett.* 2004. V. 576. P. 287–290.
88. Wulfetange K., Saenger W., Schmülling T., Heyl A. // *Mol. Biotechnol.* 2011. V. 47. P. 211–219.
89. Hothorn M., Dabi T., Chory J. // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. P. 766–768.
90. Muller-Dieckmann H.J., Grantz A.A., Kim S.H. // *Structure.* 1999. V. 7. P. 1547–1556.
91. Pekárová B., Klumpler T., Třísková O., Horák J., Jansen S., Dopitová R., Borkovcová P., Papoušková V., Nejedlá E., Sklenář V., et al. // *Plant J.* 2011. V. 67. P. 827–839.
92. Zhang Z., Hendrickson W.A. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 400. P. 335–353.
93. Pils B., Heyl A. // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 782–791.
94. Романов Г.А. // *Физиология растений.* 2002. Т. 49. С. 615–625.
95. Chow B., McCourt P. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 1998–2008.
96. Bishopp A., Mähönen A.P., Helariutta Y. // *Development.* 2006. V. 133. P. 1857–1869.
97. Spartz A.K., Gray W.M. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 2139–2148.
98. Santner A., Calderon-Villalobos L.I.A., Estelle M. // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. P. 301–307.
99. Santner A., Estelle M. // *Nature.* 2009. V. 259. P. 1071–1078.
100. Jaillais Y., Chory J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 642–645.
101. Kumari S., van der Hoorn R.A.L. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. V. 14. P. 480–488.
102. Bleecker A.B. // *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. P. 269–274.
103. Gillham N.W. *Organelle Genes Genomes.* New York: Oxford Univ. Press, 1994. 424 p.
104. Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. *Миры геномов органелл.* Минск: Тэхналогія, 2003. 495 с.

УДК 577.3

# Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства

Ю. А. Книрель<sup>1\*</sup>, А. П. Анисимов<sup>2</sup><sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 47<sup>2</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, 142279, Московская область, п. Оболенск

\*E-mail: knirel@ioc.ac.ru

Поступила в редакцию 01.06.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Приведены данные о составе и строении углеводной части (олигосахарида кора) и липидного компонента (липида А) различных форм липополисахарида (ЛПС) – одного из важных факторов патогенности чумного микроба *Yersinia pestis*. Рассмотрены функции и биологическая значимость генов биосинтеза ЛПС, биологические свойства ЛПС штаммов различных внутривидовых групп *Y. pestis* и их мутантов, включая вклад ЛПС в устойчивость бактерий к факторам врожденного иммунитета насекомых-переносчиков и млекопитающих-носителей. Особое внимание уделено температурозависимым вариациям структуры ЛПС, их генетическому контролю и роли в патогенезе чумы. Эволюционный аспект рассмотрен на основе сопоставления строения и генетики ЛПС чумного микроба и других энтеробактерий, в том числе других видов йерсиний. Обсуждаются перспективы создания живых противочумных вакцин на основе штаммов *Y. pestis* с генетически модифицированным ЛПС.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** липополисахарид, липид А, чума, *Yersinia pestis*, иммунный ответ, антибиотикоустойчивость.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** КАМП – катионные антимикробные пептиды; ЛПС – липополисахарид; НЧС – нормальная человеческая сыворотка; Ara4N – 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабиноза; Gal – галактоза; Glc – глюкоза; GlcN, GlcNAc – глюкозамин, *N*-ацетилглюкозамин; DD-Нер, LD-Нер – *D*-глицеро-, *L*-глицеро-*D*-манногептоза; Kdo – 3-дезоксид-*D*-манно-окт-2-улозоновая кислота; Ko – *D*-глицеро-*D*-тало-окт-2-улозоновая кислота; PEtN – фосфоэтанолламин; UndP, UndPP – ундекапиренилфосфат, дифосфат.

## ВВЕДЕНИЕ

Несомненный и значительный прогресс в изучении химического строения, биосинтеза и биологической роли липополисахарида (ЛПС) как одного из факторов патогенности возбудителя чумы – бактерии *Yersinia pestis* – достигнут за последнее десятилетие, начиная с того времени, когда теракты 11 сентября 2001 г. стимулировали всесторонние исследования особо опасных патогенов – потенциальных агентов биотерроризма.

Род *Yersinia* входит в семейство Enterobacteriaceae. В отличие от других представителей этого семейства, в том числе от двух энтеропатогенных йерсиний – *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, вызывающих хронические кишечные инфекции, – бактерии *Y. pestis* не способны длительное время существовать во внешней среде. Чумной микроб циркулирует в природных очагах, включающих популяции более 200 видов грызунов-носителей (сусликов, сурков,

песчанок, полевков, пищух и других) и насекомых-переносчиков (более 80 видов блох) [1–5]. Высокая летальность чумы у грызунов является условием непрерывной трансмиссии *Y. pestis* в природе.

Внутри вида *Y. pestis* имеются варианты, различающиеся как генотипически, так и фенотипически [5, 6]. Штаммы основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis*, относящиеся к биоварам *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *intermedium*, вирулентны для человека и морских свинок. Предполагается, что штаммы каждого из первых трех биоваров были причиной трех пандемий чумы. Недавно было предложено объединить во второй подвид *Y. pestis* subsp. *microtus* штаммы биоваров *altaica*, *caucasica*, *hissarica*, *ulegeica*, *talassica*, *xilingolensis*, *ginghaiensis* и *angola*, высоко-вирулентные для своих грызунов-носителей (различных видов полевков рода *Microtus*) и белых мышей, но авирулентные для морских свинок и человека [6, 7]. Данная терминология уже используется [8], и в на-

стоящем обзоре мы будем следовать этому варианту внутривидовой классификации возбудителя чумы.

Заражение людей чумой происходит в основном через укусы блох, а также контактным путем – через поврежденную кожу и слизистые оболочки или при вдыхании аэрозолированных респираторных выделений животных или людей с легочной формой инфекции [2–5]. У человека чума протекает как острое инфекционное заболевание, проявляющееся в тяжелейшей интоксикации, лихорадке, поражении лимфатических узлов, легких и других внутренних органов, часто осложняющееся сепсисом [4].

Высокая патогенность *Y. pestis* в значительной степени определяется уникальной способностью бактерий преодолевать защитные механизмы млекопитающих и насекомых, обеспечивая тем самым свое выживание в течение всего трансмиссионного цикла [2–4]. Важный вклад в эту особенность чумного микроба вносит ЛПС, или эндотоксин – основной компонент внешней мембраны клеточной стенки, образующий наружный слой ЛПС-фосфолипидного бислоя. Липидная часть ЛПС, так называемый липид А, служит якорем, удерживающим ЛПС в мембране, а его углеводная цепь направлена в сторону окружающей среды. Многие патогенные бактерии, включая *Y. pestis*, формирующие колонии шероховатой формы, продуцируют ЛПС R-типа, углеводная часть которого ограничивается олигосахаридом (от пентасахарида и выше), называемым кором. В ЛПС S-типа, который характерен для большинства бактерий, образующих гладкие колонии, присутствует также полисахаридная цепь (O-антиген), построенная из повторяющихся олигосахаридных звеньев, а кор является промежуточной областью между O-антигеном и липидом А.

Биосинтез O-антигена и области кора-липид А протекает по независимым друг от друга, но сходящимся путям [9]. Начальные стадии – синтез липида А, присоединение к нему компонентов кора и сборка на ундекапrenoльном носителе повторяющегося звена O-антигена – осуществляются на цитоплазматической стороне внутренней мембраны. Затем следует трансмембранный перенос, и последующие стадии (полимеризация повторяющегося звена по наиболее распространенному у энтеробактерий O-антиген-полимераза-зависимому пути, возможные дальнейшие модификации в области кора-липид А и O-антигене и соединение обеих частей в единую молекулу) происходят уже на периплазматической стороне мембраны.

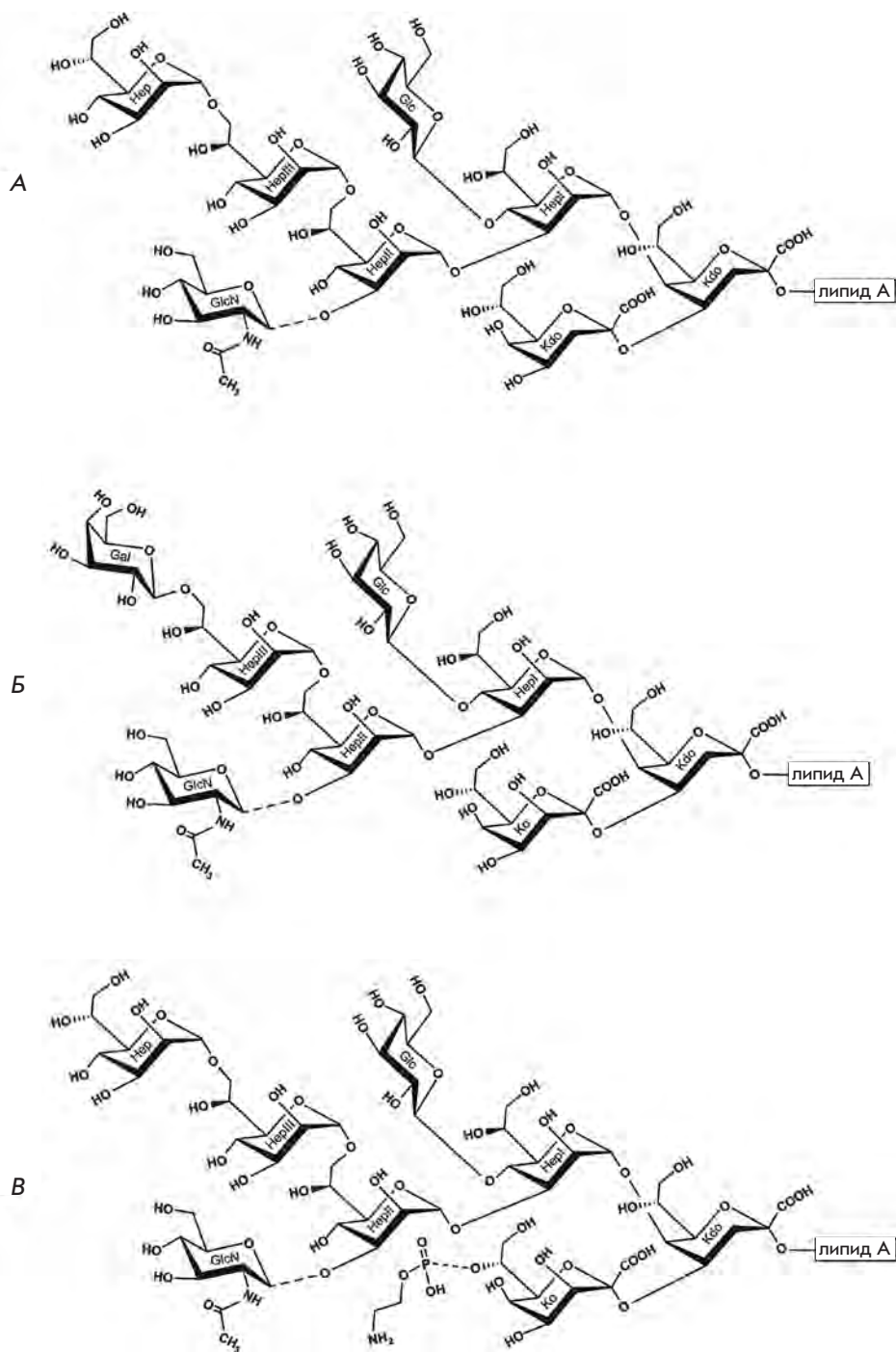
ЛПС играет важную роль в устойчивости бактерий к антибиотикам, комплементу и другим защитным системам организма хозяина и, таким образом, яв-

ляется одним из факторов патогенности грамотрицательных бактерий. Тонкая структура углеводной части ЛПС определяет специфичность взаимодействия бактериальной клетки с другими биологическими системами, включая иммунную систему и бактериофаги. Липид А ответствен за большинство физиологических эффектов, вызываемых ЛПС в организме животных и человека. Молекулярные механизмы этих эффектов у млекопитающих включают активацию специализированных клеток хозяина, таких, как моноциты и макрофаги, через белковый толл-подобный рецептор TLR4 при участии ЛПС-связывающего белка и корецепторов CD14 и MD-2. Активированные клетки секретируют окись азота, вазоактивные липиды и биоактивные медиаторы – провоспалительные цитокины. В низких концентрациях цитокины необходимы для запуска системы врожденного иммунитета хозяина, однако их избыточная продукция вызывает септический (эндотоксический) шок.

Недавно были опубликованы обзоры, посвященные структурным особенностям ЛПС чумного микроба [10] и иммунологическим свойствам его антигенов, включая ЛПС [11]. В настоящем обзоре представлены новейшие сведения по химическому составу и строению, генетике и биосинтезу ЛПС *Y. pestis*, а также о биологической роли ЛПС, рассматриваемой через призму его структурных особенностей. Обсуждаются возможные пути использования накопленных о ЛПС данных в практике здравоохранения.

### ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И СТРОЕНИЕ

Липополисахарид *Y. pestis* построен из короткой углеводной (олигосахаридной) цепи, присоединенной к липиду А [10, 12, 13]. В ней выделяется консервативный пентасахаридный фрагмент, называемый внутренним кором, который характерен для всех диких штаммов энтеробактерий. Он включает три остатка *L*-глицеро-*D*-манно-гептозы (LD-Нер) и два остатка 3-дезоксид-*D*-манно-окт-2-улозоновой кислоты (кетодезоксиоктоновой кислоты, Kdo) (рис. 1). Во внутренний кор йерсиний, как и некоторых других энтеробактерий (*Serratia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*) [14], входит также остаток *D*-глюкозы, присоединенный к первому от липида А остатку гептозы (LD-НерI). Перечисленные бактерии образуют группу с так называемым несальмонельным типом кора, тогда как в коре сальмонельного типа вместо остатка глюкозы в том же положении LD-НерI находится фосфат, дифосфат или дифосфоэтанолламин [14]. Внутренняя область кора служит рецептором большинства бактериофагов, специфичных к ЛПС *Y. pestis*, включая фаг ФА1122 группы Т7 [15, 16], используемый Центрами контроля и предотвраще-

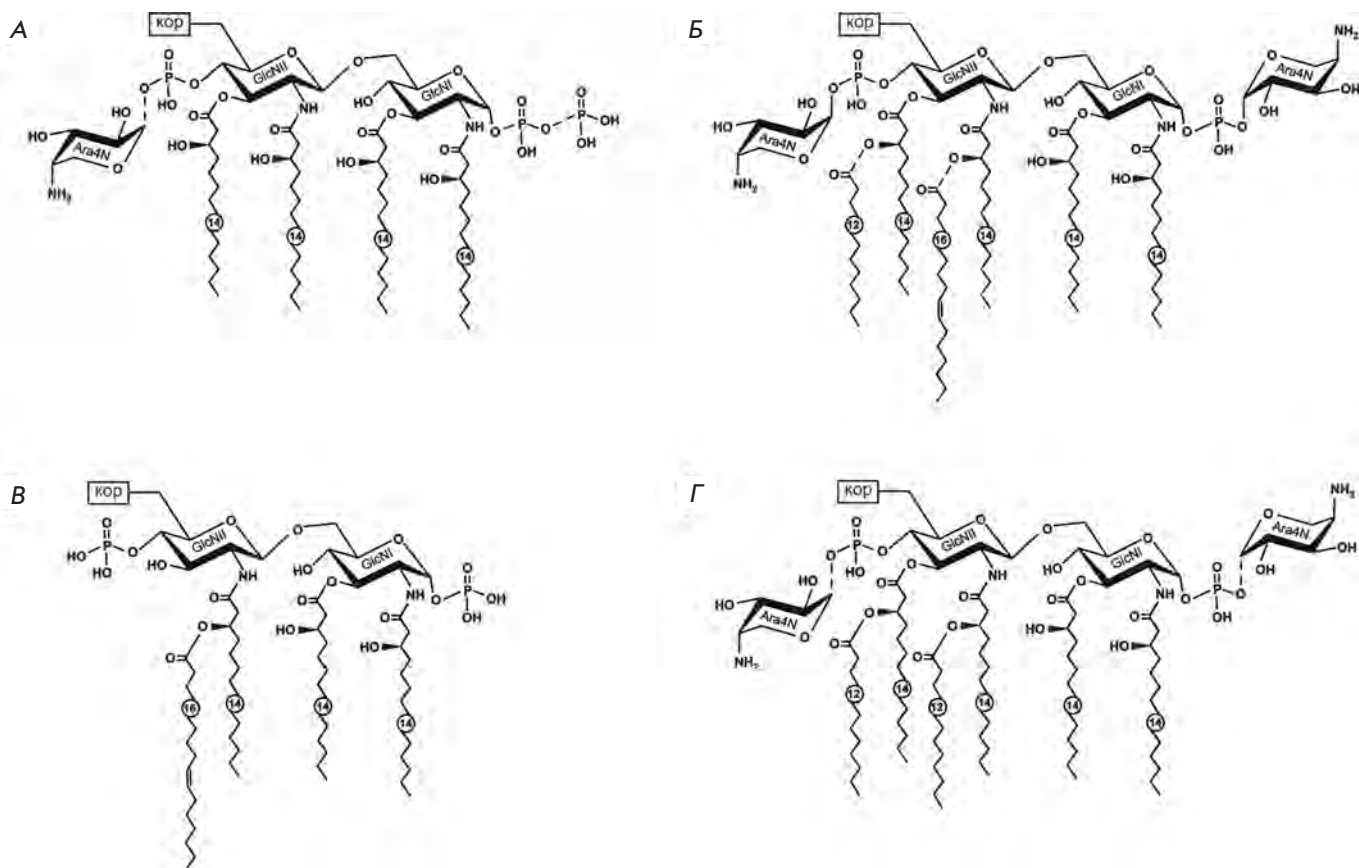


**Рис. 1.** Структурные варианты кора ЛПС *Y. pestis* [10, 12, 13, 17]. А – DD-Нер + Kdo-гликоформа, синтезируемая как основной вариант при 37°C и как один из четырех вариантов при 20–28°C. Б – Gal + Ко-гликоформа, продуцируемая как один из четырех вариантов при 20–28°C; одновременно с ней присутствуют гликоформы DD-Нер + Kdo, DD-Нер + Ко и Gal + Kdo. В – Гликоформа DD-Нер + КоPEtN, синтезируемая при 6°C (присутствует также Gal + Ко-гликоформа, лишенная PEtN). Пунктирными линиями обозначено нестехиометрическое замещение. Глицин, присутствующий на остатке LD-НерI в ряде штаммов, не показан.

ния заболеваний США для фагодиагностики *Y. pestis*. Гликозидная связь остатка Kdo, находящегося на восстанавливающем конце внутреннего кора, соединяет кор с липидом А.

Строение ЛПС *Y. pestis* варьирует в зависимости от внешних условий; оно детально изучено на препаратах, выделенных из бактерий, культивируемых при различных температурах, которые имитируют условия их существования в теле теплокровных

млекопитающих (37°C), пойкилотермных насекомых (20–28°C) и животных в период зимней спячки (6°C). Полный внутренний кор синтезируется обоими подвидами *Y. pestis*, культивируемыми при температуре как 20–28°C, так и 37°C. Однако описанная структура является единственной (или практически единственной) гликоформой только при 37°C (рис. 1А), тогда как при понижении температуры остаток Kdo в боковой цепи частично заменяется его изостери-



**Рис. 2.** Структурные варианты липида А *Y. pestis*. А – Тетраацильная форма, синтезируемая штаммами дикого типа при 37°C [10, 12, 23, 25]. Показан один из вариантов; в других вариантах дифосфатная группа может находиться в положении 4', а Ara4N-1-фосфатная – в положении 1, и каждая из этих групп может быть заменена Ara4N-1-дифосфатной группой [25]. Б – Гексаацильная форма [10, 12, 20, 23]; и В – тетраацильная форма [17], синтезируемые штаммами дикого типа при 20–28°C и 6°C соответственно. Г – Гексаацильная форма, синтезируемая рекомбинантным штаммом *Y. pestis*, несущим ген *lpxL Escherichia coli*, как при 37°C, так и при 26°C [27]. Пунктирными линиями обозначено нестехиометрическое замещение.

ческим 3-гидроксильным производным – остатком *D*-глицеро-*D*-мало-окт-2-улозоновой кислоты (Ко) [12] (рис. 1Б,В). При 6°C доминирует Ко-содержащая гликоформа [17].

Как таковой внешней олигосахаридной области, присутствующей в коре сальмонельного типа, у *Y. pestis* нет, но внутренняя область декорирована несколькими характерными для йерсиний моносахаридами и неуглеводными заместителями. Так, наиболее удаленный от липида А остаток гептозы (LD-НерIII) несет на себе остаток *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы (DD-Нер) либо *D*-галактозы, причем первый характерен для высокотемпературных вариантов ЛПС (рис. 1А), а при обычной и пониженной температуре синтезируются оба возможных варианта [12] (рис. 1А,Б). Штаммы некоторых биоваров (*caucasica*, *altaica*) неосновного подвида *Y. pestis* subsp. *microtus*

не способны включать DD-Нер в ЛПС, и в высокотемпературных формах ЛПС этих бактерий большая часть остатков LD-НерIII не несет моносахаридного заместителя [12, 18, 19].

Центральный остаток гептозы (LD-НерII) замещен остатком *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, который присутствует в нестехиометрическом количестве. Один из гептозных остатков (по неопубликованным данным авторов LD-НерI) может быть частично ацилирован глицином, содержание которого снижается с повышением температуры культивирования [12]. При 6°C остатки Ко нестехиометрически фосфорилированы фосфоэтаноломином (PEtN) [17] (рис. 1В). В некоторых штаммах PEtN присутствует также при 25°C [18, 19].

Липид А *Y. pestis* имеет типичную для энтеробактерий углеводную основу из двух 1,4'-бисфосфори-

лированных остатков глюкозамина, которые ацилированы четырьмя остатками 3-гидроксимиристата, называемыми первичными ацильными группами. Два остатка присоединяются по аминогруппам, два других – по гидроксильным группам остатков глюкозамина (рис. 2А). Вторичные ацильные остатки – лаурат и пальмитолеат – присоединяются по гидроксильным группам первичных жирных кислот на остатке глюкозамина, несущем олигосахарид кора (GlcNII) [12, 20] (рис. 2Б). В липиде А *Y. pestis* KIM6+ обнаружен дополнительный ацильный остаток – деканоат, положение которого неизвестно [21, 22].

Содержание различных ацилированных форм липида А в значительной степени зависит от условий культивирования: при 20–28°C это смесь тетраацильной, пентаацильной и гексаацильной форм; часто наблюдается также триацильная форма. Повышение температуры приводит к уменьшению степени ацилирования липида А. Так, при 37°C пальмитолеат не присоединяется и соответственно гексаацильная форма не синтезируется, а пентаацильная форма с лауратом представлена лишь в небольшом количестве [12, 18, 21, 23].

Высокотемпературная тетраацильная форма (так называемый липид IV<sub>A</sub>) содержит четыре первичных остатка 3-гидроксимиристата (рис. 2А), тогда как при пониженной температуре (6°C) наряду с гексаацильной продуцируется другая тетраацильная форма с тремя остатками 3-гидроксимиристата, один из которых несет пальмитолеат [17] (рис. 2Б). Еще одна особенность ЛПС *Y. pestis* – индуцируемое «холодным шоком» окисление одной или двух ацильных групп [17]; какие именно жирные кислоты окисляются и какие гидроксильные производные при этом образуются, не установлено.

Фосфатные группы липида А гликозилированы остатками катионного моносахарида – 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозы (Ara4N). В низкотемпературных вариантах ЛПС гликозилирование обеих фосфатных групп приближается к стехиометрическому (рис. 2Б), а в высокотемпературных формах содержание Ara4N снижается [12, 21] и наблюдается дополнительное фосфорилирование одной из освобождающихся фосфатных групп с образованием дифосфата [18, 19, 24, 25] (рис. 2А). В тетраацильном липиде А бактерий, выращенных при 37°C, дифосфатная группа может находиться в любом из двух возможных положений, а в пентаацильном варианте ее присутствие подтверждено в положении 4', но не исключено также в положении 1 [25]. По приблизительной оценке, основанной на данных масс-спектрометрического анализа, общее содержание дифосфата в тетраацильной форме составляет 5–6%. Как и монофосфатные группы, дифосфатные группы

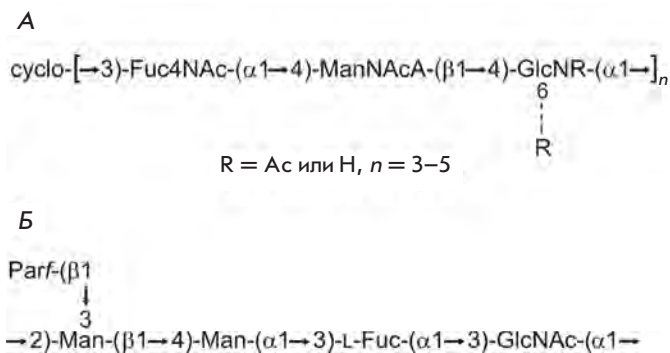


Рис. 3. Структура полисахаридных антигенов *Y. pestis* (А) и *Y. pseudotuberculosis* O:1b (Б). А – Циклическая форма общего энтеробактериального антигена *Y. pestis* [26]. Остаток глюкозамина N-ацелирован на ~50% и 6-О-ацелирован на ~20%; n = 4 (основной вариант), 3 или 5 (минорные варианты). Б – Пентасахаридное повторяющееся звено O-антигена *Y. pseudotuberculosis* O:1b [28]. В геноме *Y. pestis* присутствует нефункциональный генный кластер биосинтеза этого полисахарида [29]. Par – 3,6-дидезокси-D-рибо-гексоза (паратоза). Все моносахариды имеют D-конфигурацию; паратоза находится в фуранозной форме, остальные моносахариды – в пиранозной.

в обоих положениях липида А могут быть частично гликозилированы Ara4N [25]. ЛПС с остатком PEtN в коре, продуцируемый при 6°C, не содержит Ara4N в липиде А [17].

Одна из особенностей *Y. pestis*, отличающих эту бактерию от других йерсиний, – отсутствие в ЛПС полисахаридной цепи – O-антигена. В то же время, как и другие энтеробактерии, *Y. pestis* продуцирует общий энтеробактериальный полисахаридный антиген, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев, включающих по одному остатку N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc), 2-ацетамидо-2-дезоксид-D-маннуроновой кислоты (ManNAcA) и 4-ацетамидо-4-дезоксид-D-фукозы (Fuc4NAc), причем остаток GlcNAc частично O-ацелирован и частично N-дезацелирован. Из двух известных форм этого полисахарида – линейной, присоединенной к фосфолипиду или липиду А, и безлипидной циклической – у *Y. pestis* детально охарактеризована циклическая форма [26] (рис. 3А).

### ГЕНЕТИКА И БИОСИНТЕЗ

Синтез тетраацильного бисфосфорилированного предшественника липида А энтеробактерий (липид IV<sub>A</sub>) у *Y. pestis* очевидно происходит так же, как у наиболее изученных в этом отношении бактерий *E. coli* и *Salmonella enterica* [9]. Гомологи генов

*E. coli*, кодирующих ферменты позднего ацилирования липида А – миристоилтрансферазу LpxM (MsbB), пальмитолеилтрансферазу LpxP и пальмитоилтрансферазу PagP, но не лауроилтрансферазу LpxL (HtrB), идентифицированы в геноме *Y. pestis* [22, 30–32].

Функциональные гены *lpxM* и *lpxP* участвуют в синтезе гексаацильного липида А *Y. pestis* (рис. 4). Уровень их экспрессии возрастает при снижении температуры культивирования с 37 до 21°C, а мутант по обоим генам независимо от температуры синтезирует такой же тетраацильный липид А, сходный с липидом IV<sub>A</sub> (рис. 2А), что и штаммы дикого типа *Y. pestis* при 37°C [22]. В то же время уровень транскрипции остается низким при всех условиях, и температурная зависимость каталитической активности ферментов или другие посттранскрипционные эффекты также могут влиять на картину ацилирования липида А.

Ацилтрансфераза LpxM *E. coli* может использовать в качестве субстрата как миристанат, так и лаурат, но ее активность выше с миристанатом, который и присоединяется к 3-гидроксимиристанату в положение 3' GlcNII. Этому предшествует перенос на 3-гидроксимиристанат в положении 2' GlcNII вторичной ацильной группы – лаурата при 30–42°C при катализе LpxL [9] или пальмитолеата при температуре «холодного шока» (12°C) с участием LpxP [35]. Гомологи LpxM и LpxP *Y. pestis* переносят лаурат и пальмитолеат на остатки 3-гидроксимиристаната в положениях 3' и 2' GlcNII соответственно. При этом собственно температурный контроль, по-видимому, наблюдается только для LpxP, переносящего пальмитолеат в положение 2' GlcNII до присоединения вторичной ацильной группы в положение 3' (лаурата у *Y. pestis* или миристаната у *E. coli*), а активность LpxM не зависит от температуры. Вследствие отсутствия гена *lpxL* у *Y. pestis* при повышенной температуре 3-гидроксимиристанат в положении 2' остается незамещенным, что снижает эффективность переноса лаурата с участием LpxM и приводит к синтезу в основном тетраацильной формы липида А и лишь незначительного количества пентаацильной формы. Подтверждением этому служит продукция рекомбинантным штаммом *Y. pestis* KIM5-рLpxL, несущим ген *lpxL* *E. coli*, гексаацильной формы липида А с двумя вторичными остатками лаурата как при 37°C, так и при 26°C [27] (рис. 2Г).

Ацилтрансфераза PagP *E. coli* и *S. enterica* переносит пальмитат из положения sn-1 глицерофосфолипида [36], что отличает ее от ранних и других поздних ацилтрансфераз, использующих в качестве донора субстрат, связанный с ацилпереносящим белком. Кроме того, пальмитоилирование липида А проис-

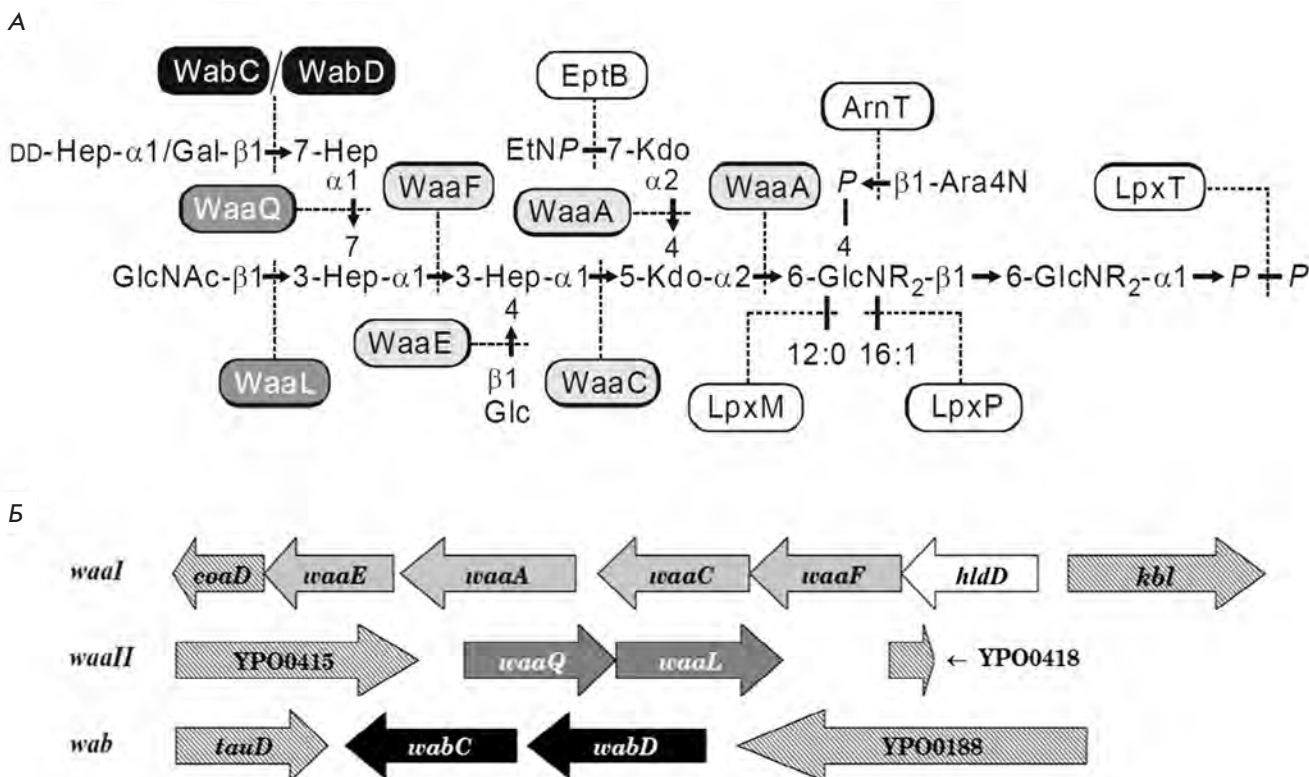
ходит не на внутренней, а на внешней мембране [36]. Пальмитоилированные формы липида А характерны также для *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* [19–21], однако у диких штаммов *Y. pestis* они не обнаружены, несмотря на присутствие в геноме гомолога *pagP*, идентичного на 99% гену *Y. pseudotuberculosis* [31, 36]. Причиной этого является инактивация данного гена в результате замены одного нуклеотида, что приводит к превращению кодона триптофана-200 в стоп-кодон [31].

Гены синтеза и переноса Ara4N входят в состав оперона *arn* (*pmrHFJKLM*) [9, 37]. Донором Ara4N для ее присоединения к фосфатным группам липида А является ундекаprenилфосфатное (UndP) производное, синтезируемое с участием Ara4N-трансферазы ArnC (PmrF), а перенос Ara4N на липид А, катализируемый продуктом гена *arnT* (*pmrK*), происходит на периплазматической стороне внутренней мембраны [38]. Для наиболее эффективного присоединения Ara4N требуется полностью достроенный внутренний кор, тогда как присутствие или отсутствие удаленных от липида А моносахаридов кора (GlcNAc, Gal и DD-HeP) на этот процесс практически не влияет [32–34]. Как и у *E. coli* и *S. enterica*, оперон *arn* *Y. pestis* находится под контролем двухкомпонентных систем передачи сигнала PhoP/PhoQ и PmrA/PmrB [21, 39], однако механизм регулирования системой PhoP/PhoQ у *Y. pestis* отличается, в частности, тем, что происходит без участия белка PmrD, отсутствующего у этой бактерии [39].

Синтез олигосахарида кора *E. coli* начинается с присоединения к липиду IV<sub>A</sub> двух остатков Kdo, катализируемого бифункциональной Kdo-трансферазой WaaA (рис. 4А), причем перенос Kdo предшествует позднему ацилированию липида А [9]. Дальнейшая сборка кора происходит на полностью ацилированном липиде А, после чего следует перенос ЛПС, состоящего из кора и липида А, через внутреннюю мембрану с помощью ABC-транспортера MsbA. В то же время трансмембранный перенос не нуждается ни в олигосахаридах кора, ни даже в остатках Kdo (Ko), так как ЛПС, полностью лишенный кора (т.е. фактически липид А), экспрессируется в Kdo-дефектных мутантах *E. coli* [40, 41] и *Y. pestis* [32, 33, 42].

У *E. coli*, *S. enterica* и ряда других энтеробактерий гены биосинтеза кора группируются в определенной области хромосомы, образуя кластер *waa* [9]. В геноме *Y. pestis* обнаружены два кластера (*waaI* и *waaII*) с четырьмя и двумя гомологами генов *waa* и один кластер с двумя генами *wab*, которые также кодируют ферменты биосинтеза кора [32–34] (рис. 4Б).

В кластер *waaI*, содержащий большинство генов синтеза внутреннего кора, входят гены Kdo-



**Рис. 4.** Биосинтез ЛПС *Y. pestis* [22, 32–34]. А – Ферменты синтеза кора ЛПС и поздних стадий синтеза липида А. R – 3-гидроксимиристоил. Б – Организация генных кластеров синтеза кора ЛПС. Гены в кластерах *waaI* (YPO054–YPO058), *waaII* (YPO416–YPO417) и *wab* (YPO186–YPO187) и соответствующие гликозилтрансферазы обозначены светло-серым, темно-серым и черным соответственно. Функции генов гликозилтрансфераз определены на основании анализа доступных полногеномных нуклеотидных последовательностей *Y. pestis* и данных о строении ЛПС у мутантов с нокаутом каждого гена. Воспроизводится из статьи авторов [32] с разрешения издательства «Наука».

трансферазы WaaA, гептозилтрансфераз WaaC и WaaF для переноса LD-НерI и LD-НерII соответственно и глюкозилтрансферазы WaaE. Кроме того, в него входит ген гептозо-6-эпимеразы HldD, катализирующей синтез ADP-LD-Нер из ее биосинтетического предшественника ADP-DD-Нер. Еще один ген гептозилтрансферазы *waaQ* находится в кластере *waaII*. Кодированный им фермент переносит LD-НерIII на LD-НерII, причем для этого обязательно присутствие глюкозы на LD-НерI, а для переноса глюкозы, в свою очередь, необходимо предварительное присоединение LD-НерII.

Второй ген кластера *waaII* является гомологом гена лигазы WaaL, присоединяющей О-антиген [9]. В отличие от моносахаридных компонентов ЛПС, которые переносятся гликозилтрансферазами в форме соответствующих нуклеозиддифосфатных производных или (в случае Kdo) нуклеозидмонофосфатного

производного, субстратом лигазы служит ундекапре-нилдифосфатное (UndPP) производное. Бактерия *Y. pestis*, не имеющая О-антигена, использует WaaL для присоединения к кору остатка GlcNAc, который, таким образом, не входит в состав собственно кора [12]. Лигаза нестрога зависит от Glc и LD-НерIII; в их отсутствие эффективность переноса GlcNAc снижается, и в ЛПС мутантов с нокаутом генов *waaE* и *waaQ* включается только небольшое количество этого моносахарида [32, 33]. У *Y. pestis* и других энтеробактерий ген *wecA*, вовлеченный в синтез UndPP-связанного GlcNAc, находится в генном кластере общего энтеробактериального антигена [43], биосинтез которого, как и биосинтез GlcNAc-содержащих О-антигенов, инициируется переносом GlcNAc-1-фосфата с UDP-GlcNAc на UndP.

Кластер *wab* содержит гены гликозилтрансфераз WabC и WabD для переноса DD-Нер и Gal соответ-



ственно. При помощи программы BLAST показано, что у штаммов неосновного подвида *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* Pestoides F и *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *xilingolensis* 91001 ген *wabC* содержит мутации, приводящие к нарушению синтеза соответствующего белка [32]; по-видимому, аналогичные мутации присутствуют и в других DD-Нер-дефектных штаммах *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* и bv. *altaica*. Экспрессия гена *wabD* и/или активность фермента WabD являются температурозависимыми, и перенос Gal при повышенной температуре происходит неэффективно. Неспособность мутанта по гену *rhoP* включать в кор Gal показывает, что галактозилрование контролируется двухкомпонентной системой передачи сигнала PhoP/PhoQ [44]. В то же время присоединение DD-Нер не требует функциональной системы PhoP/PhoQ.

Как уже отмечалось, при пониженной температуре терминальный остаток Kdo частично заменяется остатком Ko. Последний синтезируется путем окисления 3-дезоксигруппы Kdo с помощью уникальной Fe<sup>2+</sup>/α-кетоглутарат/O<sub>2</sub>-зависимой Kdo-3-гидроксилазы (KdoO) [45]. Ее субстратная специфичность не изучена, но, учитывая, что KdoO является периферическим мембранным белком, можно предположить, что 3-гидроксилирование Kdo происходит на цитоплазматической стороне внутренней мембраны после присоединения двух остатков Kdo к липиду A. Молекулярный механизм регулирования температурозависимого содержания Ko в коре остается неизвестным.

Гомологи генов трансферазы EptB (YhjW), переносящей PEtN с фосфатидилэтанолamina на Kdo [32, 33, 46], и фосфатазы LpxT (YeiU), переносящей фосфат с UndPP на липид A с образованием дифосфата [32, 33, 47], также обнаружены в геноме *Y. pestis* [32, 33]. Эти гены, как и ген *kdoO*, кодирующий Kdo-3-гидроксилазу, а также гены поздних стадий синтеза липида A (ацилирования и гликозилирования Ara4N) распределены по хромосоме в виде единичных некластеризованных генов. Ген ацилтрансферазы, участвующей в переносе глицина на остаток LD-НерI, до настоящего времени в геноме *Y. pestis* не найден.

Внутри вида *Y. pestis* гомология белков, участвующих в биосинтезе ЛПС, составляет 100% (за исключением гена *wabC*, мутантного у ряда представителей неосновного подвида чумного микроба; см. выше), а внутри рода *Yersinia* – 98–100% [32, 33], что хорошо согласуется с высокой степенью подобия строения кора и липида A ЛПС различных йерсиний [19, 20]. У отдаленно родственных бактерий гомология белков WaaA, WaaC, WaaE, WaaF, EptB, LpxM, LpxP и ArnT составляет более 70%. В то же время у ферментов WaaQ, WabC, WaaL и KdoO она не превышает 64%,

а уникальная для йерсиний галактозилтрансфераза WabD гомологична гликозилтрансферазам других бактерий не более чем на 43%. Высокая гомология большинства белков биосинтеза ЛПС *Y. pestis* и бактерий из различных филогенетических групп в сочетании с диспергированным расположением соответствующих генов в хромосоме чумного микроба свидетельствуют о многоэтапной горизонтальной передаче этих генов в геном прародителя йерсиний.

В геноме *Y. pestis* обнаружен нефункциональный генный кластер O-антигена [29, 48], который на уровне нуклеотидной последовательности на 98.9% идентичен кластеру O-антигена *Y. pseudotuberculosis* O:1b [29] (структура O-антигена приведена на рис. 3B). Таким образом, *Y. pseudotuberculosis* O:1b считается наиболее вероятным клоном-прародителем *Y. pestis*. Из 17 биосинтетических генов, идентифицированных в генном кластере O-антигена O:1b, пять в кластере *Y. pestis* инактивированы за счет инсерций или делеций. Среди них гены синтеза нуклеотид-активированных производных L-фукозы и 3,6-дидезокси-D-рибогексозы (паратозы) – предшественников компонентов O-антигена, без которых его синтез становится невозможным. Интересно, что, в то время как 16 генов в кластерах двух бактерий идентичны на 99–100%, ген *wzx* идентичен только на 90.4%. Продукт этого гена – флиппаза Wzx, служащая у *Y. pseudotuberculosis* для трансмембранного переноса UndPP-связанного повторяющегося пентасахаридного звена O-антигена. После утраты этой функции флиппаза *Y. pestis* очевидно изменилась, специализировавшись на переносе через внутреннюю мембрану единичного UndPP-связанного остатка GlcNAc, который затем с помощью лигазы WaaL присоединяется к кору ЛПС в то же самое место, в котором у *Y. pseudotuberculosis* находится полисахаридный O-антиген.

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЧУМЫ

Важную роль в исходе инфекционных заболеваний играет продукция макрофагами и другими клетками иммунной системы ключевых провоспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухолей α (ФНО-α) – основной медиатор септического шока (эндотоксемии), развивающегося под действием ЛПС. Как и у других грамотрицательных бактерий, у *Y. pestis* цитокининдуцирующая активность ЛПС, которая передается через клеточный рецептор TLR4, определяется строением липида A [49]. Так, продукция ФНО-α макрофагальными клеточными линиями мыши и человека значительно уменьшается со снижением степени ацилирования липида A, в частности, с отсутствием гексаациль-

ной формы и существенным снижением содержания пентаацильной формы [18, 23]. Эти структурные изменения липида А наблюдаются при повышении температуры культивирования бактерий от 21–28°C до 37°C, моделирующем переход от температурных условий в теле пойкилотермных блох (< 30°C) к условиям в теле теплокровных млекопитающих (37°C) [21, 23, 32, 33]. По ФНО- $\alpha$ -индуцирующей активности при 25°C ЛПС мутантов с нокаутом гена *lpxM* занимают промежуточное положение между ЛПС родительских штаммов, выращенных при 25 и 37°C, что хорошо коррелирует со степенью ацилирования липида А [50].

Ограниченная биологическая активность высоко-температурной низкоацилированной формы ЛПС *Y. pestis* может играть важную роль в преодолении бактериями защитных механизмов теплокровных животных. В то время как система врожденного иммунитета эффективно стимулируется высокоацилированными формами ЛПС, низкоацилированные формы рецептором TLR4 не распознаются и соответственно не активируют врожденный иммунитет по MD-2-TLR4-зависимому пути. Более того, в опытах с макрофагальными клеточными линиями человека [51] и дендритными клетками [52] ЛПС из клеток *Y. pestis*, выращенных при 37°C, вел себя как антагонист, активно подавляющий TLR4-зависимый провоспалительный ответ. Значение этой особенности ЛПС как фактора патогенности чумного микроба получило убедительное подтверждение при изучении рекомбинантного штамма *Y. pestis* KIM5-pLpxL, несущего ген *lpxL* *E. coli* [27]. ЛПС этого штамма, имеющий «неприродный» гексаацильный липид А (рис. 2Г), при всех температурных условиях, в том числе и при 37°C, значительно эффективнее стимулировал передачу сигнала через TLR4 и индукцию цитокинов (ФНО- $\alpha$ , интерлейкинов-6 и -8), чем ЛПС штаммов дикого типа.

Интересно, что рекомбинантный штамм *Y. pestis* KIM5-pLpxL оказался неспособным вызывать бубонную чуму у мышей, несмотря на то, что другие факторы патогенности, такие, как система секреции третьего типа, устойчивость к бактерицидному действию нормальной сыворотки и активность протеазы Pla, затронуты не были. Эти результаты являются хорошей иллюстрацией того, что активная (эндотоксичная) форма ЛПС играет также положительную роль для хозяина, обеспечивая быстрое распознавание патогена и активацию системы врожденного иммунитета на самых ранних стадиях инфекции. Опыты на мышцах показали, что аттенуированные штаммы *Y. pestis* с иммуностимулирующей формой ЛПС могут рассматриваться как прототип новой эффективной живой вакцины против чумы [27, 53].

Отметим, что выработка более высокоацилированных низкотемпературных форм ЛПС не является необходимым условием выживания *Y. pestis* в кишечнике блох. Так, двойной *lpxP/lpxM*-мутант с тетраацильным липидом А колонизировал пищеварительный тракт и блокировал преджелудок блохи *Xenopsylla cheopis* столь же эффективно, как и штамм дикого типа, отличающийся высоким уровнем экспрессии гексаацильного липида А в организме блох [22].

Уменьшение степени ацилирования липида А при повышении температуры культивирования [22] или инактивации гена *lpxM* [20] умеренно или незначительно снижало летальную токсичность препаратов ЛПС на модели мышей, сенсibilизированных актиномицином Д. Неспособность *lpxM*-мутанта штамма дикого типа *Y. pestis* 231 синтезировать гексаацильный липид А не сказывалась на его вирулентности, тогда как аналогичная мутация у аттенуированного вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ уменьшала его способность вызывать летальную инфекцию у мышей и морских свинок [49, 54]. Существенно, что снижение вирулентности *lpxM*-мутанта вакцинного штамма сопровождалось значительным повышением его протективной активности против бубонной чумы по сравнению с исходным вакцинным штаммом [49, 54]. Этот феномен, по видимому, обусловлен плейотропными эффектами мутации, включая изменения в биосинтезе и характере экспонирования основных иммунореактивных антигенов клеточной поверхности бактерий [55]. Если различие между мышьиными и человеческими рецепторами ЛПС не нивелирует эти различия, инактивация гена *lpxM* может быть использована для создания живой противочумной вакцины с пониженной реактогенностью.

При увеличении температуры культивирования *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* от 26 до 37°C проницаемость наружной мембраны для гидрофобного агента *N*-фенил-1-нафтиламина возрастала, коррелируя с уменьшением числа и, как следствие, с увеличением подвижности ацильных цепей ЛПС [56]. Отсутствие лаурата и пальмитолеата делало двойной *lpxP/lpxM*-мутант чувствительным к детергенту дезоксихолату, но не сказывалось на его устойчивости к гидрофобным антибиотикам рифампину и ванкомицину [22]. Противоречивые данные получены также с катионными антимикробными пептидами (КАМП) – одним из важных факторов врожденного иммунитета: снижение степени ацилирования не влияло на устойчивость к полимиксину В, но увеличивало чувствительность с цефтриаксоном А [22].

Напротив, устойчивость к КАМП отчетливо связана с содержанием Ara4N в ЛПС *Y. pestis*. Такая

корреляция, характерная также для *S. enterica* и некоторых других бактерий [37], объясняется электростатическим отталкиванием КАМП катионным моносахаридом, препятствующим связыванию молекулы антибиотика с отрицательно заряженными (например, фосфатными) группами на внешней мембране. На модели полимиксина В показана высокая устойчивость штаммов *Y. pestis* дикого типа с содержанием Ara4N в ЛПС, близким к стехиометрическому (два остатка Ara4N в молекуле), которое достигается при культивировании бактерий при 20–28°C. Соответственно падение устойчивости к КАМП коррелирует с заметным снижением содержания Ara4N при повышении температуры до 37°C [21, 57]. Мутанты с нокаутом генов *galU* пути синтеза Ara4N [58], *arnT* [32–34], кодирующему Ara4N-трансферазу, или *phoP* [21, 44], регулирующему присоединение Ara4N к липиду А, чувствительны к КАМП независимо от температуры культивирования. Роль Ara4N подтверждается также заметным увеличением содержания этого моносахарида в ЛПС бактерий, культивируемых при 37°C в присутствии полимиксина В [12]. Увеличение содержания Ara4N в ЛПС и, как следствие, устойчивости *Y. pestis* к КАМП при снижении температуры культивирования носит, несомненно, адаптационный характер. Высокая устойчивость к полимиксину В при температуре, свойственной организму насекомых, возможно связана с бóльшим вкладом КАМП в защитные механизмы врожденного иммунитета насекомых по сравнению с млекопитающими, у которых помимо КАМП имеется система комплемента.

Определенный вклад в устойчивость к КАМП может вносить и другой катионный компонент ЛПС – глицин [57], находящийся в коре, тогда как незаряженные компоненты кора, по-видимому, существенной роли не играют. Повышение чувствительности к полимиксину В, наблюдавшееся в серии мутантов с нокаутом генов гликозилтрансфераз с уменьшающимся кором, связано, скорее всего, с одновременным снижением содержания Ara4N в липиде А из-за неэффективности переноса Ara4N на молекулы ЛПС с недостроенной углеводной частью [32–34].

Кор ЛПС играет существенную роль в устойчивости *Y. pestis* к комплемент-опосредованному бактерицидному действию нормальной сыворотки крови [32–34], еще одному важному компоненту системы врожденного иммунитета. Штаммы дикого типа *Y. pestis* subsp. *pestis* устойчивы к действию нормальной человеческой сыворотки (НЧС) как при 25°C, так и при 37°C [57]. Практически так же устойчивы мутанты *waaL*, *wabC*, *wabD* и *arnT*, лишенные терминальных заместителей кора GlcNAc, DD-Нер, Gal

или катионного моносахарида Ara4N соответственно. Напротив, мутанты с недостроенной внутренней областью кора высокочувствительны к НЧС [32–34]. Молекулярный механизм участия кора пока не выяснен; возможно оно опосредуется влиянием ЛПС на правильность фолдинга и тем самым на функциональную активность белка наружной мембраны Ail (OmpX) [59], играющего ключевую роль в устойчивости *Y. pestis* к сыворотке [59, 60]. Изучение рекомбинантного штамма *E. coli*, несущего ген *ompX Y. pestis*, и трех его мутантов с укороченным кором выявило, что размер кора ЛПС влияет не только на устойчивость к НЧС, но и на такие OmpX-опосредованные факторы вирулентности, как адгезивность и инвазивность бактерий [60].

В отличие от штаммов основного подвида чувствительность штаммов *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* к действию НЧС не зависит от температуры, что коррелирует с отсутствием документированных случаев чумы у людей, вызванной штаммами этого биовара [57]. В то же время эти штаммы обладают устойчивостью к мышьиной сыворотке и, вероятно, к сыворотке своего основного хозяина – полевки обыкновенной, что обеспечивает их выживание в крови грызунов-носителей, необходимое для продолжения циркуляции в природных очагах. Единственная отличительная особенность ЛПС биовара *caucasica* – отсутствие в коре DD-Нер [12]. Однако штамм другого биовара неосновного подвида – *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica* [57], ЛПС которого также лишен DD-Нер, столь же устойчив к бактерицидному действию НЧС, как и *wabC*-мутант основного подвида с DD-Нер-дефектным ЛПС [32–34]. Это указывает на то, что адаптационные изменения, сделавшие штаммы *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* чувствительными к НЧС, затронули не только ЛПС, но и другие факторы, вовлеченные во взаимодействие бактериальной клетки с системой комплемента.

Не сказываясь на скорости роста клеток *Y. pestis* [32, 33], уменьшение размера кора ЛПС влияет на образование *in vivo* биопленки – полисахаридсодержащей внеклеточной матрицы, а также на зависящее от этого процесса блокирование преджелудка блох [61]. Мутант *Y. pestis* KIM6+ с нокаутом гена *gmhA*, кодирующего один из ферментов пути биосинтеза LD-Нер, обладал пониженной способностью образовывать биопленку на кутикуле нематоды *Caenorhabditis elegans* и блокировать преджелудок *X. cheopis* при умеренном уменьшении уровня пленкообразования *in vitro* [61]. Этот очевидно непрямой эффект отсутствия большей части кора, включая гептозную область, может объясняться взаимодействием белков наружной мембраны, участвующих

в синтезе, процессинге или экспорте биопленки, с компонентами кора ЛПС.

Обнаружили существенное снижение вирулентности *Y. pestis* 231 у подкожно зараженных морских свинок при укорочении кора ЛПС до пяти моносахаридных остатков и утрату вирулентности как для морских свинок, так и для мышей при дальнейшем уменьшении кора ЛПС до трех моносахаридов [32, 33]. Однако наблюдение велось в течение 21 дня, и нельзя исключить, что продолжение эксперимента привело бы к генерализации инфекции, ведущей к гибели животных в поздние сроки. Атенуирование мутантов вирулентного штамма *Y. pestis* CO92 с укороченным кором отмечено также на мышьях линии BALB/c, а отсутствие кора у мутантов по гену *yrbH* пути синтеза Kdo или гену Kdo-трансферазы *waaA* делало их полностью авирулентными [15]. Эти данные прямо указывают на исключительно важную роль ЛПС в вирулентности чумного микроба, так как столь же полное атенуирование штаммов *Y. pestis* отмечается только при потере основных компонентов системы секреции типа III [4], генного кластера синтеза и рецепции сидерофора йерсиниобаكتина [4] или генов, кодирующих липопротеин NlpD [62].

Биологическая значимость температурозависимых вариаций моносахаридного состава кора – замены терминальных остатков Kdo и DD-Нер на остатки Ко и Gal соответственно при снижении температуры окружающей среды от 37 до 28°C и ниже – остается невыясненной. Можно предположить, что гидроксильное Kdo при понижении температуры (т.е. превращение Kdo в Ко) служит компенсацией уменьшения гидрофильности ЛПС в результате ацилирования гидроксильных групп первичных жирнокислотных остатков, также происходящего при низких температурах.

Ответ (возможно не единственный) на интригующий вопрос о том, что, кроме тривиальной энергетической выгоды, приобрел чумной микроб, избавившись от необходимости синтезировать О-антиген, получен при изучении активатора плазминогена Pla *Y. pestis* – белка наружной мембраны семейства омптинов с функциями протеазы/адгезина. Превращая плазминоген в плазмин – ключевой фермент фибринолиза – и разрушая циркулирующий ингибитор плазмина  $\alpha_2$ -антиплазмин, Pla вызывает неконтролируемый протеолиз тканей, способствуя распространению *Y. pestis* в макроорганизме, и играет важную роль в патогенезе чумы. Исследование активности Pla *Y. pestis* в рекомбинантных штаммах *Y. pseudotuberculosis* с различным уровнем экспрессии О-антигена показало, что О-антиген стерически затрудняет взаимодействие Pla с высокомолекулярным субстратом, препятствуя тем самым как активации

плазминогена, так и инактивации  $\alpha_2$ -антиплазмина [63, 64]. Это позволило сделать вывод о том, что потеря О-антигена, необходимая для повышения ферментативной активности Pla, усилила инвазивность *Y. pestis*. С другой стороны, активность Pla зависит от специфического взаимодействия с фосфатными группами липида А [65] и требует наличия ЛПС с кором, содержащим не менее двух остатков LD-Нер [32, 66]. Такая необычная ЛПС-зависимость может объясняться тонкими конформационными изменениями в активном центре омптина в результате связывания с ЛПС [67].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопоставление данных о строении, биосинтезе и биологическим свойствам ЛПС *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* показывает, что наиболее значимые события на пути формирования *Y. pestis*, связанные с изменением структуры ЛПС, – инактивация генного кластера О-антигена и гена *pagP*, а также потеря гена *lpxL*, приведшие к синтезу R-формы ЛПС с короткой углеводной цепью и утрате способности продуцировать высокоацилированные формы липида А при 37°C. Эти изменения играют важную роль в патогенезе чумы, являясь существенной частью стратегии преодоления бактерией защитных механизмов хозяина. Так, отсутствие полисахаридной цепи обеспечивает функционирование такого важного фактора патогенности *Y. pestis*, как активатор плазминогена, а опосредованное температурой уменьшение степени ацилирования ЛПС, приводящее к снижению цитокининдуцирующей способности, считается одним из механизмов предотвращения распознавания патогена иммунной системой хозяина на ранних стадиях инфекции. Эти данные согласуются с представлением о том, что патоадаптация *Y. pestis* к новой экологической нише включала утрату функциональности ряда генов, необходимых для сапрофитного существования [36, 68]. Закрепившиеся у представителей биоваров неосновного подвида *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* и bv. *xilingolensis* мутации по гену *wabC*, кодирующему DD-Нер-трансферазу, могут быть элементом дальнейшей редукционной внутривидовой микроэволюции в ходе адаптации *Y. pestis* к циркуляции в популяциях определенных видов полевок.

В то же время многие особенности ЛПС, включая температурозависимые вариации структуры как кора, так и липида А, унаследованы *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis* без заметных изменений. Возможно, что некоторые из них, такие, как фосфорилирование PEtN, гликозилирование Ara4N и окисление Kdo в Ко, не имеют принципиального значения для нового способа существования чумного микро-

ба, а необходимы лишь для нормального функционирования наружной мембраны, достигаемого путем придания ей определенной гидрофильности и заряда. С другой стороны, они могут вносить свой вклад в патогенез чумы, способствуя оптимальному приспособлению *Y. pestis* к существованию на разных этапах своего жизненного цикла в значительно отличающихся условиях в организмах хозяев-млекопитающих и переносчиков-насекомых. Уникальный феномен чумного микроба и чумы как раз и может быть обусловлен синергическим действием унаследованных и вновь приобретенных факторов патогенности, в том числе связанных с ЛПС.

Таким образом, полученные в последние годы данные свидетельствуют о том, что ЛПС является полифункциональным фактором патогенности *Y. pestis*, играющим ключевую роль в адаптационной изменчивости чумного микроба. Однако следует отметить, что даже в случае обнаружения корреляции между структурой ЛПС и свойствами бактериальной культуры, точное биологическое значение различных модификаций ЛПС нельзя считать окончательно установленным, так как культивирование бактерий в лабораторных условиях не может точно воспроизводить условия *in vivo*. Выявление детального строения ЛПС, синтезируемого бактериями в организмах блохи и теплокровного хозяина, позволило бы подобрать для дальнейших лабораторных исследований условия *in vitro*, которые позволят получить формы

ЛПС, характерные для данного инфицированного животного.

Выявление структурно-функциональных взаимосвязей ЛПС *Y. pestis* открывает новые пути к разработке эффективных живых чумных вакцин на основе аттенуированных штаммов с пониженной реактогенностью. Перспективным представляется подход, основанный на генно-инженерной модификации ЛПС *Y. pestis*, предполагающей снижение степени ацилирования липида А. Способность избежать распознавание защитной системой хозяина на самом раннем этапе внедрения позволяет аттенуированному штамму с мутантным ЛПС быстро размножиться, но отсутствие одного из основных факторов патогенности вследствие мутации, использованной для аттенуации, не дает инфекции генерализоваться. В дальнейшем это обеспечивает эффективную выработку антител к основным антигенам чумного микроба и формирование приобретенного иммунитета. Альтернативным подходом в терапии чумы может стать создание эффективных и высокоселективных антимикробных препаратов нового поколения на основе высокоаффинных олигонуклеотидных лигандов. Выяснение генетического контроля ключевых этапов биосинтеза ЛПС, вмешательство в которые нарушает функционирование внешней мембраны и ослабляет действие других факторов вирулентности, позволит предложить новые молекулярные мишени для таких антибиотиков. ●

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Супотницкий М.В., Супотницкая Н.С. Очерки истории чумы. М.: Вузовская книга, 2006. Кн. 1. 468 с.; Кн. 2. 696 с.
2. Анисимов А.П. // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 2002. № 3. С. 3–23.
3. Анисимов А.П. // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 2002. № 4. С. 3–11.
4. Perry R.D., Fetherston J.D. // Clin. Microbiol. Rev. 1997. V. 10. P. 35–66.
5. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. // Clin. Microbiol. Rev. 2004. V. 17. P. 434–464.
6. Платонов М.Е. Молекулярно-генетическое изучение разнообразия и микроэволюции *Yersinia pestis*: Дис. ... канд. мед. наук. Оболensk: ГИЦ ПМБ, 2010. 142 с.
7. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., et al. // PLoS ONE. 2009. V. 4. P. e6000.
8. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zöller L., Wölfel R., Le Flèche P., Scholz H.C. // PLoS ONE. 2012. V. 7. P. e30624.
9. Raetz C.R.H., Whitfield C. // Annu. Rev. Biochem. 2002. V. 71. P. 635–700.
10. Knirel Y.A., Dentovskaya S.V., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z., Kocharova N.A., Anisimov A.P. // J. Endotoxin Res. 2006. V. 12. P. 3–9.
11. Бывалов А.А., Оводов Ю.С. // Биоорган. химия. 2011. Т. 37. С. 452–463.
12. Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V., Fursova N.K., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., et al. // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 1731–1743.
13. Vinogradov E.V., Lindner B., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Holst O., Gremyakova T.A., Shaikhutdinova R.Z., Anisimov A.P. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 775–777.
14. Holst O. Endotoxin in Health and Disease. NY: Marcel Dekker, 1999. P. 115–154.
15. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.Z., Gnade B.T., Mueller A.J., Fernandez-Prada C.M., Nikolich M.P. // PLoS ONE. 2011. V. 6. P. e25486.
16. Kiljunen S., Datta N., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Knirel Y.A., Bengoechea J.A., Holst O., Skurnik M. // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 4963–4972.
17. Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V., Shaikhutdinova R.Z., Senchenkova S.N., Kocharova N.A., Holst O., Pier G.B., Anisimov A.P. // Carbohydr. Res. 2005. V. 340. P. 1625–1630.
18. Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Шайхутдинова Р.З., Кондакова А.Н., Быстрова О.В., Линднер Б., Книрель Ю.А., Анисимов А.П. // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 237–246.
19. Knirel Y.A., Kondakova A.N., Bystrova O.V., Lindner B., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. // Adv. Sci. Lett. 2008. V. 1. P. 192–198.
20. Aussel L., Thérissod H., Karibian D., Perry M.B., Bruneteau

- M., Caroff M. // *FEBS Lett.* 2000. V. 465. P. 87–92.
21. Rebeil R., Ernst R.K., Gowen B.B., Miller S.I., Hinnebusch B.J. // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 52. P. 1363–1373.
22. Rebeil R., Ernst R.K., Jarrett C.O., Adams K.N., Miller S.I., Hinnebusch B.J. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 1381–1388.
23. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H., Lindner B., Matsuura M. // *Infect. Immun.* 2002. V. 70. P. 4092–4098.
24. Jones J.W., Shaffer S.A., Ernst R.K., Goodlett D.R., Tureček F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 12742–12747.
25. Jones J.W., Cohen I.E., Tureček F., Goodlett D.R., Ernst R.K. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010. V. 21. P. 785–799.
26. Vinogradov E.V., Knirel Y.A., Thomas-Oates J.E., Shashkov A.S., Lvov V.L. // *Carbohydr. Res.* 1994. V. 258. P. 223–232.
27. Montminy S.W., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E., Fukase K., Kusumoto S., Sweet C., Miyake K., et al. // *Nat. Immunol.* 2006. V. 7. P. 1066–1073.
28. Kondakova A.N., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Dentovskaya S.V., Shashkov A.S., Anisimov A.P., Knirel Y.A. // *Carbohydr. Res.* 2009. V. 344. P. 2421–2423.
29. Skurnik M., Peippo A., Ervelä E. // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 37. P. 316–330.
30. Дентовская С.В., Шайхутдинова Р.З., Книрель Ю.А., Иванов С.Л., Анисимов А.П. // *Молекул. генетика, микробиология и вирусология.* 2006. № 2. С. 3–8.
31. Bishop R.E. // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 57. P. 900–912.
32. Дентовская С.В., Анисимов А.П., Кондакова А.Н., Быстрова О.В., Линднер Б., Светоч Т.Э., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Книрель Ю.А. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. С. 989–1005.
33. Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Kondakova A.N., Lindner B., Shaikhutdinova R.Z., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Knirel Y.A. *The Challenge of Highly Pathogenic Microorganisms – Mechanism of Virulence and Novel Medical Countermeasures.* Dordrecht: Springer, 2010. P. 77–87.
34. Knirel Y.A., Dentovskaya S.V., Bystrova O.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Lindner B., Pier G.B., Anisimov A.P. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. V. 603. P. 88–96.
35. Carty S.M., Sreekumar K.R., Raetz C.R.H. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 9677–9685.
36. Bishop R.E., Gibbons H.S., Guina T., Trent M.S., Miller S.I., Raetz C.R. // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 5071–5080.
37. Gunn J.S., Lim K.B., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S.I. // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 27. P. 1171–1182.
38. Trent M.S., Ribeiro A.A., Doerrler W.T., Lin S., Cotter R.J., Raetz C.R.H. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 43132–43144.
39. Winfield M.D., Latifi T., Groisman E.A. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 14765–14772.
40. Meredith T.C., Aggarwal P., Mamat U., Lindner B., Woodard R.W. // *ACS Chem. Biol.* 2006. V. 1. P. 33–42.
41. Reynolds C.M., Raetz C.R. // *Biochemistry.* 2009. V. 48. P. 9627–9640.
42. Tan L., Darby M. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 6599–6600.
43. Pacinelli E., Wang L., Reeves P.R. // *Infect. Immun.* 2002. V. 70. P. 3271–3276.
44. Hitchen P.G., Prior J.L., Oyston P.C., Panico M., Wren B.W., Titball R.W., Morris H.R., Dell A. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 44. P. 1637–1650.
45. Chung H.S., Raetz C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 510–515.
46. Reynolds C.M., Kalb S.R., Cotter R.J., Raetz C.R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 21202–21211.
47. Touze T., Tran A.X., Hankins J.V., Mengin-Lecreulx D., Trent M.S. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 67. P. 264–277.
48. Prior J.L., Parkhill J., Hitchen P.G., Mungall K.L., Stevens K., Morris H.R., Reason A.J., Oyston P.C.F., Dell A., Wren B.W., Titball R.W. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2001. V. 197. P. 229–233.
49. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. // *Nature.* 2009. V. 458. P. 1191–1195.
50. Anisimov A.P., Shaikhutdinova R.Z., Pan'kina L.N., Feodorova V.A., Savostina E.P., Bystrova O.V., Lindner B., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., et al. // *J. Med. Microbiol.* 2007. V. 56. P. 443–453.
51. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H., Saito S., Kawahara K. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2010. V. 17. P. 49–55.
52. Telepnev M.V., Klimpel G.R., Haithcoat J., Knirel Y.A., Anisimov A.P., Motin V.L. // *J. Infect. Dis.* 2009. V. 200. P. 1694–1702.
53. Sun W., Six D., Kuang X., Roland K.L., Raetz C.R.H., Curtis R. III. // *Vaccine.* 2011. V. 29. P. 2986–2998.
54. Feodorova V.A., Pan'kina L.N., Savostina E.P., Sayapina L.V., Motin V.L., Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Lindner B., Kondakova A.N., et al. // *Vaccine.* 2007. V. 25. P. 7620–7628.
55. Feodorova V.A., Pan'kina L.N., Savostina E.P., Kuznetsov O.V., Konnov N.P., Sayapina L.V., Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Ageev S.A., Lindner B., et al. // *Vaccine.* 2009. V. 27. P. 2240–2250.
56. Bengoechea J.A., Brandenburg K., Seydel U., Díaz R., Moriyón I. // *Microbiology.* 1998. V. 144. P. 1517–1526.
57. Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Shaikhutdinova R.Z., Balakhonov S.V., Lindner B., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Holst O., et al. // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. P. 7324–7331.
58. Klein K.A., Fukuto H.S., Pelletier M., Romanov G., Grabenstein J.P., Palmer L.E., Ernst R., Bliska J.B. // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. P. 653–662.
59. Bartra S.S., Styer K.L., O'Bryant D.M., Nilles M.L., Hinnebusch B.J., Aballay A., Plano G.V. // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. P. 612–622.
60. Kolodziejek A.M., Schnider D.R., Rohde H.N., Wojtowicz A.J., Bohach G.A., Minnich S.A., Hovde C.J. // *Infect. Immun.* 2010. V. 78. P. 5233–5243.
61. Darby C., Ananth S.L., Tan L., Hinnebusch B.J. // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. P. 7236–7242.
62. Tidhar A., Flashner Y., Cohen S., Levi Y., Zauberman A., Gur D., Aftalion M., Elhanany E., Zvi A., Shafferman A., et al. // *PLoS ONE.* 2009. V. 4. P. e7023.
63. Kukkonen M., Suomalainen M., Kyllonen P., Lahteenmaki K., Lang H., Virkola R., Helander I.M., Holst O., Korhonen T.K. // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 51. P. 215–225.
64. Pouillot F., Derbise A., Kukkonen M., Foulon J., Korhonen T.K., Carniel E. // *Microbiology.* 2005. V. 151. P. 3759–3768.
65. Suomalainen M., Lobo L.A., Brandenburg K., Lindner B., Virkola R., Knirel Y.A., Anisimov A.P., Holst O., Korhonen T.K. // *Infect. Immun.* 2010. V. 78. P. 2644–2652.
66. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2007. Т. 93. С. 49–51.
67. Eren E., Murphy M., Goguen J., van den Berg B. // *Structure.* 2010. V. 18. P. 809–818.
68. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M., Georgescu A.M., Vergez L.M., Land M.L., Motin V.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 13826–13831.

УДК 575.112; 577.21

# Полигенный подход к исследованиям полигенных заболеваний

D. Lvovs<sup>1\*</sup>, О. О. Фаворова<sup>2,3</sup>, А. В. Фаворов<sup>1,4,5</sup><sup>1</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития Российской Федерации, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1<sup>3</sup> Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития Российской Федерации, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а<sup>4</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3<sup>5</sup> Johns Hopkins University School of Medicine, 550 North Broadway, Baltimore, MD 21205, US

\*E-mail: dmitrijs.lvovs@gmail.com

Поступила в редакцию 02.05.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Полигенные заболевания возникают в результате совместного вклада множества независимо действующих или взаимодействующих полиморфных генов, причем вклад каждого из них по отдельности может быть невелик или вовсе не проявляться. Носительство тех или иных сочетаний генов может определять возникновение клинически гетерогенных форм заболевания и эффективность лечения. Описаны подходы к полигенному анализу данных медицинской геномики, в частности фармакогеномики, направленные на выявление кумулятивного эффекта нескольких генов. Этот эффект может возникать как в результате суммирования независимых вкладов аллелей отдельных генов, так и вследствие эпистатического взаимодействия между ними. Оба эти случая представляют несомненный интерес для исследования природы полигенных заболеваний. Рассмотрены способы, позволяющие дискриминировать эти две возможности. Представлены описание и сравнение биоинформатических методов поиска сочетаний аллелей различных генов, ассоциированных с фенотипическими признаками полигенного заболевания, а также способы отображения и валидации полученных результатов. Предпринята попытка оценить применимость существующих методов к анализу эпистаза. Описаны и обобщены результаты, полученные авторами с применением программного обеспечения APSampler.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** медицинская геномика, фармакогеномика, полигенные заболевания, полигенный анализ, эпистаз.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ПО – программное обеспечение; РС – рассеянный склероз; ИИ – ишемический инсульт; CI – доверительный интервал (Confidence Interval); RR – относительный риск (Relative Risk); OR – отношение шансов (Odds Ratio); ORR – отношение наблюдаемого отношения шансов к ожидаемому (Odds Ratios Ratio); SF – фактор синергии (Synergy Factor); FDR – частота ложных открытий (False Discovery Rate); GWAS – полногеномное исследование ассоциаций (Genome-Wide Association Study); CDRV – распространенное заболевание, редкий аллель (Common Disease, Rare Variant); CDCV – распространенное заболевание, распространенный аллель (Common Disease, Common Variant); CMC – сочетание анализа многих переменных и свертки (Combined Multivariate and Collapsing); MCMC – метод Монте-Карло Марковскими цепями (Markov Chain Monte Carlo); MDR – метод снижения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction); TDT – тест неравновесной передачи аллелей (Transmission Disequilibrium Test).

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно представлениям классической генетики, наследственные болезни делятся на менделирующие и комплексные (многофакторные). Первые определяются носительством мутантного варианта единственного гена, тогда как вторые зависят как от генетической компоненты, определяющейся совместным вкладом множества независимо действующих или взаимодействующих полиморфных генов,

так и от других факторов. При этом вклад каждого из генов в отдельности в развитие полигенного заболевания может быть небольшим. Носительство тех или иных аллельных сочетаний генов может определять также возникновение клинически гетерогенных форм заболевания и терапевтическую эффективность тех или иных лекарственных средств.

Полигенные заболевания человека намного более распространены, чем моногенные, они имеют огром-

ное социоэкономическое значение. Однако выяснение их молекулярно-генетической природы остается по сей день нерешенной задачей. Поиск генов, вовлеченных в развитие полигенных заболеваний, проводят, используя две основные стратегии: выяснение роли того или иного гена-кандидата, выбранного исходя из возможной роли его белкового продукта в этиопатогенезе заболевания, и полное геномное сканирование с использованием панели генетических маркеров, более или менее равномерно распределенных по геному. При этом экспериментальные подходы к установлению роли отдельных генов или значения отдельных областей генома состоят в анализе их сцепления или ассоциации с заболеванием.

Анализ сцепления проводят в семьях с несколькими больными; при выявлении у них общих аллельных вариантов роль гена в формировании предрасположенности к заболеванию можно считать доказанной. Однако недостатком этого метода является его низкая чувствительность; поэтому в последнее время предпочтение отдается обладающим большей статистической мощностью методам, основанным на анализе ассоциации.

Ассоциативное исследование – это попытка найти новые или проверить известные статистические взаимосвязи различных событий. Настоящие причины, порождающие такие взаимосвязи, часто находятся за пределами понимания или экспериментальных возможностей исследователя, однако, собрав статистику встречаемости сочетаний разных исходов наблюдений, можно сделать вывод о значимости (оценивается по вероятности получить наблюдаемый результат случайно) и интенсивности этих взаимосвязей. Ассоциацию того или иного полиморфного участка генома с фенотипическим признаком анализируют путем сравнения распределений его аллелей и генотипов в репрезентативных выборках индивидов, сформированных по наличию/отсутствию этого признака, которые должны соответствовать друг другу по распределению полов, возрасту и этнической принадлежности. Анализируемые аллельные варианты могут быть локализованы в любом участке ДНК, включая кодирующие последовательности (экзоны), интроны и промоторные области генов, где очень часто находятся участки регуляции транскрипции, а также другие области ДНК. При анализе экзонов представляют интерес не только несинонимические замены, которые определяют изменения в аминокислотной последовательности кодируемой белковой молекулы, но и замены синонимические, поскольку они могут влиять на структуру и стабильность мРНК и на кинетику ее трансляции за счет использования разных изоакцепторных тРНК. Однако не следует забывать, что, помимо прямой свя-

зи между исследованным локусом и наследуемым признаком, в основе ассоциации может лежать неравновесие по сцеплению между маркерным локусом и истинным локусом заболевания, если эти локусы расположены достаточно близко друг от друга.

Ассоциативные исследования призваны связать значимые для медицины фенотипические признаки с такими характеристиками, как аллельные вариации генома, эпигенетические модификации, воздействие окружающей среды, образа жизни и т.д. В качестве фенотипических признаков, представляющих ценность для персонализированной медицины, как правило, рассматривают возникновение заболевания, характер его течения (клиническая картина, степень поражения систем организма и пр.) или эффективность лечения тем или иным препаратом (область интересов науки фармакогеномики). В этом обзоре мы предполагаем сфокусировать внимание на ассоциации индивидуальных признаков с носительством аллельных вариантов генома. Выявление таких ассоциаций позволяет оценивать риск развития заболевания (предрасположенность к нему), предсказывать характер его течения и отдавать предпочтение тем или иным методам профилактики, диагностики и лечения исходя из особенностей генома индивида.

Анализ ассоциаций полигенных заболеваний с сочетанной встречаемостью аллелей различных генов остается относительно неразработанным направлением исследований. Во многом это связано с тем, что увеличение числа рассматриваемых генов ведет к экспоненциальному росту числа сочетаний их аллельных вариантов, что делает анализ стандартными методами перебора практически невозможным.

Настоящий обзор посвящен биоинформатическим методам поиска сочетаний аллелей различных генов, ассоциированных с фенотипическими признаками полигенного заболевания, а также способам отображения и валидации полученных результатов. Эти методы, которые мы будем далее для краткости называть методами полигенного анализа, направлены на выявление кумулятивного эффекта генов и его природы. Ассоциация с сочетанием может быть обусловлена взаимозависимостью влияний входящих в сочетание аллелей на фенотип, т.е. нелинейным (эпистатическим) взаимодействием между генами. Альтернативно, аллельное сочетание, значимо влияющее на развитие признака, может возникать в результате суммирования малых независимых подпороговых вкладов аллелей, входящих в сочетание. Оба эти случая будут рассмотрены в обзоре.

### АССОЦИАТИВНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Два основных вида ассоциативных исследований, а именно когортные и выполненные методом



«случай–контроль», различаются между собой по временной последовательности сбора информации и, как следствие, по параметрам, которые можно оценить исходя из наблюдений. В когортных исследованиях отобранную группу индивидов делят на две подгруппы – обладающих и не обладающих определенным индикаторным признаком (например, подгруппы носителей и неносителей определенного генотипа, подгруппы курящих и некурящих). Эти подгруппы наблюдают в течение некоторого временного интервала на предмет развития признака, представляющего интерес с точки зрения его предсказания (целевого признака), например, заболевания. Такой подход дает возможность численно выразить интенсивность вклада индикаторного признака в развитие целевого признака через отношение вероятностей заболевания у носителей и неносителей индикаторного признака. Оценкой этой величины является относительный риск (Relative Risk, RR).

Более распространенный вид ассоциативных исследований – исследование методом «случай–контроль». Выборку при этом делят на две группы – обладающих и не обладающих на момент исследования целевым признаком, например, больные и здоровые. В каждой из групп учитывается наличие индикаторных признаков, которые могли бы повлиять на возникновение болезни. При этом за кадром остаются люди, которые умерли до начала исследования, и чем выше уровень летальности заболевания, тем менее точна оценка уровня ассоциации по величине RR. В качестве критерия степени различия между носителями и неносителями индикаторного признака в исследованиях «случай–контроль» принято использовать величину отношения шансов (Odds Ratio, OR) [1]. Если абсолютный риск заболевания у неносителей мал, то величины OR и RR близки; чем он больше, тем сильнее OR превосходит RR. OR всегда больше, чем RR.

Результаты, полученные методом «случай–контроль», могут искажаться вследствие этнической гетерогенности сравниваемых групп, а также под влиянием неучтенных факторов окружающей среды [2]. Методы анализа на семейном материале (например, сравнение больных и здоровых братьев и сестер [3]) менее подвержены этим искажениям, но их требования ко входным данным (нужны пары больных и здоровых близких родственников, лучше всего сибсов) делают их малоприменимыми для получения достоверных зависимостей. Несколько менее жесткие требования к входной выборке предъявляет метод оценки неравновесной передачи аллелей (Transmission Disequilibrium Test, TDT) [4], в основе которого лежит анализ передачи маркерного аллеля от гетерозиготных здоровых родителей больному

ребенку. Полученные данные сравнивают с ожидаемыми при менделевском наследовании и в случае неравновесного переноса аллеля делают вывод о связи аллеля с заболеванием. Еще один метод анализа ассоциации на семейном материале – метод AFBAC (Affected Family-Based Control), в котором группа сравнения составлена из совокупности тех аллелей здоровых родителей, которые не переданы больным потомкам (по одному аллелю от каждого из родителей) [5].

При анализе ассоциации часто и предсказываемые (зависимые), и предсказывающие (независимые) признаки – это категории, разделяющие выборку на два класса (например, «больной» и «здоровый» или «носитель» и «неноситель»). Такие данные удобно представлять в виде таблицы  $2 \times 2$  (таблица сопряженности, contingency table), значения из которой используются для подсчетов величин, характеризующих силу ассоциации (OR) и ее значимость (величина  $p$ ) по точному критерию Фишера, предложенному в 1922 г. и сохранившему свое значение до наших дней [6].

Если признак представляют более чем двумя классами, которые можно упорядочить (например, используя принятые медицинским сообществом шкалы для описания степени или тяжести заболевания), составляют  $2n$ -польные (здесь  $n$  – число градаций признака) таблицы, и для оценки силы и уровня значимости ассоциации используют критерий гамма Гудмана–Крускала [7]. Если упорядочивание не имеет смысла, то может использоваться или тест Фримена–Гальтона, дополняющий тест Фишера для более чем двух категорий [8], или критерий хи-квадрат [9].

### МЕТОДЫ ПОЛИГЕННОГО АНАЛИЗА

Все подходы к многофакторному анализу и к полигенным исследованиям ассоциаций, как к его частному случаю, можно разделить на два принципиально различающихся типа: 1) использование сокращенного количества входных переменных на основе каких-либо априорных знаний и 2) полный анализ всех доступных переменных. Сокращение количества возможных переменных в полигенных исследованиях – это априорный отбор нескольких генов-кандидатов, применительно к которым проводят анализ ассоциации [10]. Этот подход позволяет существенно уменьшить расходы на генотипирование и уменьшить пространство анализа, тем самым снижая его сложность и сокращая время, необходимое на вычисления. С другой стороны, если эффект гена проявляется только во взаимодействии с другими генами и вследствие этого не наблюдается при отдельном рассмотрении (другими словами, отсутствует маргинальный эффект [11, 12]), такой ген вряд ли попадет в список

генов-кандидатов, хотя в действительности его роль может быть значимой. Сейчас, благодаря постоянному развитию как вычислительных мощностей, так и технологий генотипирования, популярность набирают методы полногеномного поиска ассоциаций по всему геному (Genome-Wide Association Study, сокращенно GWAS) [13–16], представляющие собой второй тип полигенного анализа, т.е. анализ всех доступных переменных.

При анализе полногеномных данных неизбежно наблюдаются крайне редкие аллели. Рассмотрение таких аллелей по отдельности не позволяет сделать заключение о влиянии каждого из них на заболевание, но если рассматривать общий эффект нескольких аллелей, то наблюдений может оказаться достаточно для подтверждения предположения об их общем влиянии. Иными словами, информация о каждом из редких аллелей недостаточна, но ею не следует пренебрегать: при аккумуляции информации о нескольких редких аллелях ассоциация может оказаться достоверной. Такой эффект называется аддитивным, он может наблюдаться не только на редких аллелях, однако в случае редких аллелей это основной способ ассоциативного исследования. Сейчас становится общепринятой теория, объясняющая возникновение многих распространенных болезней носительством редких аллелей, получившая название CDRV (Common Disease, Rare Variant) [17, 18] («распространенное заболевание, редкий аллель»), которая представляет собой альтернативу теории CDCV (Common Disease, Common Variant, «распространенное заболевание, распространенный аллель»). Активно развиваются методы, специально предназначенные для учета аддитивного вклада редких аллелей, такие, как метод свертки (CMC, Combined Multivariate and Collapsing) [19], статистика взвешенных сумм [20], тест нагрузки на ген (burden test) [21].

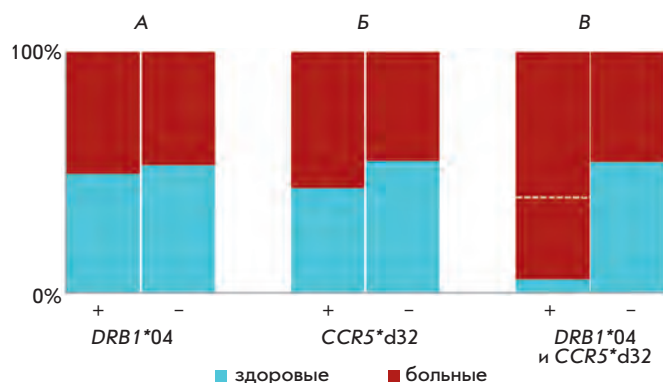
При полигенном анализе особенно актуальной становится проблема учета множественности гипотез. Кратко ее можно сформулировать так: при увеличении числа тестируемых гипотез растет вероятность случайно получить любой, в том числе и маловероятный, результат, что уменьшает значимость утверждения, согласно которому наблюдаемые статистические взаимосвязи действительно отражают какие-то закономерности, а не являются случайными.

При малом, но не равном одному, числе сравнений, используемых при исследовании ассоциации признака с несколькими аллелями одного высокополиморфного гена или при одновременной оценке роли нескольких биаллельных генов-кандидатов, такое уменьшение значимости учитывается поправкой Бонферрони [22], просто умножающей соответствующие величины  $p$  на число проведенных тестов,

однако поправка Бонферрони оказывается слишком консервативной из-за лежащего в ее основе допущения о независимости тестов. Более точная поправка может быть получена методом Вестфолла–Янга [23], который не вводит этого допущения, а сравнивает лучшее из наблюдений с лучшими же наблюдениями в перемешанных выборках. Другой подход к этой проблеме заключается в том, чтобы оценивать не уровень значимости того, что среди результатов после их отбора по порогу достоверности нет ни одного ложного (случайного) (Family-Wise Error Rate, FWER), а частоту ложных открытий (False Discovery Rate, FDR) [24, 25].

В последнее время широко обсуждается возможность взаимодействия генов, или эпистаза. В значительной степени интерес к этой теме связан с плохой воспроизводимостью результатов по оценке роли отдельных генов в формировании предрасположенности к комплексным заболеваниям, особенно при полногеномных исследованиях. Существует некоторая неоднозначность понятий «эпистаз» и «эпистатическое взаимодействие»: исходно под ними подразумевали полное маскирование эффекта полиморфизма одного локуса полиморфизмом другого локуса, а позднее – и любые другие типы влияния одних полиморфизмов на проявление других в фенотипе. Различия в интерпретациях термина «эпистаз», а также проблемы, связанные с такими разночтениями, хорошо описаны в [26, 27].

На *рис. 1* в форме визуализированных четырехпольных таблиц сопряженности представлены результаты анализа вклада носительства аллеля \*04 гена *DRB1* HLA класса II (аллель *DRB1\*04*) (A), аллеля с делецией 32 нуклеотидов гена хемокинового рецептора *CCR5* (*CCR5\*d32*) (B) и их сочетания (B) в развитие одного из типичных полигенных заболеваний – рассеянного склероза (РС), основанные на экспериментальных данных из статьи [28]. Во всех случаях больных РС и здоровых разделяли на два класса по принципу носительства/неносительства аллеля (не различая гомо- и гетерозиготы по этому аллелю). При этом полиморфизм гена *CCR5* действительно является биаллельным (аллель с делецией и аллель дикого типа), тогда как в случае гена *DRB1* анализировали 18 групп аллелей этого высокополиморфного гена, и в группу носителей *DRB1\*04* попали носители всех остальных аллелей этого гена. Как видно на *рис. 1B*, носительство сочетания *DRB1\*04* и *CCR5\*d32* ассоциировано с заболеванием гораздо сильнее, чем ожидается исходя из аддитивного вклада составляющих его аллелей, что можно интерпретировать как следствие эпистатического взаимодействия между рассматриваемыми генами. Этот пример демонстрирует простейший тип поли-



**Рис. 1.** Визуализация четырехпольных таблиц носительства больными РС и индивидами контрольной группы аллелей генов главного комплекса гистосовместимости *HLA-DRB1* (A), хемокинового рецептора *CCR5* (B) и их сочетаний (B) (на основании данных [28] для этнических русских). Бордовым показаны поля для больных, голубым – для контрольной группы, соотношение полей по вертикали отражает распределение среди них носителей (+) и неносителей (–) аллелей *DRB1\*04* (A), *CCR5\*d32* (B) и сочетания *DRB1\*04* и *CCR5\*d32* (B). Горизонтальная пунктирная линия (B) соответствует ожидаемому отношению числа больных и контролей среди носителей сочетания, вычисленному в предположении о независимом влиянии аллелей.

генного анализа, когда ограничиваются рассмотрением совместного вклада двух аллелей в формирование фенотипа.

В работе [29] мы предложили использовать в качестве численной меры величины эпистаза отношение наблюдаемого для сочетания аллелей OR к ожидаемому OR (далее мы будем называть ее ORR, Odds Ratios Ratio). Она основана на представлении, что если два или более аллелей в составе сочетания не взаимодействуют, то величина OR при носительстве этого сочетания будет примерно равна произведению OR отдельных аллелей, входящих в сочетание. Это произведение мы рассматривали как ожидаемое OR и сравнивали его с наблюдаемым OR. Чем больше их отношение отличается от 1, тем более сильного эпистатического взаимодействия между генами можно ожидать.

Величина ORR [29] применима для анализа взаимодействия как двух, так и многих аллелей, но существенным ее недостатком является отсутствие метода оценки доверительного интервала (Confidence Interval, CI). Мера эпистаза SF, описанная в работе [11], обладает «зеркальными» достоинствами и недостатками: для нее приведен способ расчета CI, но она

применима для анализа взаимодействия только двух аллелей (или других бинарных индикаторных признаков). Обе величины представляют собой отношения наблюдаемого для сочетания аллелей OR к произведению OR, наблюдаемых порознь для его составляющих, однако значения OR вычисляются по-разному. Если ORR сравнивает у больных и контролей число носителей и неносителей индикаторного признака (будь то сочетание аллелей или отдельный аллель), как это показано на рис. 1, то в случае SF носители пары, а также носители каждого из аллелей, входящих в сочетание, сопоставляются с неносителями ни одного из аллелей, при этом все четыре группы не пересекаются. Как и в случае ORR,  $SF > 1$  говорит о положительном (взаимоусиливающем) взаимодействии, а  $SF < 1$  – об отрицательном (компенсаторном). В принципе, величину SF можно рассчитать более чем для двух аллелей, однако результат зависит от порядка их объединения в сложные признаки. Таким образом, целесообразно использовать обе эти оценки.

Существующие средства анализа кумулятивного эффекта нескольких генетических переменных используют различные алгоритмы интеллектуального анализа данных (data mining).

Среди этих средств наиболее популярна классическая логистическая регрессия, в которой взаимодействию соответствуют коэффициенты при членах модели порядка 2 и выше [30]. Для поиска таким методом наиболее сильно взаимодействующей комбинации аллелей придется проводить моделирование многократно, из-за чего статистическая мощность метода теряется. Двухступенчатый вариант, реализованный в GenABEL [31, 32], предоставляет решение проблемы множественного тестирования, используя информацию о дисперсии в индивидуальных локусах для отбора тех из них, в которых вероятность взаимодействия больше. Используются также различные эвристические методы: генетическое программирование [33], нейронные сети [34], поиск шаблонов (pattern mining) [35], методы, основанные на уменьшении размерности [36], и методы Монте-Карло Марковскими цепями (Markov Chain Monte Carlo, MCMC), к которым относятся APSampler [37, 38], BEAM [39, 40] и логическая регрессия LogicReg [41–43].

Ассоциацию носительства любого определенного сочетания аллелей (или другого индикаторного признака) с фенотипом можно оценить так же, как это делается в случае одного аллеля (признака). Иными словами, каждое сочетание может рассматриваться как единый (составной) признак и характеризоваться уровнем значимости ассоциации и величинами RR или OR. Число возможных сочетаний очень велико, и на первый план выходит задача поиска тех из них, для которых ассоциация наиболее значима.

Проведение многофакторного анализа ассоциации возможно также на семейных данных. Существуют мультиаллельные и мультилокусные версии TDT [4], который основан на статистике МакНемара и изначально был разработан для одиночных биаллельных локусов. Способы расширения TDT для нескольких аллельных вариантов предложены рядом авторов. Они включают вычисление маргинальной равномерности [44]; поочередную группировку аллелей в две группы: «исследуемый аллель» и «остальные аллели», с последующим проведением теста МакНемара и коррекцией на множественное тестирование [45]; и, наконец, вычисление неравномерного переноса аллелей с использованием логистической регрессии [46], наиболее подходящее для высокополиморфных локусов. При проведении анализа одновременно на нескольких локусах применяют методы, в которых генотип ребенка сопоставляется со всеми возможными для его родителей генотипами потомства [45, 47, 48]. Неравновесие по сцеплению между анализируемыми локусами или рассчитывается из анализируемой выборки, или берется из известных данных, например, из HAPMAP [49], как в программном обеспечении (ПО) FAMNAP [48, 50].

Далее мы подробнее рассмотрим и сравним некоторые широко распространенные инструменты для полигенного анализа ассоциаций.

### PLINK

В Гарвардском университете создано и бесплатно распространяется ПО PLINK [30, 51], которое представляет собой большую взаимосвязанную коллекцию различных алгоритмов анализа генетических и фенотипических данных, в том числе и методов полигенного анализа. PLINK используется во многих исследованиях генетического взаимодействия (например, [52–55]).

Один из методов анализа взаимодействия генов в PLINK основан на рассмотрении регрессионных моделей [56]. При бивариантном исходе (например, «больной–здоровый») используют модель логистической регрессии, которая предполагает, что вероятность события (в данном случае заболевания) описывается как логистическая функция от линейной комбинации независимых переменных (предикторов) [57]. Для количественных фенотипов (таких, например, как три степени артериальной гипертензии) используют обычную линейную регрессию от тех же предикторов. Независимыми переменными при этом служат индикаторные функции, которые принимают числовые значения 1 или 0 в зависимости от того, представлен или нет в геноме определенный аллель или генотип (или от наличия другого индикаторного признака). Результатом анализа являются набор

регрессионных коэффициентов при индикаторных функциях аллелей и их сочетаний и уровни статистической значимости отличий этих коэффициентов от нуля. Высокая достоверность отличия от нуля коэффициента, соответствующего определенному сочетанию аллелей, свидетельствует о взаимодействии последних. Так работает, например, тест «PLINK – epistasis».

Более простой тест на взаимодействие – «PLINK – case-only», проверяет корреляцию между носительством больными нескольких генотипов. Если корреляция пары генотипов высока, а их сцепление можно исключить из рассмотрения, то делается вывод о взаимодействии. Этот тест основан на априорном предположении, что выявленная корреляция характерна только для больных. Двухступенчатая процедура, проверяющая наличие корреляции в общей выборке, свободна от этого предположения, однако и она может давать смещенные результаты [58].

Существенные достоинства ПО PLINK – его применимость для GWAS и большой набор доступных средств анализа, а недостаток – ограничения по формату данных: программа работает только с биаллельными маркерами.

### MDR

Для поиска полигенных ассоциаций методом «случай–контроль» сейчас широко применяется алгоритм снижения размерности MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) [59–62].

На первом этапе все данные случайным образом делят на две выборки: обучающую (например, 9/10 данных) и тестовую (например, 1/10 данных). Далее, для каждой комбинации аллелей и генотипов, присутствующей в обучающей выборке, рассчитывается параметр, характеризующий соотношение количества больных и здоровых, несущих эту комбинацию, и в зависимости от величины этого параметра комбинации классифицируются на категории, например, высокого и низкого риска. Таким образом осуществляется переход от  $n$ -мерного пространства всех единичных полиморфных участков и фенотипа к двумерному пространству, где одно измерение – это уровень риска, а второе – носительство данной комбинации аллелей. Среди всех комбинаций будет существовать такая, которая имеет наименьшую ошибку классификации в обучающей (Training Accuracy) и тестовой (Testing Accuracy) выборках. При этом разбиение на группы производят 10 раз, изменяя каждый раз параметры генератора случайных чисел. Параметр согласованности модели (Cross Validation Consistency) показывает, сколько раз из этих 10 она была найдена как лучшая. Модель считается валидированной, если ее согласованность не меньше 9/10.

Пакет ПО MDR включает в себя, кроме текстового отображения результатов, также графические дендрограммы, отображающие попарный анализ взаимодействия, где цветом показан тип взаимодействия локусов – от эпистаза до независимости, а длинной связи – его сила.

### МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА МСМС

Полный перебор всех комбинаций (например, применяемый в MDR) становится неэффективным при росте числа анализируемых аллелей из-за огромного количества возможных сочетаний: происходит так называемый комбинаторный взрыв. Кроме того, при таком переборе статистическая значимость найденных сочетаний становится неочевидной из-за проблемы множественного тестирования. С другой стороны, простые градиентные («жадные», greedy) методы, пошагово улучшающие промежуточный результат, часто могут не привести вообще ни к какому разумному итогу, поскольку находят лучшие варианты локально, а не глобально.

Существуют различные эвристические методы, позволяющие искать глобальный оптимум, не прибегая к полному перебору. Один из них – это метод Монте-Карло Марковскими цепями (Markov Chain Monte Carlo, МСМС), использованный разными авторами [38, 40, 63–65]. Главная идея метода состоит в том, что он, как и градиентный поиск, стремится перейти к решению, лучшему, чем имеющееся на данный момент, но, в отличие от градиентного поиска, с некоторой вероятностью может перейти и к худшему, причем вероятность эта уменьшается со степенью ухудшения решения.

### ВЕАМ

Алгоритм ВЕАМ (Bayesian Epistasis Association Mapping) [40, 66] при поиске ассоциаций опирается на то, что у ассоциированных с заболеванием локусов распределение генотипов у больных будет обязательно отличаться от распределения генотипов в контрольной группе. Цель алгоритма – классификация всех локусов на не ассоциированные с заболеванием, ассоциированные с ним поодиночке, ассоциированные и при этом эпистатически взаимодействующие. Программа находит наиболее вероятное при данных генотипах и уровнях заболевания разбиение локусов на эти три класса с помощью метода МСМС. Локусы считаются эпистатически взаимодействующими, если совместное распределение их аллелей/генотипов лучше соответствует данным, чем распределение, следующее из независимой модели (произведение распределений аллелей/генотипов). ВЕАМ может учитывать информацию о гаплотипах, чтобы отличать их от эпистатической взаимозависимости.

### Логическая регрессия

Существует также метод, использующий МСМС для оптимизации моделей регрессионного поиска полигенных ассоциаций, – это МСМС-версия алгоритма логической регрессии (Logic Regression) [43, 65]. Название метода напоминает более известную логистическую регрессию, которая решает сходную задачу другим способом. В качестве предикторов логической регрессии используются индикаторные функции логических комбинаций (логические функции) присутствия различных аллелей, при этом набор оптимальных функций определяется с помощью МСМС. Найденные логические функции явно показывают тип взаимодействия аллелей.

### APSampler

Логика анализа полигенных данных программой APSampler [38] значительно отличается от представленных ранее программных пакетов, в которых предсказываемый фенотипический признак может принимать только два значения, например «больной» и «здоровый». Использование в этом ПО непараметрического критерия Вилкоксона создает возможность проводить не только категориальное сравнение, но и анализировать данные с более чем двумя значениями целевого признака, в случае если эти значения можно ранжировать. Например, в случае инсульта для формирования сравниваемых групп можно использовать ряд международных шкал, по которым оценивают степень угнетения сознания, исходную тяжесть заболевания, клиническое состояние больного в остром периоде, исход инсульта (т.е. степень восстановления утраченных функций за определенный период от начала заболевания) и др., причем каждая из шкал имеет свой диапазон балльных оценок, но не менее трех. Основной объект, с которым работает программа APSampler в поисках предсказывающего индикаторного признака – это генетический паттерн, т.е. сочетание аллелей или генотипов различных локусов, ассоциированное с фенотипическим признаком. Поиск паттернов осуществляется с помощью МСМС, при этом на каждом шаге рассматривается сразу несколько паттернов, и их набор оптимизируется от шага к шагу с точки зрения вероятности того, что все паттерны из набора независимо друг от друга и одновременно ассоциированы с признаком. Для оценки вероятности ассоциации каждого из паттернов применяется непараметрический критерий Вилкоксона, при этом сравниваемые подвыборки устроены так, что они отличаются носительством только одного паттерна из набора. Результатом работы первого этапа программы является список паттернов, которые встретились при работе ПО. Затем происходит валидация этих результатов.

Краткое сравнение возможностей различных ПО для полигенного анализа ассоциаций

	APSampler [38]	BEAM [40]	LogicReg [43]	MDR [60]	PLINK [30]
Графический пользовательский интерфейс	-	- <sup>1</sup>	- <sup>2</sup>	+	+
Дихотомический фенотипический признак	+	+	+	+	+
Ранговый фенотипический признак	+	- <sup>3</sup>	-	-	+
Работа с пропущенными данными	+	+	+	- <sup>4</sup>	+
Статистический поиск комбинаций конкретных аллелей локусов, ассоциированных с фенотипом	+	+	+	- <sup>5</sup>	+ <sup>6</sup>
Оценка ассоциации для найденных сочетаний точным критерием Фишера	+	+	-	-	-
Процедура валидации	+	+	+	+	-
Полиаллельные локусы	+	- <sup>7</sup>	-	+	-
Поиск эпистаза	+ <sup>8</sup>	+	+	+	+
Графическое отображение эпистаза	- <sup>9</sup>	-	-	+	-
Возможность проведения анализа ассоциации для комбинации аллелей, указанной пользователем	+	-	-	+	- <sup>10</sup>
Полногеномный анализ	-	+	-	- <sup>11</sup>	+
Возможность запуска из командной строки (например, на сервере)	+	+	+	+	+
Работа в среде UNIX	+	+	+	+	+
Работа в среде Windows	+	+	+	+	+
Параллельные вычисления	+	- <sup>12</sup>	-	- <sup>11</sup>	-

<sup>1</sup> Существует версия BEAM, интегрированная в серверное приложение GALAXY [83].

<sup>2</sup> Алгоритм реализован в пакете для статистических вычислений и графики R [84].

<sup>3</sup> ПО автоматически разделяет данные на две категории, используя для этого среднее значение.

<sup>4</sup> Авторами предлагается специальное ПО – MDR Data Tool [85] для заполнения пустых значений.

<sup>5</sup> Программа находит взаимодействующие и ассоциированные с фенотипом локусы, а не их аллели.

<sup>6</sup> Предлагается только попарный поиск.

<sup>7</sup> Количество аллелей в каждом локусе должно быть одинаковым.

<sup>8</sup> Несмотря на то что поиск эпистатически взаимодействующих аллелей не объявлен конкретной функцией программы APSampler, опыт практического применения ПО указывает на возможность применения данной программы для поиска эпистаза.

<sup>9</sup> Создана программа на языке Perl для графического отображения эпистаза [37].

<sup>10</sup> Предлагается анализ ассоциации гаплотипа.

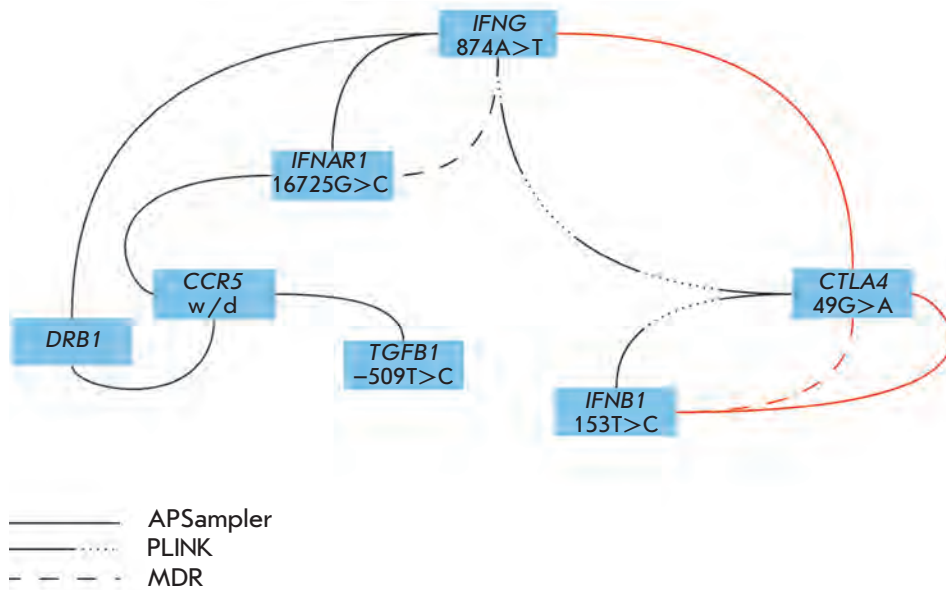
<sup>11</sup> Для этой цели предусмотрено специальное ПО [86].

<sup>12</sup> Отдельное ПО PBEAM для параллельных исчислений [87].

Для каждого паттерна из списка вычисляется значимость ассоциации по Фишеру в случае двоичного исхода или по Крускалу–Гудману [7] в случае более чем двух категорий. Затем программа несколько раз перемешивает метку фенотипического признака и еще раз запускает поиск ассоциированных паттернов. Достоверности ассоциации по результатам запусков с перемешанным фенотипом дают распределение достоверностей находок при условии нулевой гипотезы, утверждающей отсутствие действитель-

ных ассоциаций в начальных данных. Это нулевое распределение используется для валидации сочетаний, найденных на первом этапе.

В таблице сведена воедино информация о функциональных возможностях описанных выше программ для полигенного анализа ассоциаций. Данные таблицы свидетельствуют о том, что предлагаемые программы для полигенного анализа существенно различны по своим функциям. Например, MDR очень удобен благодаря наличию пользовательского



**Рис. 2.** Поиск программы APSampler, MDR и PLINK биаллельных сочетаний генов иммунного ответа, ассоциированных с эффективностью лечения РС препаратом глатирамера ацетатом (на основании данных [29] для этнических русских). Программа APSampler [38] находит все биаллельные маркеры, определенные другими программами, а также идентифицирует другие сочетания. Красным отмечены сочетания, ассоциация которых с эффективностью лечения прошла валидацию пермутациями в программе APSampler ( $p < 0.1$ ) или кроссвалидацию программой MDR ( $CVC > 8/10$ ).

интерфейса и графическому отображению результатов, в том числе эпистаза. Следовательно, сравниваемые ПО применимы в разных случаях в зависимости от имеющихся генетических и фенотипических данных, содержания и формата желаемого результата, а также возможности пользователя оперировать ПО на уровне командной строки. Нужно также учитывать, что сам искомый результат сильно различается для разных программ. Например, MDR выдает найденные ассоциированные с фенотипом локусы и их комбинации, тогда как APSampler учитывает направление ассоциации, определяемое носительством аллелей локусов и их комбинации. И APSampler, и MDR работают с поливариантными входными признаками, в то время как остальные – только с бивариантными. Эти две программы схожи также в том, что позволяют провести анализ эпистатического взаимодействия уже после выявления ассоциации, тогда как ПО BEAM заранее разделяет все аллели на три группы: с краевым эффектом, эпистазом и отсутствием эффекта. Характеристики комбинаций локусов, которые приводит MDR, статистически обоснованы, но неочевидно соотносятся с силой ассоциации. LogicReg не приводит классически интерпретируемых величин ассоциации вообще. APSampler и BEAM решают эту проблему, приводя точный тест Фишера на ассоциацию найденных индикаторных признаков с фенотипом. В целом, BEAM, PLINK, MDR и LogicReg хорошо применимы к фундаментальным исследованиям, в том числе к изучению взаимодействия генов, либо для работы в составе большей ин-

тегрированной программной среды, но по умолчанию не обладают нужным набором функций для таких прикладных медико-генетических задач, как поиск маркеров предрасположенности или поиск фармакогенетических маркеров, для которых приспособлено ПО APSampler.

Мы применили эти пять программ в пользовательском режиме (т.е. со всеми настройками по умолчанию) к данным из [29]. BEAM не нашел ни одного сочетания с  $p < 0.05$ , а выдача LogicReg требовала дополнительной обработки. Результаты применения APSampler, MDR и PLINK представлены на рис. 2, из которого видно, что ПО APSampler находит как те сочетания, которые нашел MDR, так и те, которые нашел PLINK, при этом все находки APSampler'a, прошедшие валидацию, подтверждены хотя бы одной из этих программ.

### ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРОВЕДЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ APSampler

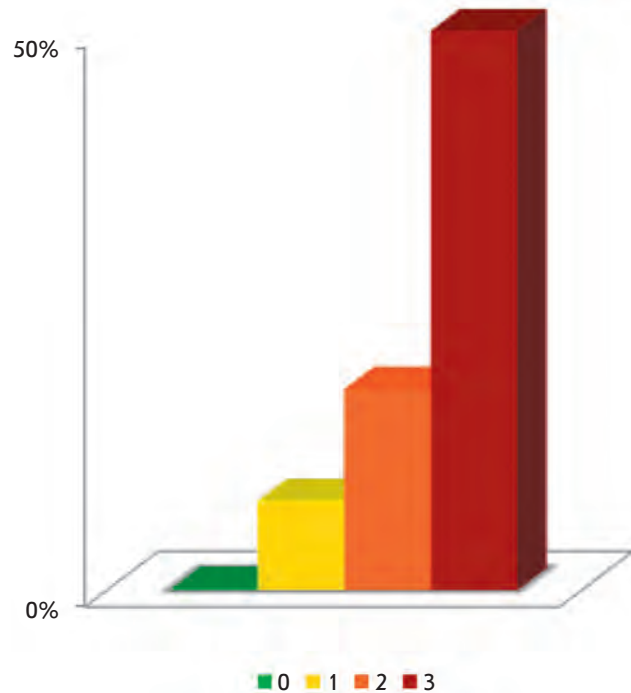
С момента первой публикации [38] было проведено довольно большое количество исследований с использованием ПО APSampler, причем в большинстве из них участвовали авторы этой программы по причине относительной сложности ее применения на начальных этапах разработки. Это позволило по мере использования алгоритма и с учетом пожеланий пользователей совершенствовать ПО, поэтапно добавляя к нему новые части, расширяющие возможности валидации [67], управления данными, представления результатов и получения справки

по использованию и устройству APSampler. В настоящее время созданы условия для свободного использования программы [37].

Используя ПО APSampler, авторы в рамках различных проектов анализировали кумулятивный эффект аллелей ряда генов-кандидатов с развитием рассеянного склероза (РС) [68], различных форм артериальной гипертензии [69–71], инфаркта миокарда [72], ишемического инсульта (ИИ) [73, 74] и геморрагического инсульта [75]. Исследования проводили, следуя принципу этнической гомогенности групп, у русских или у якутов. Популяция якутов представляет особый интерес с точки зрения этногеномики, поскольку в ней наблюдается эффект основателя, а также определенная географическая и культурная изолированность [76]. APSampler применяли также при фармакогенетических исследованиях РС, изучая связь генетического статуса пациентов с эффективностью лечения иммуномодулирующими препаратами – интерфероном бета ([67] у ирландцев) и глатирамера ацетатом ([29, 77] у русских).

В большинстве перечисленных работ сравнивали попарно группу неродственных больных с контрольной группой неродственных индивидов без изучаемого заболевания, сходной с выборкой больных по этнической принадлежности, соотношению полов и среднему возрасту. В некоторых случаях сравнивали две группы больных с клинически гетерогенными формами одного и того же заболевания (например, артериальная гипертензия, протекающая с гиперальдостеронизмом и без гиперальдостеронизма [69]). При исследовании генетической предрасположенности к артериальной гипертензии, предшествующей развитию ИИ, сначала разбивали больных на две подгруппы по уровню гипертензии, а затем с помощью таблицы сопряженности  $2 \times 4$  искали среди выявленных алгоритмом APSampler аллельных сочетаний такие, носительство которых характеризуется изменением в ряду от нормотоников до гипертоников 3-й степени [71]. При фармакогенетических исследованиях сравнивали попарно больных, отвечающих и не отвечающих на лечение, используя также подход «сравнение крайних».

Гены-кандидаты выбирали исходя из представлений об участии их белковых продуктов в процессах, вовлеченных в патогенез заболевания. При анализе генетической предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям выбирали гены, белковые продукты которых участвуют в воспалении, гены систем гемостаза, транспорта и метаболизма липидов, гены ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и некоторые другие. В случае РС продукты генов-кандидатов вовлечены в развитие иммунного ответа и хронического воспалительного процесса.



**Рис. 3.** Носительство выявленного с помощью ПО APSampler трехаллельного сочетания  $FGB^*-249C + APOE^*\epsilon 4 + CMA^*-1903A$  у якутских больных, перенесших ИИ и различающихся по уровню предшествующего артериального давления [71]. 0 – нормотоники, 1–3 – гипертоники 1-й, 2-й и 3-й степени соответственно, согласно критериям 2003 ESH/ESC [82]. Носительство представлено в процентах от общей численности каждой подгруппы.

Как правило, в этих генах типировали полиморфные участки (в основном однонуклеотидные полиморфизмы, или SNP), представляющие интерес с функциональной точки зрения, т.е. заведомо влияющие на количество или свойство кодируемого белкового продукта. Анализировали совместный вклад от одного десятка до нескольких десятков полиморфных маркеров в относительно небольших выборках, составляющих максимум 500 человек. Хотя этот типичный для российских исследований объем выборок не идет ни в какое сравнение с численностью групп, формируемых международными консорциумами, нам удалось выявить с помощью ПО APSampler высокозначимые ассоциации сочетаний аллелей/генотипов с изучаемым фенотипом. Это утверждение можно проиллюстрировать данными по ассоциации сочетания из аллелей трех генов ( $FGB^*-249C + APOE^*\epsilon 4 + CMA^*-1903A$ ) с уровнем артериальной гипертензии, предшествующей развитию ИИ у якутов (рис. 3). В выборке всего из 115 больных наблюдали монотонное нарастание частоты носительства



названного триаллельного сочетания от 0% у нормотоников до 47% от общей численности подгруппы у гипертоников 3-й степени; величина  $p$ , оцененная по Фишеру в таблице сопряженности 2 x 4, оказалась равной 0.0003. В этом случае мы наблюдали яркий пример эффекта совместного вклада генов, кодирующих компоненты трех различных важнейших систем гомеостаза – гемостаза (*FGB*), метаболизма липидов (*АРОЕ*) и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (*СМА*) в развитие полигенного заболевания – артериальной гипертензии, которая скорее всего возникает в результате суммирования независимых вкладов отдельных генов.

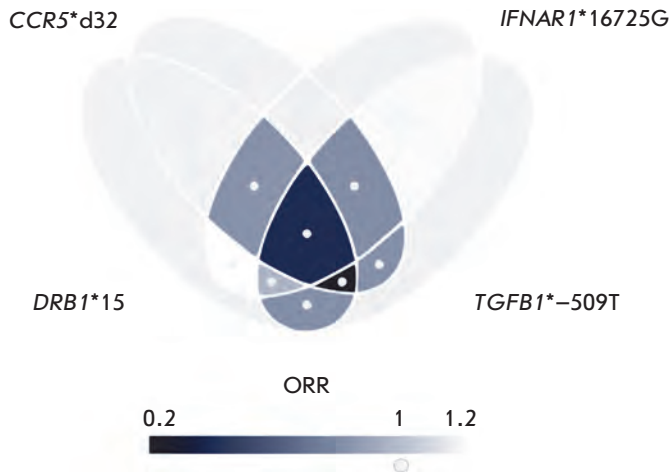
Причина такой высокой информативности при скромном объеме экспериментальных данных может быть связана с преимуществами, возникающими за счет этнической и клинической гомогенности используемых нами групп. Группы же из десятков тысяч пациентов из разных стран и лечебных учреждений, формируемые в рамках консорциумов, как правило, не отвечают условиям гомогенности ни по этнической принадлежности индивидов, ни по клинической картине, что может нивелировать их генетические отличия от контрольной группы. Однако основная причина высокой информативности результатов, полученных с помощью ПО APSampler, кроется, по-видимому, в высокой статистической мощности анализа. Не вдаваясь здесь в рассмотрение вопроса о том, что лежит в основе наблюдаемого феномена, можно констатировать, что выявление ассоциации аллелей/генотипов отдельных генов при анализе любого из исследуемых заболеваний было нечастым событием, тогда как обнаружить ассоциированные с фенотипом сочетания из двух–четырех аллелей нам удавалось практически во всех случаях. Здесь уместно оговориться, что наблюдаемая ассоциация могла быть как позитивной, так и негативной, причем выявлять разнонаправленный эффект альтернативных аллелей нам удавалось во многих, но не во всех случаях.

Ассоциация РС с аллелем гена *DRB1\*15* главного комплекса гистосовместимости [78, 79], с микросателлитным маркером *TNFa9* [80] и с биаллельным сочетанием *DRB1\*04* и *CCR5\*d32* [28] (см. *рис. 1*) у русских была показана ранее без применения APSampler'a и воспроизведена при анализе на независимой выборке с помощью алгоритма APSampler [68]. Репликация данных по ассоциации этих генетических факторов с развитием РС не только отвечает критериям, принятым мировым научным сообществом для признания полученных результатов, но и свидетельствует об эффективности использованного ПО.

Опираясь на описанные выше наблюдения, мы сформулировали понятие сочетания минималь-

ного множества (минимального сочетания) аллелей как фактора генетического риска, выявляемого в том или ином исследовании [68]. Под этим понимается, что любое подмножество этого множества характеризуется меньшей значимостью ассоциации. Так, нами были выявлены [68] два ассоциированных с РС триаллельных сочетания, включающие аллели полиморфных участков генов *DRB1*, *TGFB1*, *CTLA4* и *TNF*. Различия в частотах носительства входящих в состав «трио» биаллельных сочетаний и отдельных аллелей между больными и контрольной группой не достигали уровня значимости ( $p < 0.01$ ). Важно отметить, что подгруппы индивидов, несущих предрасполагающие к РС сочетания 1 и 2, не перекрывались и составляли около 5 и 9% больных РС и не выявлялись в контрольной группе. Таким образом, как при классическом моногенном доминантном заболевании, все носители того или другого сочетания в нашей выборке оказались больными. Аналогичные результаты получены и в других наших работах. В любом случае, минимальное множество аллелей представляет собой составной генетический маркер полигенного заболевания или другого фенотипа.

Вопрос о типе взаимодействия между аллелями входящих в сочетание генов – эпистатическом или аддитивном – мы попытались решить в ходе фармакогенетического исследования, в котором анализировали ассоциацию между эффективностью лечения больных РС иммуномодулирующим препаратом глатирамера ацетатом и аллельным полиморфизмом ряда генов иммунного ответа [29]. Носительство сочетаний аллелей четырех генов (*DRB1\*15+TGFB1\*-509T+CCR5\*d+IFNAR1\*16725G*) увеличивало в 14 раз риск неэффективного лечения препаратом ( $OR = 0.072$  [ $CI = 0.02-0.28$ ];  $p = 0.00018$ ), причем ассоциация выдерживала пермутационный тест ( $p_{perm} = 0.0056$ ), ко времени этого исследования включенный в программу. Трехаллельное сочетание (*DRB1\*15+CCR5\*d+TGFB1\*-509T*) как маркер неэффективности лечения мало отличалось от четырехаллельного, тогда как ассоциация всех остальных компонентов последнего с неэффективным лечением была существенно слабее. На *рис. 4* в графическом представлении (в виде диаграммы Венна) приведена оценка характера взаимодействия различных компонентов «неблагоприятного» аллельного сочетания (*DRB1\*15+TGFB1\*-509T+CCR5\*d+IFNAR1\*16725G*). В случае триаллельного сочетания (*DRB1\*15+CCR5\*d+TGFB1\*-509T*) ORR составляло 0.2, т.е. в 5 раз отличалось от 1 и не менялось при добавлении аллеля *IFNAR1\*16725G*. Мы рассматриваем эти данные как указание на эпистатическое взаимодействие аллелей генов *DRB1*, *CCR5* и *TGFB1*.



**Рис. 4.** Диаграмма Венна, характеризующая возможность взаимодействия компонентов сочетания *DRB1\*15 + TGFB1\*-509T + CCR5\*d32 + IFNAR1\*16725G*, негативная ассоциация которого с эффективностью лечения РС препаратом глатирамера ацетатом выявлена с помощью ПО APSampler [29]. Каждый из четырех эллипсов диаграммы соответствует одному из аллелей этого сочетания. Области пересечения эллипсов дают все возможные комбинации из четырех аллелей, при этом интенсивность цвета отражает отношение наблюдаемого OR к ожидаемому OR (ORR) в соответствии с градиентной шкалой, представленной ниже. Области, соответствующие отдельным аллелям, а также маленькие референтные кружки, соответствуют ORR, равному единице. Чем более цвет отличается от серого, соответствующего единице, тем интенсивнее эпистатическое взаимодействие, оцененное для этой области. Значения ожидаемого OR вычислены для каждого из сочетаний как произведение OR отдельных аллелей, соответствующих пересекающимся областям.

Неожиданные данные об эпистатических взаимодействиях при формировании генетической предрасположенности к ИИ у русских получены в работе [73]. Анализ с помощью алгоритма APSampler выявил биаллельные протективные сочетания (*IL6\*-174C/C + FGA\*4266A*) и (*IL6\*-174C/C + FGB\*-249C*), которые несколько более значимо, чем один входящий в каждый из них генотип *IL6\*-174C/C*, ассоциированы с ИИ и имеют практически такую же величину OR (0.32–0.35). Одновременно аллели, входящие в эти сочетания, *FGA\*4266A* или *FGB\*-249C*, при совместном носительстве с альтернативным генотипу *IL6\*-174C/C* аллелем G гена *IL6*, «нейтрализовали» его

значение как аллеля риска, снижая как уровни значимости, так и величины OR (с 2.9 до 1.9–2.1). Иными словами, мы наблюдали ассоциацию с ИИ сочетаний аллелей/генотипов *IL6*, *FGA* и *FGB*, в которых гену *IL6* принадлежит ведущая роль, а генам *FGA* и *FGB* – модулирующая. Это наблюдение, возможно, отражает присутствие в генах *FGA* и *FGB* элементов, чувствительных к интерлейкину-6, связывающих STAT3 – основной транскрипционный фактор, передающий сигнал от рецептора интерлейкина-6 к ядру [81].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ, ставящий своей целью поиск полигенных сочетаний, ассоциированных с фенотипическим признаком, т.е. составных генетических маркеров, является адекватным инструментом для исследования полигенных заболеваний. Сейчас статистические методы, предоставляющие возможности такого анализа, переживают период быстрого роста.

В соответствии со всем сказанным выше, составные генетические маркеры могут возникать вследствие эпистатического взаимодействия между компонентами или же иметь аддитивную природу. Принимая во внимание сложность и разнонаправленность различных кумулятивных эффектов, можно утверждать, что обнаружение достоверного составного маркера, пусть несущего даже небольшое число компонентов, является важным шагом в понимании этиопатогенеза заболевания. Действительно, такой маркер может указывать на важный узел в сложной регуляторной сети взаимодействия биологических макромолекул. ●

*Авторы выражают благодарность О.Г. Кулаковой и Е.Ю. Царёвой (РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва), а также И. Русинскому (I. Ruczinski, Johns Hopkins University, Baltimore, MD) за полезные замечания и советы.*

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 11-04-01644а и 11-04-02016а), научнотехнической программы Правительства г. Москвы (№ 8/3-280н-10), гранта Johns Hopkins University Framework for the Future, гранта Commonwealth Foundation and the SKCCC Center for Personalized Cancer Medicine, а также программы European Community's Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013] № 212877 (UEPHA\*MS).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bland J.M., Altman D.G. // *BMJ*. 2000. V. 320. № 7247. P. 1468.
2. Hattersley A.T., McCarthy M.I. // *Lancet*. 2005. V. 366. № 9493. P. 1315–1323.
3. Laird N.M., Lange C. // *Nat. Rev. Genet.* 2006. V. 7. № 5. P. 385–394.
4. Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W.J. // *Am. J. Hum. Gen.* 1993. V. 52. № 3. P. 506–516.
5. Thomson G. // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V. 57. № 2. P. 474–486.
6. Fisher R.A. // *J. Roy. Statistical Society*. 1922. V. 85. № 1. P. 87–94.
7. Sheskin D. *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004. 752 p.
8. Freeman G.H., Halton J.H. // *Biometrika*. 1951. V. 38. № 1–2. P. 141–149.
9. Mantel N. // *JASA*. 1963. V. 58. № 303. P. 690–700.
10. Kwon J.M., Goate A.M. // *Alcohol Res. Health*. 2000. V. 24. № 3. P. 164–168.
11. Cortina-Borja M., Smith A.D., Combarros O., Lehmann D.J. // *BMC Res. Notes*. 2009. V. 2. № 1. P. 105.
12. Cordell H.J. // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. № 6. P. 392–404.
13. Ahn J., Yu K., Stolzenberg-Solomon R., Simon K.C., McCullough M.L., Gallicchio L., Jacobs E.J., Ascherio A., Helzlsouer K., Jacobs K.B., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 13. P. 2739–2745.
14. Jakkula E., Leppä V., Sulonen A.-M., Varilo T., Kallio S., Kempainen A., Purcell S., Koivisto K., Tienari P., Sumelahti M.-L., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2010. V. 86. № 2. P. 285–291.
15. Kempainen A., Sawyer S., Compston A. // *Brief Funct Genomics*. 2011. V. 10. № 2. P. 61–70.
16. Wang J.H., Pappas D., Jager P.L.D., Pelletier D., de Bakker P.I., Kappos L., Polman C.H., Australian and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene), Chibnik L.B., Hafler D.A., et al. // *Genome Med.* 2011. V. 3. № 1. P. 3.
17. Hirschhorn J.N., Daly M.J. // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. № 2. P. 95–108.
18. Schork N.J., Murray S.S., Frazer K.A., Topol E.J. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2009. V. 19. № 3. P. 212–219.
19. Li B., Leal S.M. // *Am. J. Human Genet.* 2008. V. 83. № 3. P. 311–321.
20. Madsen B.E., Browning S.R. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 2. P. e1000384.
21. Neale B.M., Rivas M.A., Voight B.F., Altshuler D., Devlin B., Orho-Melander M., Kathiresan S., Purcell S.M., Roeder K., Daly M.J. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 3. P. e1001322.
22. Bland J.M., Altman D.G. // *BMJ*. 1995. V. 310. № 6973. P. 170.
23. Westfall P.H., Young S.S. *Resampling-based multiple testing: Examples and methods for p-value adjustment*. N. Y.: Wiley-Intersci, 1993. 316 p.
24. Benjamini Y., Hochberg Y. // *J. Roy. Statistical. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 1995. P. 289–300.
25. Storey J.D., Tibshirani R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 16. P. 9440–9445.
26. Cordell H.J. // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 20. P. 2463–2468.
27. Phillips P.C. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. № 11. P. 855–867.
28. Favorova O.O., Andreevski T.V., Boiko A.N., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kulakova O.G., Slanova A.V., Gusev E.I. // *Neurology*. 2002. V. 59. № 10. P. 1652.
29. Tsareva E.Y., Kulakova O.G., Boyko A.N., Shchur S.G., Lvovs D., Favorov A.V., Gusev E.I., Vandenbroeck K., Favorova O.O. // *Pharmacogenomics*. 2012. V. 13. № 1. P. 43–53.
30. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575.
31. <http://www.genabel.org/>
32. Aulchenko Y.S., Ripke S., Isaacs A., van Duijn C.M. // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. № 10. P. 1294–1296.
33. Nunkesser R., Bernholt T., Schwender H., Ickstadt K., Wegener I. // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. № 24. P. 3280–3288.
34. Moutsier-Reif A.A., Dudek S.M., Hahn L.W., Ritchie M.D. // *Genet. Epidemiol.* 2008. V. 32. № 4. P. 325–340.
35. Long Q., Zhang Q., Ott J. // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. № Suppl 1. P. S75.
36. Ritchie M.D., Hahn L.W., Roodi N., Bailey L.R., Dupont W.D., Parl F.F., Moore J.H. // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 69. № 1. P. 138–147.
37. <http://code.google.com/p/apsampler/>
38. Favorov A.V., Andreevski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M.F. // *Genetics*. 2005. V. 171. № 4. P. 2113–2121.
39. <http://sites.stat.psu.edu/~yuzhang/>
40. Zhang Y., Liu J.S. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. № 9. P. 1167–1173.
41. <http://cran.r-project.org/web/packages/LogicReg/index.html>
42. Ruczinski C.K.I., LeBlanc M.L., Hsu L. // *Genet. Epidemiol.* 2001. V. 21. № 1. P. S626–S631.
43. Kooperberg C., Ruczinski I. // *Genet. Epidemiol.* 2005. V. 28. № 2. P. 157–170.
44. Cleves M.A., Olson J.M., Jacobs K.B. // *Genet. Epidemiol.* 1997. V. 14. № 4. P. 337–347.
45. Becker T., Knapp M. // *Genet. Epidemiol.* 2004. V. 27. № 1. P. 21–32.
46. Sham P.C., Curtis D. // *Ann. Hum. Genet.* 1995. V. 59. Pt 3. P. 323–336.
47. Cordell H.J., Barratt B.J., Clayton D.G. // *Genet. Epidemiol.* 2004. V. 26. № 3. P. 167–185.
48. Herold C., Becker T. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. № 1. P. 134–136.
49. Gibbs R.A., Belmont J.W., Hardenbol P., Willis T.D., Yu F., Yang H., Ch'ang L.Y., Huang W., Liu B., Shen Y., et al. // *Nature*. 2003. V. 426. № 6968. P. 789–796.
50. <http://famhap.meb.uni-bonn.de/>
51. <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>
52. Julià A., Ballina J., Cañete J.D., Balsa A., Tornero-Molina J., Naranjo A., Alperi-López M., Erra A., Pascual-Salcedo D., Barceló P., et al. // *Arthritis Rheum.* 2008. V. 58. № 8. P. 2275–2286.
53. Shen L., Kim S., Risacher S.L., Nho K., Swaminathan S., West J.D., Foroud T., Pankratz N., Moore J.H., Sloan C.D., et al. // *Neuroimage*. 2010. V. 53. № 3. P. 1051–1063.
54. Turton J.C., Bullock J., Medway C., Shi H., Brown K., Belbin O., Kalsheker N., Carrasquillo M.M., Dickson D.W., Graff-Radford N.R., et al. // *J. Alzheimers Dis.* 2011. V. 25. № 4. P. 635–644.
55. Orton S.M., Ramagopalan S.V., Para A.E., Lincoln M.R., Handunnetthi L., Chao M.J., Morahan J., Morrison K.M., Sadovnick A.D., Ebers G.C. // *J. Neurol. Sci.* 2011. V. 305. № 1–2. P. 116–120.
56. Schüpbach T., Xenarios I., Bergmann S., Kapur K. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 11. P. 1468–1469.
57. Hosmer D.W., Lemeshow S. *Applied logistic regression*. N. Y.: John Wiley & Sons, 2000. 373 p.
58. Mukherjee B., Ahn J., Gruber S.B., Rennert G., Moreno V., Chatterjee N. // *Genet. Epidemiol.* 2008. V. 32. № 7. P. 615–626.

59. <http://www.multifactorialdimensionalityreduction.org/>
60. Ritchie M.D., Moutsinger A.A. // *Pharmacogenomics*. 2005. V. 6. № 8. P. 823–834.
61. Brassat D., Moutsinger A.A., Caillier S.J., Erlich H.A., Walker K., Steiner L.L., Cree B.A.C., Barcellos L.F., Pericak-Vance M.A., Schmidt S., et al. // *Genes Immun*. 2006. V. 7. № 4. P. 310–315.
62. Greene C.S., Sinnott-Armstrong N.A., Himmelstein D.S., Park P.J., Moore J.H., Harris B.T. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 5. P. 694–695.
63. Ma J., Amos C.I., Warwick Daw E. // *Genet. Epidemiol.* 2007. V. 31. № 6. P. 594–604.
64. Albrechtsen A., Castella S., Andersen G., Hansen T., Pedersen O., Nielsen R. // *Genetics*. 2007. V. 176. № 2. P. 1197–1208.
65. Schwender H., Ruczinski I. // *Adv. Genet.* 2010. V. 72. P. 25–45.
66. Zhang Y., Jiang B., Zhu J., Liu J.S. // *Ann. Hum. Genet.* 2011. V. 75. № 1. P. 183–193.
67. O'Doherty C., Favorov A., Heggarty S., Graham C., Favorova O., Ochs M., Hawkins S., Hutchinson M., O'Rourke K., Vandenbroeck K. // *Pharmacogenomics*. 2009. V. 10. № 7. P. 1177–1186.
68. Favorova O.O., Favorov A.V., Boiko A.N., Andreewski T.V., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kulakova O.G., Gusev E.I., Parmigiani G., Ochs M.F. // *BMC Med. Genet.* 2006. V. 7. P. 63–72.
69. Чихладзе Н.М., Самедова Х.Ф., Судомоина М.А., Thant M., Htut Z.M., Литонова Г.Н., Фаворов А.В., Чазова И.Е., Фаворова О.О. // *Кардиология*. 2008. Т. 48. № 1. С. 37–42.
70. Судомоина М.А., Николаева Т.Я., Парфенов М.Г., Алексеев А.Д., Фаворов А.В., Гехт А.Б., Гусев Е.И., Фаворова О.О. // *Кардиологический вестник*. 2007. Т. 2. № 1. С. 22–25.
71. Парфенов М.Г., Чугунова С.А., Николаева Т.Я., Кобылина О.В., Судомоина М.А., Колядина Ю.А., Гехт А.Б., Гусев Е.И., Фаворова О.О. // *Молекуляр. медицина*. 2008. № 2. С. 55–59.
72. Судомоина М.А., Сухинина Т.С., Барсова Р.М., Фаворов А.В., Шахнович Р.М., Титов Б.В., Матвеева Н.А., Рыбалкин И.Н., Власик Т.Н., Руда М.Я. и др. // *Молекуляр. биология*. 2010. Т. 44. № 3. С. 463–471.
73. Титов Б.В., Барсова Р.М., Мартынов М.Ю., Никонова А.А., Фаворов А.В., Гусев Е.И., Фаворова О.О. // *Молекуляр. биология*. 2012. Т. 46. № 1. С. 93–102.
74. Парфенов М.Г., Титов Б.В., Судомоина М.А., Мартынов М.Ю., Фаворов А.В., Ochs M.F., Гусев Е.И., Фаворова О.О. // *Молекуляр. биология*. 2009. V. 43. № 5. P. 937–945.
75. Чугунова С.А., Судомоина М.А., Николаева Т.Я., Парфенов М.Г., Макарычева О.Ю., Гехт А.Б., Фаворова О.О. // *Якутский мед. журн.* 2009. Т. 2. № 26. С. 105–107.
76. Федорова С.А., Бермишева М.А., Виллемс Р., Максимова Н.Р., Кононова С.К., Степанова С.К., Куличкин С.С., Хуснутдинова Э.К. // *Якутский мед. журн.* 2003. № 1. С. 16–21.
77. Царёва Е.Ю., Кулакова О.Г., Макарычева О.Ю., Бойко А.Н., Щур С.Г., Лащ Н.Ю., Попова Н.Ф., Гусев Е.И., Башинская В.В., Львов Д.В., и др. // *Молекуляр. биология*. 2011. Т. 45. № 6. С. 963–972.
78. Судомоина М.А., Бойко А.Н., Демина Т.Л., Гусев Е.И., Болдырева М.Н., Трофимов Д.Ю., Алексеев А.Л., Фаворова О.О. // *Молекуляр. биология*. 1998. Т. 32. № 2. С. 291–296.
79. Boiko A.N., Gusev E.I., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kulakova O.G., Bikova O.V., Maslova O.I., Guseva M.R., Boiko S.Y., Guseva M.E., et al. // *Neurology*. 2002. V. 58. № 4. P. 658.
80. Gusev E., Sudomoina M., Boiko A., Deomina T., Favorova O. *Frontiers in multiple sclerosis*. // Eds Abramsky O., Ovardia H. London: Martin Dunitz Publishers, 1997. P. 35–41.
81. Fuller G.M., Zhang Z. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 936. № 1. P. 469–479.
82. O'Brien E., Asmar R., Beilin L., Imai Y., Mallion J.M., Mancina G., Mengden T., Myers M., Padfield P., Palatini P., et al. // *J. Hypertens.* 2003. V. 21. № 5. P. 821–848.
83. Goecks J., Nekrutenko A., Taylor J., Team T.G. // *Genome Biol.* 2010. V. 11. № 8. P. R86.
84. Ihaka R., Gentleman R. // *J. Comput. Graph. Statist.* 1996. P. 299–314.
85. Moore J.H. <http://compgen.blogspot.com/2005/05/mdr-data-tool.html>
86. Bush W.S., Dudek S.M., Ritchie M.D. // *Bioinformatics*. 2006. V. 22. № 17. P. 2173–2174.
87. Peng T., Du P., Li Y. // *Bioinformation*. 2009. V. 3. № 8. P. 349–351.

УДК 615.355:577.52.429.07

# Кардиологические биофармацевтики в концепции направленного транспорта лекарств: практические результаты и исследовательские перспективы

А. В. Максименко

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития Российской Федерации, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

E-mail: alexmak@cardio.ru

Поступила в редакцию 30.11.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Рассмотрены результаты клинического применения тромболитических и антитромботических препаратов, разработанных на основе белковых конъюгатов в рамках концепции направленного транспорта лекарств. Отмечено сокращение научно-медицинских разработок таких производных из-за значительного истощения финансово-организационных ресурсов, появления новых препаратов и средств интервенционного вмешательства. Выявлены факторы, способствующие заметному повышению эффективности действия биоконъюгатов, в том числе биомедицинское тестирование белковых доменов и их сочетаний, оптимизация размеров биоконъюгатов, плотность локализации мишеней, использование в качестве мишеней молекул клеточной адгезии, а также применение сопряженных друг с другом ферментов. Заметный интерес вызывают антиоксидантные биокатализаторы, а также возможность дальнейшего совершенствования направленного транспорта лекарств посредством пре- и посткондиционирования миокарда и выявления и формирования мишеней для эффективного лекарственного воздействия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** направленный транспорт лекарств, белковые конъюгаты, тромболитики, антитромботические средства, плотность молекулярных мишеней, ферментативно сопряженные антиоксиданты, молекулы клеточной адгезии, пре- и посткондиционирование миокарда.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** СОД – супероксиддисмутаза; ВК-СОД – внеклеточная СОД; КАТ – каталаза; СМП – скорая медицинская помощь; ХС – хондроитинсульфат; СОД-ХС-КАТ – ковалентный биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза; ЭКГ – электрокардиограмма.

## ВВЕДЕНИЕ

Ранее считалось, что лекарственные средства в очаг патологического поражения можно доставить при помощи «магических пуль» Пауля Эрлиха [1]. Это представление легло в основу концепции направленного транспорта лекарств в организме [2], один из объектов которой – белковые конъюгаты, полученные методами химического и биологического синтеза [3, 4]. Значимой областью направленного внеклеточного применения таких конъюгатов стал тромболитический [5]. Прошедшие с той поры десятилетия позволили оценить результаты использования таких агентов (биофармацевтиков) в тромболитической и сопутствующей ей (смежной) терапии, а также выявить направления дальнейших биофармакологических разработок. Этому посвящен настоящий аналитический обзор, составленный с использованием баз данных PubMed, SCOPUS, Index Medicus/MEDLINE

и других, а также научно-медицинского библиотечного фонда Кардиологического научного центра (Москва).

## НОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Высокая распространенность сердечно-сосудистых заболеваний хорошо известна. В России показатель смертности от этих заболеваний превышает половину от общего показателя [6]. Тяжелые и массовые проявления сердечно-сосудистых нарушений могут развиваться как постепенно, так и довольно внезапно. Появление загрудинных болей (ишемический дискомфорт) позволяет подозревать прогрессирование острого коронарного синдрома (рис. 1) [7]. Регистрация электрокардиограммы (ЭКГ) способствует выявлению пристеночного или окклюзирующего (полностью перекрывающего люминальный просвет сосуда) тромба по уровню ST-сегмента на ЭКГ. Определение

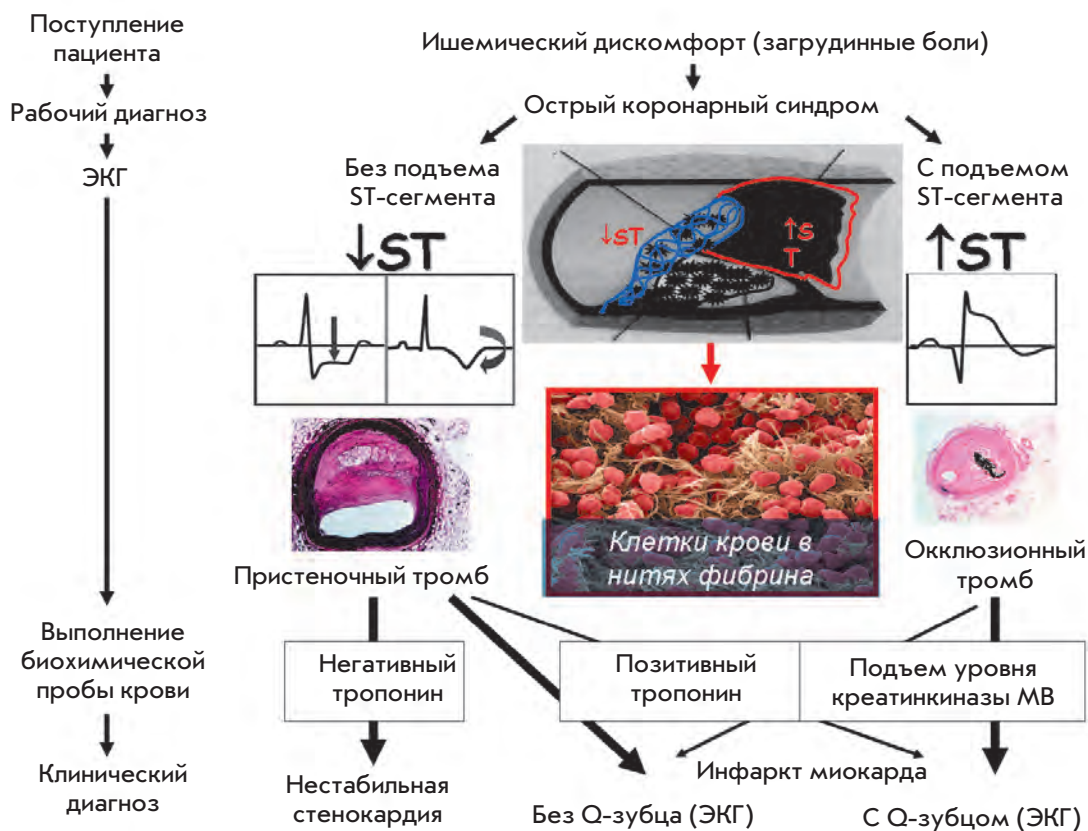


Рис. 1. Последовательность (алгоритм) постановки клинического диагноза пациенту с острым сердечно-сосудистым поражением.

содержания в крови креатинкиназы (изоформы МВ) и/или тропонина (Т или I) уточняет постановку клинического диагноза (рис. 1) [7, 8]. Лечение больных острым инфарктом миокарда требует скорейшего проведения тромболитической терапии.

В качестве тромболитических агентов в России используются стрептокиназа (1,5 млн МЕ для внутривенной инфузии в течение 30–60 мин), альтеплаза (рекомбинантный тканевый активатор плазминогена, 15 мг препарата вводят внутривенным болюсом (инъекцией) с последующей инфузией в дозе 0,75 мг/кг в течение 30 мин и еще одной инфузией 0,5 мг/кг в течение 60 мин, суммарно менее 100 мг препарата), тенектеплаза (мутантная форма (мутеин) тканевого активатора плазминогена; 30–50 мг препарата вводят внутривенно в зависимости от массы пациента – 60 и более 90 кг), пулолаза (проурокиназа, 2 млн МЕ препарата вводят внутривенно с последующей инфузией 4 млн МЕ в течение 30–60 мин). В России стандарт медицинской помощи предписывает применять при остром инфаркте миокарда (приказ Министерства здравоохранения и социального развития от 2 августа 2006 г. № 582) альтеплазу (коммерческое название актилизе), стрептокиназу и проурокиназу (пулолазу), т.е. тромболитики с болюс-инфузионной

схемой введения. Использование таких болюсных агентов, как продвигающаяся на российский лекарственный рынок тенектеплаза (коммерческое название метализе), носит пока эпизодический характер.

Следует заметить, что если стрептокиназа (SK), белковый продукт β-гемолитических стрептококков, относится к первому поколению активаторов плазминогена (как и урокиназа, UK), то тканевый активатор плазминогена (t-PA) и проурокиназа (u-PA, pro-UK) принадлежат ко второму поколению [9]. Производство активаторов плазминогена в виде негликозилированных производных (актилизе, пулолаза) стало возможным благодаря использованию методов генной инженерии (рис. 2). Из активаторов плазминогена третьего поколения пока клинически используются лишь тенектеплаза (TNK-tPA, метализе) и ретеплаза (r-PA, ретаваза). Их продвижение к терапевтическому применению подчеркивает особенности современной биофармакологии и биотехнологии – значительную продолжительность разработки и высокую стоимость выпускаемого продукта (цена эффективной дозы препарата составляет 2000–3000 долларов США). Некоторые новые формы активаторов плазминогена (анизотирированный плазминоген-стрептокиназный активаторный комплекс – APSAC,



**Рис. 2.** Хронология появления в клинической практике агентов (активаторы плазминогена разных поколений) и ангиопластических средств (баллонный катетер, стенты) реперфузионной терапии.

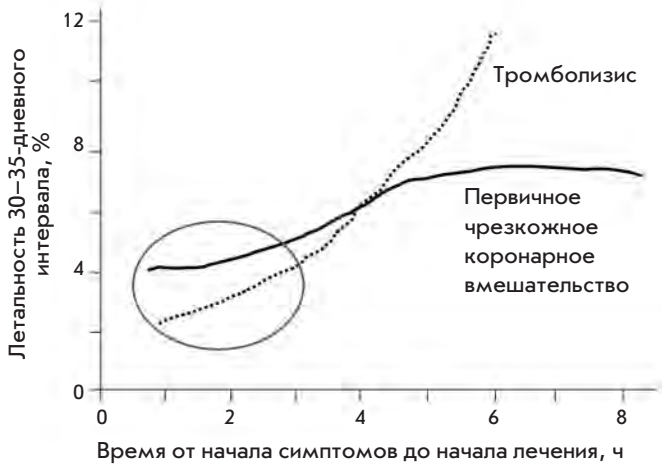
ланотеплаза – n-PA (мутантный t-PA, мутеин t-PA)) не получили по ряду терапевтических показателей дальнейшего распространения, использование других (r-PA, TNK-tPA, пулолаза) постепенно увеличивается.

Ретаваза (r-PA), рекомендуемая для последовательного двойного болюсного введения при остром инфаркте миокарда, представляет собой негликозилированный t-PA, из молекулы которого удалены несколько доменов – пальцеобразный, гомологичный эпидермальному фактору роста, а также крингл-домен 1 [10]. Благодаря такой модификации r-PA действует быстро, долго пребывает в кровотоке, вызывает меньшее истощение уровня гемостатических белков крови (системное действие), чем родительская форма t-PA. Сходными преимуществами обладает и тенектеплаза (она слабее подавляет активность ингибитора активатора плазминогена первого типа и отличается сниженным участием в фибринолизе). Комбинация мутаций в молекуле t-PA (замены T103N, N117Q, KHRR(296–299)AAAA) обусловила появление перечисленных свойств и позволила получить препарат, эффективный после однократного болюсного внутривенного введения при остром инфаркте миокарда [11, 12]. Нацеливание производных r-PA и TNK-tPA на тромб (реализация концепции направленного транспорта лекарств) удалось осуществить не в результате использования внешнего вектора (например, моноклональных антител/их фрагментов к фибрину), а благодаря отбору мутантных форм t-PA и выделению его доменов. Нормальная молекула t-PA состоит из нескольких структурных доменов [9]: фибронектинового пальцеобразного, отвечающего за высокоаффинное связывание с фибрином; гомологичного эпидермальному фактору роста, обеспечивающему рецепторное связывание

с клетками печени и ускоренный клиренс; а также двух крингл-доменов – существенного для связывания с рецепторами эндотелиальных клеток домена 1 и ответственного за низкоаффинное связывание с фибрином домена 2. В состав t-PA входит также протеиназный домен, обладающий протеиназной активностью, специфичной к плазминогену. Протеиназный домен содержит участок связывания ингибитора активатора плазминогена первого типа. Молекулярная масса такого одноцепочечного гликопротеина составляет ~ 64 кДа. Полученные на его основе генно-инженерными методами тенектеплаза (метализе) и ретаваза (ретаваза) способствуют дальнейшему развитию тромболитической терапии (рис. 2). Так, по усовершенствованной двухэтапной схеме (с использованием кардиотелеметрии ЭКГ) общепрофильными бригадами скорой медицинской помощи (СМП), укомплектованными врачебными или фельдшерскими кадрами, проведен догоспитальный болюсный тромболитический тенектеплазой [13]. Эффективность тромболитической терапии в существенной мере определялась временным интервалом «симптом–игла», средняя величина которого составляла 1 ч 58 мин, а время «дверь–игла» (от появления СМП до начала инъекции) – 16 мин. Такое заметное сокращение времени до начала терапии способствовало эффективному лечению 51.5% пациентов (один из критериев – снижение ST-сегмента на ЭКГ более чем на 50% в отведении, где его подъем был максимальным). У 18.2% больных наблюдался «прерванный инфаркт миокарда» (когда снижение ST-сегмента достигало изолинии ЭКГ). В присутствии бригады СМП летальность составила 1.5%, в течение суток – 3.0%, в течение 30 дней – 1.5%. Таким образом, при проведении тромболитической терапии общепрофильными бригадами СМП показатели летальности не только не увеличивались, но и обеспечивали значительное сокращение времени до начала лечения, что может существенно улучшать прогноз при остром инфаркте миокарда с подъемом ST-сегмента на ЭКГ [13]. Учитывая необходимость урегулирования вопроса стоимости препарата тенектеплазы, приборного оснащения бригад СМП, организации базовых центров кардиотелеметрии и подготовки и обучения медперсонала, такой подход к обеспечению максимально раннего тромболитического лечения может оказаться весьма действенным для достоверного улучшения борьбы с острыми сердечно-сосудистыми поражениями.

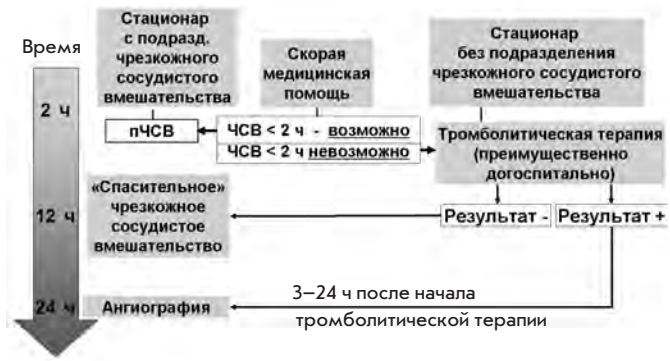
### ФОРМИРОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ РЕПЕРFUЗИОННОЙ ТЕРАПИИ

Появление тромболитической терапии революционизировало лечение острого инфаркта миокарда. Если госпитальная летальность от инфаркта миокарда



**Рис. 3.** Зависимость показателя летальности (в течение 30–35-дневного интервала) от времени начала реперфузионной терапии тромболитическими и интервенционными методами. Очерчена область преимущественного применения тромболитической терапии.

еще в середине прошлого века составляла 30–40%, то с введением в клинический обиход палат интенсивного наблюдения (терапии) она снизилась вдвое (14–17%) [14]. Развитие тромболитической терапии позволило существенно снизить показатель смертности, выведя его на уровень 6–8%. Необходимость дальнейшего снижения летальности от инфаркта миокарда обусловила формирование и совершенствование реперфузионной терапии, опирающейся на тромболитические препараты, методы и средства транслюминальной (баллонной) ангиопластики и стентирования (рис. 2). Эффективность интервенционных методов восстановления кровотока механическим воздействием оказалась весьма высокой, но имела и свои ограничения (рис. 3). Согласно Рекомендациям Европейского общества кардиологов при острых сердечно-сосудистых поражениях следует добиваться оказания скорейшей медицинской помощи. Это подразумевает быстрое прохождение «пяти дверей»: дома (1), консультации/осмотра врача общей практики (2), диспетчера скорой помощи (3), оказания первой помощи и транспортировки службой СМП (4), поступления в клинику, стационар, госпиталь, сосудистый центр (5) для квалифицированного лечения. Из-за позднего обращения и затрудненного уличного движения задерживается начало терапии, определяя разные временные интервалы (от проявления симптомов поражения до начала терапии) для выбора тактики лечения (рис. 3) [15]. При этом тромболитическую терапию можно



**Рис. 4.** Реперфузионная стратегия при доставке пациента с острым инфарктом миокарда с подъемом ST-сегмента на ЭКГ в зависимости от времени, прошедшего с начала развития симптомов поражения.

осуществлять еще на догоспитальном этапе бригадой СМП [13], а в перспективе – и дома, даже посредством самопомощи. Однако, несмотря на медленное решение организационных проблем и современные финансово-медицинские реалии России, тромболитическая и ангиопластика представляются не взаимоисключающими, а взаимодополняющими способами (рис. 4) [16]. Такой подход определяется наличием и близостью к пациенту клиник, оснащенных средствами сосудистой ангиопластики и стентирования, действиями бригад СМП, своевременным проведением тромболитической терапии (особенно при отсутствии возможности чрескожного коронарного вмешательства). В ряде случаев (рис. 4) используется комбинация тромболитической терапии и ангиопластики. При современном уровне российского здравоохранения последний подход выглядит вполне перспективным. В целом, проблемы просвещения пациентов, совершенствования организации кардиологической помощи («пять дверей») и ее средств (разработка новых стентов и тромболитиков) остаются актуальными. Однако разнообразие приемов реперфузионной терапии и ее высокая стоимость снизили инвестиционную привлекательность этой области, что подтверждается результатами современных биомедицинских исследований тромболитических производных.

### СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРОМБОЛИТИКОВ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

Широкое (еще 15–20 лет назад) изучение новых тромболитиков [5, 9] к настоящему времени существенно сузилось. Не развивается конструирование биоконъюгатов направленного действия на основе векторной (определяющей распознавание и связывание с мишенью) и лекарственной (обеспечивающей терапев-



тический эффект) частей, связанных с биodeградируемой матрицей носителя (рис. 5). Не используются антитела (или их фрагменты) против фибрина; фибриноген (как вектор и носитель) или его компоненты; комплементарное комбинированное воздействие на тромб сочетания разных форм t-PA и u-PA. В качестве детерминант тромботического поражения стали применять маркеры повреждения эндотелиальной поверхности сосудов [4]. Конечно, они должны иметь низкое содержание в крови и на других типах клеток, доступных кровотоку; экспрессироваться на эндотелии с плотностью, достаточной для связывания, необходимого для достижения терапевтических целей и не вызывающего вредных побочных эффектов. Так, для применения при легочной эмболии получили биоконъюгат урокиназы с моноклональными антителами (RE8F5) против поверхностного мембранного белка эндотелия капилляров легких, связанных с помощью 4-сукцинимидилоксикарбонил- $\alpha$ -метил- $\alpha$ -(2-пиридилдитио)-толуола (SMPT) с сохранением 85% начальной урокиназной активности [17]. На модели легочной эмболии такой конъюгат в 12–16 раз усиливал тромболизис в сравнении с урокиназой и ретавазой без системной активации плазминогена и истощения уровня фибриногена. При этом ковалентное связывание компонентов конъюгата при помощи дисульфидной связи (при ее достаточно поверхностном расположении) оставляет сомнения в стабильности конъюгата и устойчивой перспективе его практической разработки. Весьма интересным оказался подход к профилактике цереброваскулярных тромбозов [18]. Ассоциация биотинилированного t-PA с биотинилированными эритроцитами через стрептавидин приводила к быстрой и продолжительной реперфузии у мышей с церебральным тромбозом, в отличие от действия самого t-PA, введенного даже в десятикратно больших дозах [19]. Полученный аддукт обладал увеличенным временем полужизни в кровотоке, способностью лизировать свежие тромбы (но не старые гемостатические пробки), слабее отвечал на действие ингибитора активатора плазминогена первого типа [20]. Эритроциты показали себя как эффективные носители t-PA для тромбопрофилактики, но необходимо было их модифицировать *ex vivo* для связывания с t-PA перед введением в организм. Избежать такой сложной модификации можно, в частности, при помощи антител к мембранным белкам эритроцитов. Так, гликофорин А обильно представлен на поверхности эритроцитов. Использование одноцепочечного антитела (scFv) против гликофорина А в составе рекомбинантной белковой формы с низкомолекулярной одноцепочечной урокиназой, селективно активируемой тромбином (scu-PA-T) [21], или с мутеином t-PA (крингл-домен 2 и протеазный



Рис. 5. Схематическое представление модели биоконъюгата для направленного транспорта лекарств в организме. С биodeградируемой матрицей полимерного носителя ковалентно связаны векторная и лекарственная части биоконъюгата.

домен) [22] обеспечивает их связывание с эритроцитами (40–95%) и значительно увеличивает время циркуляции в кровотоке (через 48 ч в нем остается ~35% от введенной дозы). По результатам этих работ профилактическую доставку разных форм активаторов плазминогена к эритроцитам можно рассматривать как новый подход к предупреждению тромбозов в клинических условиях, когда риск окклюзии сосудов высок.

Получен рекомбинантный одноцепочечный урокиназный активатор плазминогена низкой молекулярной массы (lmw-scuc-PA), слитый с одноцепочечным переменным фрагментом антител (scFv) к молекуле тромбоцитарно-эндотелиальной адгезии (PESAM-1) [23]. На примере этого слитого белка было показано, что молекулы клеточной адгезии, расположенные на эндотелии, могут служить мишенями для доставки лекарственных средств. Рекомбинантная форма пролекарства lmw-scuc-PA-scFv специфически связывалась с клетками, экспрессирующими PESAM-1 [23] и после расщепления плазмином (по центрам тромбообразования) связи Lys158–Ile159 в урокиназном фрагменте (lmw-scuc-PA) превращалась в фибринолитически активную форму lmw-tcu-PA. После внутривенного введения полученный препарат накапливался в легких мышей дикого типа (но не мышей с нокаутом PESAM-1), эффективнее, чем lmw-scuc-PA, лизировал легочные эмболы, быстро выводился из кровотока. Это указывает на перспективность использования слитых белков на основе молекул клеточной адгезии и проактиваторов плазминогена для тромбопрофилактики [4, 23].

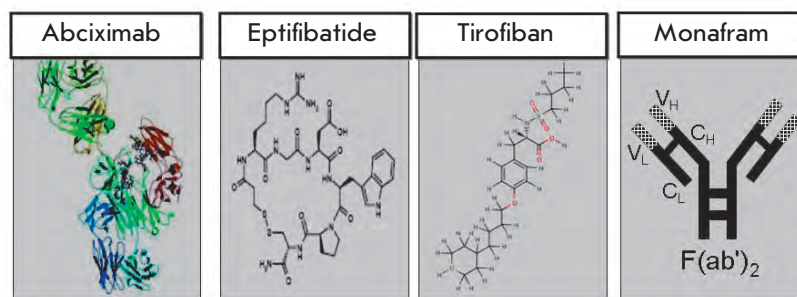


Рис. 6. Представление вида и основных свойств блокаторов рецепторов гликопротеина IIb/IIIa.

	Абсиксимаб (РеоПро) Eli Lilly	Эптифибатид (интегрилин) Cor Therapeutics Shering Plough	Тирофибан (агростат) Merck	Монафрам (руциромаб) РКНПК МЗ РФ
Тип	Антитело	Пептид	Не пептид	Антитело
Молекулярная масса, Да	~50 000	~800	~500	~100 000
Связывание с тромбоцитами	ч	с	с	ч
$t_{1/2}$ в плазме	мин	2.5 ч	3 ч	< 3 ч
Длительность восст. функ. тромбоцитов на 50%	12 ч	2–4 ч	~4 ч	> 24 ч
Связь с другими интегринами	$\alpha 5\beta 3$ Mac-1	–	–	–

Последовательным изучением биоконъюгатов, обладающих направленным фибринолитическим действием, занимается группа В.Р. Музыкантова [4, 19–23] из Филадельфии (США). Другие научные коллективы либо сменили направления исследований, либо их данные эпизодичны [17, 18]. Открытыми остаются вопросы иммуногенности рекомбинантных форм, их применимость при острых поражениях, развитие побочных реакций. Появление в арсенале врача тенектеплазы (метализе) и ретеплазы (ретаваза) оставляет надежду на успешность проводимых разработок.

### КЛИНИЧЕСКАЯ ПРАКТИКА НАЦЕЛЕННЫХ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Стабилизации эффектов реперфузионной терапии служат весьма разнообразные антитромботические средства. Они включают стандартное антитромбинное воздействие (гепарин, гепарин низкой молекулярной массы (эноксипарин)), прямые ингибиторы тромбина (бивалирудин, дабигатран), ингибиторы фактора Ха – прямые (апиксабан, ривароксабан, отамиксабан) и непрямые (фондапаринукс) [24], ингибиторы активируемого протеазами рецептора 1 (PAR-1), блокаторы продукции тромбоксана  $A_2$ , ТХА<sub>2</sub> (ацетилсалициловая кислота и др.), антагонисты рецептора P2Y<sub>12</sub> (клопидогрель, прасугрель, тикагрелор, кангрелор и др.) [25]. С позиций концепции

направленного транспорта лекарств (в отношении белковых производных) актуальным является применение антагонистов гликопротеина IIb/IIIa [26] для ингибирования агрегации тромбоцитов при ангиопластике у больных с острым коронарным синдромом [27]. Клинически доступные препараты представлены на рис. 6. Следует заметить, что тирофибан и эптифибатид, продвигающиеся к утверждению на фармацевтическом рынке, заметно дешевле абсиксимаба и монафрама (в России непатентованное название – руциромаб). Пептидомиметик тирофибан представляет собой низкомолекулярное соединение непептидной природы, а эптифибатид – небольшой пептид. Абсиксимаб же состоит из Fab-фрагмента рекомбинантного химерного антитела из переменных участков мышинового моноклонального антитела 7E3 против гликопротеина IIb/IIIa и константных участков иммуноглобулина G человека, а монафрам – это F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент моноклональных антител против гликопротеина IIb/IIIa. Конкуренция за расширенное использование названных препаратов в клинической практике продолжается в настоящее время. Следует заметить, что «антительная» природа абсиксимаба и монафрама обеспечивает их эффективное распознавание гликопротеинами IIb/IIIa и связывание с тромбоцитами, что ингибирует их агрегацию.

Среди эффективных антитромботических препаратов интерес для клинической практики,

как и в случае активаторов плазминогена третьего поколения, представляют не полноразмерные белковые молекулы, а их фрагменты [28]. По ряду фармакологических свойств соединения с молекулярной массой менее 400 Да оказываются более предпочтительными, чем их более крупные («тучные») виды. Более того, стремясь повысить эффективность производного и специфичность его взаимодействия с клеточными рецепторами или легкость прохождения через мембрану, обычно увеличивают липофильность изучаемого соединения. Однако из-за этого снижается растворимость соединения, оно становится метаболически стабильным, резко проявляются его серьезные побочные эффекты и сильно повышается токсичность (как следует из результатов сравнения токсичности соединений, исследованных в 1991 и 2000 гг.). По этой причине прекращается изучение множества потенциальных лекарств [28].

Традиционно в структуре белка выделяют четыре уровня организации – первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуру. Однако существуют и другие градации [29], согласно которым в молекуле белка можно выделить первичную (последовательность аминокислот), вторичную (альфа-спираль, бета-структура и др.), сверхвторичную (ансамбли взаимодействующих между собой вторичных структур, например, суперспирализация альфа-спиралей – скручивание двух альфа-спиралей вокруг друг друга) структуры, структурные домены (определяемые, в частности, по анализу карт электронной плотности и соответствующие глобуле диаметром 2.5 нм, отвечающей принципу простоты сворачивания белковой цепи), а также глобулярные белки, агрегаты. В настоящее время приоритет в области разработки кардиологических биофармацевтиков отдается белковым доменам и их разным сочетаниям, что, конечно же, не отменяет необходимости досконального исследования их иммуногенности и токсичности.

### **РАЗРАБОТКА ПРОИЗВОДНЫХ ДЛЯ СМЕЖНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ**

Другие подходы, направленные на закрепление и усиление эффектов реперфузионной терапии, в большей степени связаны не с клиническими, а с исследовательскими работами. С целью блокирования и уменьшения вредных последствий окислительного стресса, когда избыточно образующиеся активные формы кислорода неселективно поражают молекулы, ткани и органы, разрабатываются антиоксиданты, обладающие тропностью к очагу поражения [30]. Это – формирующаяся область антиоксидантной терапии, поскольку окислительный стресс сопровождает развитие сердечно-сосудистых нарушений. Имеется множество антиоксидантов (например, ви-

таминной или фенольной природы), обладающих разным клиническим эффектом. Вместе с тем высокой эффективностью и специфичностью антиоксидантного действия отличаются оксидоредуктазы. К ферментам, обладающим антиоксидантной активностью, относятся имеющиеся в организме человека супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), глутатионпероксидаза. СОД представлена тремя изоформами: цитозольной Cu,Zn-СОД (СОД-1), митохондриальной Mn-СОД (СОД-2) и внеклеточной СОД (СОД-3, ВК-СОД).

### **ВНЕКЛЕТОЧНАЯ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА**

Повышенное содержание одного из видов активных форм кислорода – супероксидного радикала ( $O_2^-$ ) – отмечалось в артериях крыс со спонтанной гипертензией. Перенос гена ВК-СОД таким крысам улучшал функцию их эндотелия и снижал артериальное давление [31]. Предполагается, что взаимодействие  $O_2^-$  с NO первоначально происходит во внеклеточном пространстве [32]. Среди всех антиоксидантных ферментов только ВК-СОД локализуется на сосудистой люминальной поверхности, где она взаимодействует с гепарансульфатпротеогликаном своим гепарансвязывающим доменом [30, 32]. Вероятно, ВК-СОД может располагаться по всей глубине сосудистой стенки, в том числе между эндотелием и сосудистой мышцей [33]. Введение гепарина (в концентрациях, применяемых в терапии) приводит к высвобождению ВК-СОД, связанной с эндотелиальными и другими клетками, в кровотока [32, 34]. Антиоксидантное действие ВК-СОД проявляется, главным образом, на сосудистой стенке, а не в объеме кровотока [30, 32]. Обнаружено, что заболевания коронарных сосудов человека связаны со сниженным уровнем высвобождаемой гепарином ВК-СОД [35, 36]. Отмечалась положительная корреляция между уровнем высвобождаемой гепарином ВК-СОД и содержанием холестерина липопротеидов высокой плотности и возрастом [36]. Протективный эффект ВК-СОД связывают с защитой сосудистого дилататора NO, который диффундирует от эндотелия к гуанилатциклазе гладкомышечных клеток [30, 32, 37], что подтверждается данными, полученными на модели объем-зависимой (высокообъемной) гипертензии у мышей (1-почка-1-зажим) [38]. При этом у мышей дикого типа и с нокаутом гена ВК-СОД наблюдается ухудшение зависимой от эндотелия дилатации, повышение артериального давления и сосудистый окислительный стресс. Рекомбинантная ВК-СОД снижала артериальное давление и улучшала биодоступность NO в аорте мышей дикого типа и у мышей с нокаутом ВК-СОД, но не снижала артериальное давление у мышей с нокаутом эндотелиальной NO-синтазы и у мышей дикого типа,

получавших ингибитор NO-синтазы. Эти результаты наглядно показали, что направленные сосудистые эффекты рекомбинантной ВК-СОД опосредуются NO [38] и указывают, наряду с другими данными [39–41], на важную роль этого биокатализатора при гипертонии. Помимо атеросклероза [30, 32] и гипертонии окислительный стресс и ферментные антиоксиданты играют важную роль в развитии сахарного диабета и сердечной недостаточности [32]. Широкое протективное действие ферментных антиоксидантов подчеркивает актуальность их использования для разработки новых средств смежной терапии.

### МОДИФИКАЦИЯ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

Низкая аффинность СОД-1 к мембранам клеток, где образуются активные формы кислорода, ее невысокая стабильность в плазме крови и небольшой срок пребывания в кровотоке указывали на необходимость получения лецитинизированной СОД, в которой четыре молекулы фосфатидилхолина были ковалентно присоединены к димерному ферменту [42]. Благодаря модификации лецитином такая СОД обладала повышенной тропностью к клеточной мембране, она ослабляла поражение мышцей с язвенным колитом уже после ежедневного внутривенного введения в течение 7 дней, тогда как для достижения такого же эффекта нативный фермент нужно было вводить в 30 раз больших дозах [42]. Существенно лучший эффект применения лецитинизированной СОД наблюдали и при индуцированном блеомицином фиброзе легких у мышцей [43]. Подобное нацеливание белковых агентов на очаг поражения в результате их модификации в заметной мере определяется размером полученных конъюгатов [44]. Так, оптимальной тропностью к легочному эндотелию (определяемой эффективностью и специфичностью нацеливания) обладали конъюгаты СОД с антителами против РЕСАМ-1 размером 300 нм. Предполагается, что подобная доставка конъюгата СОД с моноклональными антителами против РЕСАМ-1 в эндосомы эндотелия может иметь выраженный противовоспалительный эффект [45].

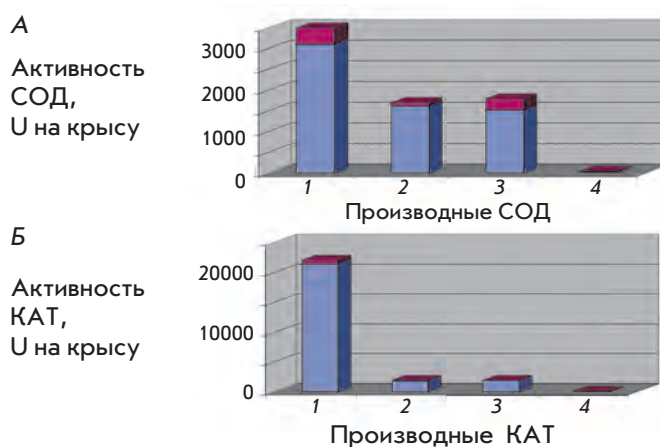
### СОПРЯЖЕНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНОЙ И КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

В ходе изучения возможности защиты от оксидантов при помощи супероксиддисмутаз [32, 34, 46, 47] не могли не обнаружить инактивации эндогенного фермента пероксидом водорода [38]. Применение *in vivo* КАТ (внутривенная болюсная инъекция производного каталаза-полиэтиленгликоль в течение 3 дней) снижало артериальное давление у мышцей дикого типа со спонтанной гипертонией (но не с нокаутом ВК-СОД) и улучшало *ex vivo* функцию эндотелия аорты. Эти данные ясно указывали на центральную

роль пероксида водорода в инактивации эндогенной ВК-СОД [38, 48]. На культурах клеток показана польза снижения уровня пероксида водорода в условиях окислительного стресса. Сверхэкспрессия КАТ защищала эндотелий аорты человека от апоптоза, вызванного окисленными формами липопротеидов низкой плотности (окЛПНП) [49]. Такие данные указывали на целесообразность одновременного присутствия активности СОД и КАТ для защиты от сосудистого окислительного стресса. С этой целью применяли различные формы этих ферментов (как в виде смеси, так и в виде конъюгатов друг с другом).

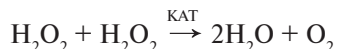
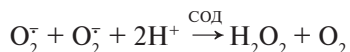
### КОМБИНИРОВАНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ С КАТАЛАЗОЙ

Результаты сочетанного применения нативных форм СОД и КАТ оказались весьма противоречивыми [30, 46]. Для проявления лечебного эффекта необходимо одновременное функционирование СОД и КАТ в очаге развития поражения [50]. Обеспечить это удалось при помощи биферментного конъюгата, в котором СОД-1 ковалентно присоединили к КАТ через хондроитинсульфат (ХС) – гликозаминогликан сосудистой стенки, и получили аддукт СОД-ХС-КАТ [46]. Такое конъюгирование изменяло свойства СОД-1, превращая ее в более близкую к гликопротеину СОД-3-форму [30, 51, 52]. В полученном СОД-ХС-КАТ-конъюгате СОД и КАТ катализируют две последовательные реакции, в которых продукт СОД – пероксид водорода – служит субстратом для катализируемой



**Рис. 7.** Сравнение интервалов оптимальных доз анти-тромботического действия производных супероксиддисмутазы (А) и каталазы (Б) (СОД и КАТ соответственно). 1 – Нативный фермент; 2 – ковалентный конъюгат фермента с хондроитинсульфатом (ХС); 3 – смесь производных СОД-ХС и КАТ-ХС; 4 – биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ.

КАТ реакции и превращается в безопасные воду и молекулярный кислород (схема реакций приведена ниже):



На модели артериального тромбоза у крыс, вызванного обработкой сосуда насыщенным раствором хлористого железа, биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ проявлял антитромботический эффект в дозах, на два порядка меньших, чем нативные СОД и КАТ, и на порядок меньших, чем модифицированные хондроитинсульфатом СОД и КАТ или их смесь (рис. 7) [50]. Сшивка белков ХС призвана направлять биферментный конъюгат к зонам сосудистого поражения. Известно, что в участках атеросклеротического поражения сосудов повышено содержание ХС [30]. Раннее утолщение интимы сосудистой стенки при атерогенезе также связано с накоплением ХС [53]. У атеросклеротических новозеландских белых кроликов после установки стентов наблюдалось экспонирование хондроитинсульфатпротеогликана в подвергнутом

хирургическому вмешательству субэндотелиальном слое артерии [54]. Представленные данные подчеркивают возможность и действенность использования компонентов гликокаликса сосудистых клеток для направленной доставки лекарств [53, 55].

### ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ КОНДИЦИОНИРОВАНИЕ МИОКАРДА

Эффективность лекарственной коррекции нарушений сердечно-сосудистого метаболизма связана и с другим подходом, который опирается на формирование мишени для фармакологического взаимодействия. В результате применения чередующихся кратковременных эпизодов ишемии/реперфузии до или после периода тяжелой, сравнительно длительной ишемии, последствия ишемии оказываются существенно легче, чем в отсутствие этой процедуры (рис. 8). Если после механического воздействия на миокард (в форме его пре- и посткондиционирования) определить метаболические цели, пригодные для успешной лекарственной коррекции, то можно применять приемы фармакологического пре- и посткондиционирования миокарда (рис. 9) [56]. Таким образом, для эффективного взаимодействия с терапевтическим агентом необходимо установить и подготовить чувствительную к нему мишень сердечно-сосудистого поражения.

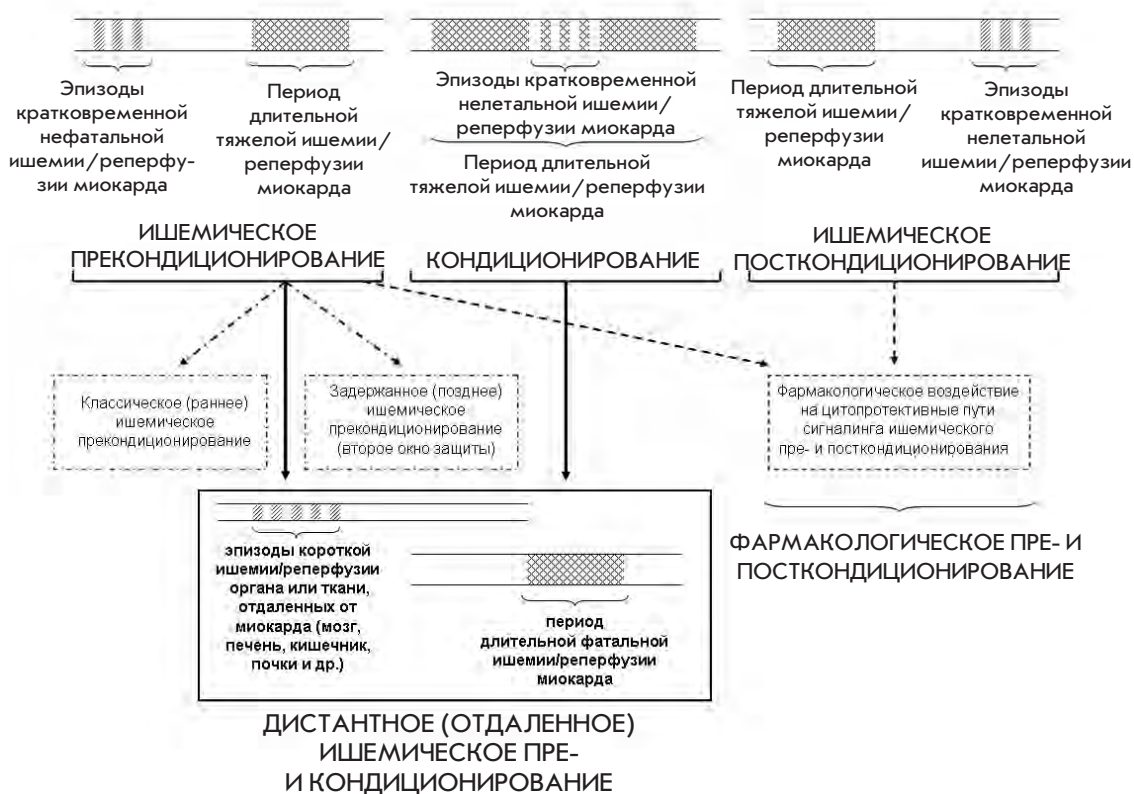


Рис. 8. Схема путей развития и взаимодействия ишемического пре- и посткондиционирования миокарда и его фармакологического кондиционирования.



Рис. 9. Схема развития исследований ишемического пре- и посткондиционирования миокарда и их связь с прогрессом в области биохимии и клеточной биологии, обобщаемых на новом уровне широким проведением генотипирования пациентов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить снижение интереса к исследованиям, выполняемым в рамках концепции направленного транспорта лекарств и связанным с разработкой биоконъюгатов для кардиологии. Клинического использования достигли такие «сокращенные» формы белков, как тенектеплаза, ретеплаза, абсиксимаб, монафрама. Очевидной становится необходимость изменения векторной части биоконъюгатов, когда все чаще используются не антитела к компонентам тромба, а к маркерам развивающегося поражения (молекулы клеточной адгезии, компоненты гликокаликса и др.). Выявлена важность для эффективного и специфичного нацеливания лекарств таких параметров, как размер биоконъюгата, плотность локального накопления мишеней-маркеров в развивающемся очаге поражения, применение комбинированного воздействия катализаторов сопряженных ферментативных реакций. Значимость концепции направленного транспорта лекарств, определяющая раньше стратегию конструирования биоконъюгатов, снижается. Все большее значение приобретают модификации разрабатываемых производных, придающие им дополнительные полезные свойства (более низкую эффективную дозу, простоту применения, пролонгированность действия) при заметной величине их терапевтического эффек-

та и безопасности применения. Появляются также новые подходы к кондиционированию миокарда, что способствует точному определению и формированию значимых мишеней для сердечно-сосудистой терапии. Это обещает модернизацию концепции направленного транспорта лекарств при разработке кардиологических биофармацевтиков и позволит перейти к созданию препаратов направленного действия следующего поколения. ●

Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в отборе и составлении материала, его обсуждении и представлении профессорам Кардиологического центра (ФГБУ РКНПК Минздравсоцразвития РФ) Е.П. Панченко и И.И. Староверову.

Глубоко признателен автор академику Е.И. Чазову и чл.-корр. РАН В.Н. Смирнову за внимание и поддержку исследовательско-аналитических усилий его лаборатории. Настоящая работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 12-08-00010 и 12-04-00015), а также Министерства здравоохранения и социального развития России.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erlich P. *Physiology or medicine 1901–1921*. Amsterdam: Elsevier Publishing Co., 1967. P. 304–320.
2. Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Торчилин В.П. // Журн. ВХО им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. XXXII. № 5. С. 485–487.
3. Максименко А.В. // Журн. ВХО им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. XXXII, № 5. С. 541–547.
4. Ding B.-S., Dziubla T., Shuvaev V.V., Muro S., Muzykantov V.R. // *Mol. Interv.* 2006. V. 6. № 2. P. 98–112.
5. Максименко А.В. // Молекуляр. биология. 1995. Т. 29. № 1. С. 38–60.
6. Boytsov S., van de Werf F. // *Am. Heart J.* 2011. V. 161. № 3. P. 427–430.
7. Hamm C.W., Bertrand M., Braunwald E. // *Lancet.* 2001. V. 358. № 9292. P. 1533–1538.
8. Davies M.J. // *Heart.* 2000. V. 83. № 3. P. 361–366.
9. Максименко А.В. // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. № 8. С. 563–571.
10. Bode C., Smalling R.W., Berg G., Burnett C., Lorch G., Kalbfleisch J.M., Chernoff R., Christie L.G., Feldman R.L., Seals A.A., et al. // *Circulation.* 1996. V. 94. № 5. P. 891–898.
11. Cannon C.P., McCabe C.H.G., Gibson C.M., Ghali M., Sequeira R.F., McKendall G.R., Breed J., Modi N.B., Fox N.L., Tracy R.P., et al. // *Circulation.* 1997. V. 95. № 2. P. 351–356.
12. Явелов И.С. // Кардиология. 2007. Т. 47. № 1. С. 37–46.
13. Катаев Ю.В., Тиунов В.К., Гужва А.Н., Козиолова Н.А., Смышляева М.М. // *Болезни сердца и сосудов.* 2011. Т. 6. № 1. С. 14–16.
14. Braunwald E. // *New Engl. J. Med.* 1997. V. 337. № 19. P. 1360–1369.
15. Huber K., De Caterina R., Kristensen S.D., Verheugt F.W.A., Montalescot G., Badimon Maestro L., van de Werf F. // *Eur. Heart J.* 2005. V. 26. № 19. P. 2063–2074.
16. van de Werf F., Bax J., Betriu A., Blomstrom-Lundqvist C., Crea F., Falk V., Filippatos G., Fox K., Huber K., Kastrati A., et al. // *Eur. Heart J.* 2008. V. 29. № 23. P. 2090–2945.
17. Ding B.-S., Zhou Y.-J., Chen X.-Y., Zhang J., Zhang P.-X., Sun Z.-Y., Tan X.-Y., Liu J.-N. // *Circulation.* 2003. V. 108. P. 2892–2898.
18. Schneider D.J., Sobel B.E. // *Circulation.* 2008. V. 118. P. 1408–1409.
19. Danielyan K., Ganguly K., Ding B.-S., Atochin D., Zaitsev S., Murciano J.-C., Huang P.L., Kasper S.E., Cines D.B., Muzykantov V.R. // *Circulation.* 2008. V. 118. P. 1442–1449.
20. Ganguly K., Murciano J.-C., Westrick R., Leferovich J., Cines D.B., Muzykantov V.R. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. V. 321. № 1. P. 158–164.
21. Zaitsev S., Spitzer D., Murciano J.-C., Ding B.-S., Tliba S., Kowalska M.A., Marcos-Contreras O.A., Kuo A., Stepanova V., Atkinson J.P., et al. // *Blood.* 2010. V. 115. № 25. P. 5241–5248.
22. Zaitsev S., Spitzer D., Murciano J.-C., Ding B.-S., Tliba S., Kowalska M.A., Beleir K., Kuo A., Stepanova V., Atkinson J.P., et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010. V. 332. № 3. P. 1022–1031.
23. Ding B.-S., Gottstein C., Grunow A., Kuo A., Ganguly K., Akbelda S.M., Cines D.B., Muzykantov V.R. // *Blood.* 2005. V. 106. № 13. P. 4191–4198.
24. Hochtl T., Farhan S., Wojta J., Huber K. // *Heart.* 2011. V. 97. P. 244–252.
25. Becker R.C., Gurbel P.A. // *Thromb. Haemost.* 2010. V. 103. P. 535–544.
26. Панченко Е.П. // Тер. архив. 1997. Т. 69. № 9. С. 66–71.
27. Певзнер Д.В., Староверов И.И., Самко А.Н., Фролова А.Н., Мазуров А.В., Руда М.Я. // Кардиология. 2010. Т. 50. № 6. С. 22–26.
28. Hann M.M. // *Med. Chem. Commun.* 2011. V. 2. P. 349–355.
29. Shulz G.E., Schirmer R.H. *Principles of protein structure*. New York–Heidelberg–Berlin: Springer Verlag, 1979.
30. Максименко А.В. // Хим.-фарм. журн. 2007. Т. 41. № 5. С. 3–12.
31. Chu Y., Iida S., Lund D.D., Weiss R.M., DiBona G.F., Watanabe Y., Faraci F.M., Heistad D.D. // *Circ. Res.* 2003. V. 92. P. 461–468.
32. Heistad D.D. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. V. 26. P. 689–695.
33. Onry T.D., Day B.J., Crapo J.D. // *Lab. Invest.* 1996. V. 75. P. 617–636.
34. Fukai T., Folz R.Z., Landmesser U., Harrison D.G. // *Cardiovasc. Res.* 2002. V. 55. P. 239–249.
35. Landmesser U., Merten R., Spiekermann S., Büttner K., Drexler H., Hornig B. // *Circulation.* 2000. V. 101. P. 2264–2270.
36. Tasaki H., Yamashita K., Tsutsui M., Kamezaki F., Kubara T., Tanaka S., Sasaguri Y., Adachi T., Nakashima Y. // *Atherosclerosis.* 2006. V. 187. P. 131–138.
37. Wolin M.S. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. V. 20. P. 1430–1442.
38. Jung O., Marklund S.L., Xia N., Busse R., Brandes R.P. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27. P. 470–477.
39. Gongora M.C., Qin Z., Lande K., Kim H.W., McCann L., Folz J.R., Dikalov S., Fukai T., Harrison D.G. // *Hypertension.* 2006. V. 48. P. 473–481.
40. Jung O., Marklund S.L., Geiger H., Pedrazzini T., Busse R., Brandes R.P. // *Circ. Res.* 2003. V. 93. P. 622–629.
41. Welch W.J., Chabrashvili T., Solis G., Chen Y., Gill P.S., Aslam S., Wang X., Ji H., Sandberg K., Jose P., Wilcox C.S. // *Hypertension.* 2006. V. 48. P. 934–941.
42. Ishichara T., Tanaka K., Tasaka Y., Namba T., Suzuki J., Okamoto S., Hibi T., Takanaga M., Igarashi R., Sato K., et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009. V. 328. № 1. P. 152–164.
43. Tanaka K.I., Ishichara T., Azuma A., Kudoh S., Ebina M., Nukiwa T., Sugiyama Y., Tasaka Y., Namba T., Ishichara T., et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010. V. 298. № 3. P. L348–L360.
44. Shuvaev V.V., Tliba S., Pick J., Arguiri E., Christofidou-Solomidou M., Albelda S.M., Muzykantov V.R. // *J. Control. Rel.* 2011. V. 149. № 3. P. 236–241.
45. Shuvaev V.V., Han J., Yu K.J., Huang S., Hawkins B.J., Madesh M., Nakada M., Muzykantov V.R. // *FASEB J.* 2011. V. 25. P. 348–357.
46. Maksimenko A.V. // *Curr. Pharm. Design.* 2005. V. 11. P. 2007–2016.
47. Carlsson L.M., Marklund S.L., Edlund T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 5219–5222.
48. Fukai T. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27. P. 442–444.
49. Lin S.J., Shyne S.K., Liu P.L., Chen Y.H., Ku H.H., Chen J.W., Tam K.B., Chen Y.L. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004. V. 36. P. 129–139.
50. Maksimenko A.V., Golubykh V.L., Tischenko E.G. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. V. 308. P. 1463–1468.
51. Marklund S.L. // *J. Clin. Invest.* 1984. V. 74. P. 1398–1403.
52. Stralin P., Karlsson K., Johansson B.O., Marklund S.L. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995. V. 15. P. 2032–2036.
53. Максименко А.В. // Хим.-фарм. журн. 2008. Т. 42. № 10. С. 3–13.
54. Joner M., Morimoto K., Kasukawa H., Steigerwald K., Merl S., Nakazawa G., John M.C., Finn A.V., Acampado E., Kolodgie F.D., et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. P. 1960–1966.
55. Sarembock I.J. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. P. 1879–1881.
56. Лупанов В.П., Максименко А.В. // Кардиоваск. терапия и профилактика. 2011. Т. 10. № 1. С. 96–103.

УДК 577.24:612.014.462.4

# Низкотемпературная плазма вызывает р53-зависимый апоптоз клеток карциномы кишечника

А. И. Тухватулин<sup>1</sup>, Е. В. Сысолятина<sup>1</sup>, Д. В. Щебляков<sup>1</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>1</sup>, М. М. Васильев<sup>2</sup>, М. А. Юрова<sup>1</sup>, М. А. Данилова<sup>1</sup>, О. Ф. Петров<sup>2</sup>, Б. С. Народицкий<sup>1</sup>, Г. Е. Morfill<sup>3</sup>, А. И. Григорьев<sup>4</sup>, В. Е. Фортон<sup>2</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1</sup>, С. А. Ермолаева<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>2</sup> Объединенный институт высоких температур РАН, 125412, Москва, ул. Ижорская, 13/19

<sup>3</sup> Max Planck Institute for Extraterrestrial Physics, 85748 Garching, Giessenbachstrasse, Germany

<sup>4</sup> Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76А

\*E-mail: sveta@ermolaeva.msk.su

Поступила в редакцию 10.05.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Низкотемпературная плазма (НТП) – это поток частично ионизированного газа, имеющего температуру, близкую к температуре окружающей среды. НТП включает большое количество биологически активных частиц (ионы, электроны, свободные радикалы, частицы в метастабильных состояниях), что позволяет использовать НТП для решения различных биомедицинских задач, в том числе в терапии новообразований. Обработка опухолевых клеток НТП вызывает дозозависимые эффекты, такие, как арест клеточного цикла и вступление клеток в апоптоз, однако точные молекулярные механизмы воздействия НТП на эукариотические клетки не изучены. В представленной работе мы изучили механизм развития и тип гибели клеток карциномы кишечника НСТ116 человека, обработанных низкотемпературной аргоновой плазмой, и определили влияние НТП на основной активируемый стрессом фактор транскрипции р53. Показано, что выживаемость клеток НСТ116 после обработки НТП зависит от наличия функционального белка р53. Воздействие НТП приводит к увеличению внутриклеточной концентрации р53 и индукции экспрессии контролируемых им генов, в частности активации основной проапоптотической каспазы-3. Впервые показано, что обработка клеток карциномы кишечника низкотемпературной плазмой приводит к р53-зависимому апоптозу. Эти результаты важны для понимания возможностей использования НТП в медицине в качестве противоопухолевого средства.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** низкотемпературная плазма, белок р53, апоптоз.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** НТП – низкотемпературная плазма; СВЧ – сверхвысокочастотный.

## ВВЕДЕНИЕ

Низкотемпературная плазма (НТП) представляет собой частично ионизированный газ, полученный при атмосферном давлении и имеющий макроскопическую температуру, близкую к температуре окружающей среды [1]. Интенсивное изучение возможностей применения НТП в медицине началось около 10 лет назад, хотя первые работы появились намного раньше, преимущественно в России [2–4].

В состав факела НТП входят заряженные частицы, нейтральные активные частицы, в том числе свободные радикалы и частицы в метастабильных состояниях, а также ультрафиолетовое излучение. Биологические эффекты НТП связаны с синергичным действием перечисленных факторов, подпорого-

вая концентрация каждого из которых в большинстве случаев не вызывает изменений в биологическом объекте [5, 6].

В настоящее время активно изучают возможность использования НТП в качестве антибактериального агента, так как установлено, что НТП обладает неспецифической бактерицидной активностью, позволяющей применять НТП для стерилизации термочувствительных поверхностей и для санирования тканей, в том числе раневых поверхностей [7–9]. Другая потенциальная область применения НТП – терапия новообразований. Так, сообщается о селективности цитотоксического действия плазмы в отношении разных типов клеток человека, а также о возможности подбора условий, обеспечивающих избиратель-



ную гибель опухолевых клеток определенного типа [10, 11]. Показано, что воздействие НТП на опухолевые клетки вызывает задержку клеточного цикла и переход этих клеток к апоптозу [12–14].

В отличие от конечных эффектов, вызванных обработкой клеток НТП, о молекулярных механизмах, лежащих в основе взаимодействия НТП с эукариотическими клетками, известно весьма немного. Такие данные необходимы для выяснения природы селективности действия НТП в отношении опухолевых клеток и определения границ применения НТП. В связи с этим цель нашей работы состояла в изучении молекулярных механизмов действия НТП на опухолевые клетки и определение типа гибели клеток, подвергнутых воздействию НТП.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии и условия выращивания клеток

В работе использовали две сублинии клеток карциномы прямой кишки человека (HCT116): сублинию HCT116(p53+/+)-ConA-lacZ, содержащую активный ген p53, а также репортерный ген β-галактозидазы под контролем p53-зависимого промотора, и сублинию HCT116(p53-/-)-ConA-lacZ, в которой делетированы обе копии гена, кодирующего белок p53. Исходные линии клеток HCT116(p53+/+) и HCT116(p53-/-) любезно предоставлены А.В. Гудковым (Roswell Park Cancer Institute, США). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 об.% сыворотки эмбрионов крупного скота («Nuclone», США), 1 мг/мл глутамина («ПанЭко», Россия), 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки рассеивали в отношении 1 : 6 на вторые сутки при достижении монослоя.

### Определение количества живых клеток

Выживаемость клеток определяли спектрофотометрическим методом через 24 ч после обработки холодной плазмой по интенсивности окраски живых клеток красителем метиленовым голубым. Оптическую плотность измеряли при 540 и 620 нм. Относительное количество выживших клеток определяли по формуле  $x = OE_{620} - OE_{540}$ .

### Определение активности p53-контролируемого промотора по экспрессии репортерного гена β-галактозидазы

После удаления культуральной среды к клеткам добавляли лизирующий буфер, содержащий субстрат для β-галактозидазы (1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.25 М Трис-НСl, рН 7.4, 0.02% NP40, 2 г/л о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид). После инкубации при 37°C в те-

чение 30 мин уровень активности β-галактозидазы определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность раствора при длине волны 414 нм.

### Источник НТП

В работе использовали источник низкотемпературной аргоновой СВЧ плазмы MicroPlaSter β. Источник НТП содержал генератор тока с частотой 2.45 ГГц, горелку и систему подачи газа (аргон). Прибор может работать в двух режимах: режиме НТП и режиме продува неионизированного аргона. Горелка способна генерировать высокостабильный поток плазмы (факел) низкой мощности (60—150 Вт) с низкой скоростью газового потока (4–8 л/мин). Длина плазменного факела – примерно 5 см, диаметр – около 3.5 см. Температура факела на расстоянии 2 см от горелки, где помещались образцы, равнялась 36 ± 2°C.

### Облучение клеток НТП

За один день до начала эксперимента клетки высеивали на культуральные чашки диаметром 3 см по 2 × 10<sup>5</sup> клеток/чашка. На следующий день непосредственно перед облучением из культуральных чашек удаляли среду, оставляя 0.5 мл, располагали чашки на расстоянии 2 см от плазменной горелки и облучали НТП в течение времени, указанного далее. Сразу после облучения культуральную среду заменяли свежей и переносили чашки в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Количество жизнеспособных клеток и активность репортерного гена β-галактозидазы определяли через 24 ч после облучения.

### Измерение уровня активности каспазы-3

Активность каспазы-3 измеряли, используя конъюгат антител, специфичных для активной формы белка, с флуоресцентным красителем флуоресцеинизотиоцианатом (FITC, «BD Pharmingen», США). Через 18 ч после обработки плазмой клетки собирали и осаждали центрифугированием в течение 10 мин при скорости 1200 об/мин. Для фиксации и пермеаблизации клеток использовали реагент BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit («BD Pharmingen»). Внутриклеточное окрашивание активной формы каспазы-3 осуществляли согласно протоколу производителя («BD Pharmingen»). Флуоресценцию детектировали методом проточной цитофлуориметрии, используя цитометр Beckman-Coulter FC-500.

### Измерение уровня активности p53

Уровень p53 измеряли, используя конъюгат антител к белку p53 с флуоресцентным красителем фикоэритрином («BD Pharmingen», США). За 1 день до начала опыта на культуральные чашки

диаметром 3 см высевали по  $2 \times 10^5$  клеток линии НСТ116(p53+/+)-ConA-lacZ и НСТ116(p53-/-)-ConA-lacZ. На следующий день при достижении клетками 60–80% конfluenceности из чашек отбирали культуральную среду, оставив 0.3 мл для предотвращения высыхания клеток. После обработки клеток плазмой в течение 2 мин клеточную среду заменяли свежей. После инкубации в течение 6 ч клетки собирали и осаждали центрифугированием (10 мин, 1200 об/мин). Для фиксации и пермеаблизации клеток использовали реагент BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit («BD Pharmingen»). Внутриклеточное окрашивание белка p53 производили согласно протоколу производителя («BD Pharmingen»). В качестве изотипического контроля использовали IgG1 мыши. Флуоресценцию детектировали методом проточной цитофлуориметрии, используя цитометр BeckmanCoulter FC-500.

### Статистика

Каждый эксперимент был выполнен не менее 3 раз, измерения проводились в двух повторах. Среднее значение и стандартную ошибку определяли с использованием функций, включенных в программный пакет Excel 2007.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Обработка НТП вызывает дозозависимую гибель клеток НСТ116

Одной из возможных причин гибели опухолевых клеток после обработки НТП, может быть способность плазмы активировать фактор транскрипции p53 и инициировать развитие p53-зависимых программ, ведущих к апоптотической гибели.

Для проверки этого предположения мы выбрали линию клеток НСТ116(p53+/+) карциномы прямой кишки человека, содержащих функциональный ген p53. На первом этапе определили способность НТП вызывать гибель этих клеток. С этой целью клетки НСТ116(p53+/+) облучали НТП с различным временем экспозиции. Через 24 ч после облучения определяли количество живых клеток. Контролем служили необлученные клетки, а также клетки, обработанные потоком неионизированного аргона в течение соответствующего времени. Воздействие НТП в течение 2 мин не вызывало статистически значимого снижения числа живых клеток (рис. 1). После облучения в течение 5 мин число живых клеток снижалось в 2 раза ( $p < 0.01$ ), а после 7 мин – в 14.5 раза по сравнению с интактными контрольными клетками ( $p < 0.005$ ). Снижение числа живых клеток после облучения плазмой в течение 7 мин статистически значимо отличалось от эффекта неионизированно-

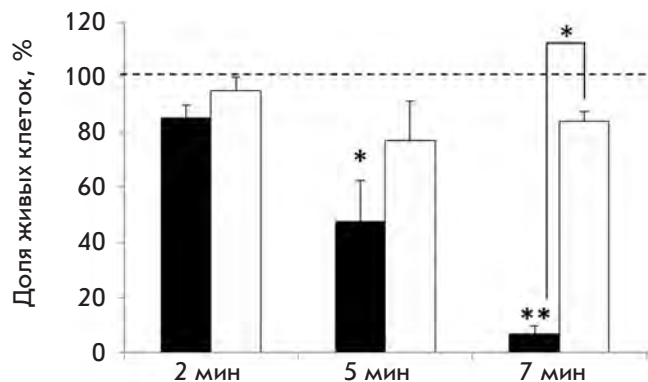


Рис. 1. Определение выживаемости клеток линии НСТ116(p53+/+), обработанных НТП (черные столбцы) и неионизированным аргоном (белые столбцы), в зависимости от времени экспозиции. Показан процент живых клеток по сравнению с интактным контролем, число клеток в котором принято за 100% (показано пунктиром). Приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  по сравнению с интактными клетками.

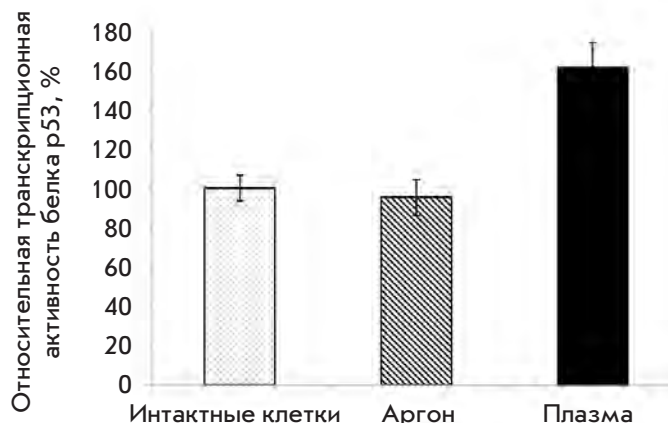
го аргона ( $p < 0.01$ ). При облучении неионизированным аргоном число живых клеток снижалось относительно контрольных, однако было статистически незначимым при всех временах экспозиции. Наблюдаемое снижение числа живых клеток могло быть обусловлено последствиями обдува клеток потоком газа, приводящего к испарению культуральной среды или другим неспецифическим эффектам.

Таким образом, нами было показано, что обработка НТП приводит к уменьшению количества живых клеток, при этом выраженность цитотоксического эффекта зависит от времени воздействия плазменного потока. Снижение числа живых клеток при обработке потоком неионизированного аргона было меньше и не зависело от времени экспозиции. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что цитотоксичность НТП обеспечивается специфическим воздействием ионизированных частиц НТП на эукариотические клетки.

### В клетках НСТ116, обработанных НТП, активируется белок p53 и контролируемые им элементы

Известно, что одним из основных активируемых стрессом регуляторов транскрипции является белок p53, активация которого способна инициировать развитие ряда программ, приводящих к клеточной гибели.

Влияние НТП на активность белка p53 изучали с использованием сублиний клеток НСТ116



**Рис. 2.** Относительная транскрипционная активность белка p53 в клетках HCT116(p53+/+), обработанных НТП. Приведены средние значения ± стандартное отклонение.

(HCT116(p53+/+)-ConA-lacZ). В геном клеток HCT116(p53+/+)-ConA-lacZ был введен репортерный ген *lacZ*, кодирующий бактериальную β-галактозидазу. Экспрессия репортерного гена контролировалась p53-зависимым промотором. Использование данной репортерной системы позволяет определять транскрипционную активность белка p53 по уровню активности β-галактозидазы. Исходя из полученных ранее данных, определили субтоксическое время обработки клеток НТП, которое не приводит к выраженной гибели клеток (2 мин). Уровень экспрессии гена β-галактозидазы определяли спектрофотометрически через 24 ч после воздействия на клетки НТП. В качестве контроля использовали клетки, обработанные потоком неионизированного аргона. Обработка клеток НТП в течение 2 мин приводила к статистически значимому повышению уровня активности β-галактозидазы, что указывало на увеличение транскрипционной активности p53 в клетках линии HCT116 (рис. 2).

Дополнительно методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к p53, конъюгированных с флуоресцентной меткой, определили количество самого белка p53. В качестве контрольной линии использовали клетки HCT116(p53-/-) с делецией обеих копий гена p53. Показано, что обработка НТП в течение 2 мин приводит к статистически значимому увеличению количества белка p53 в клетках HCT116(p53+/+) по сравнению с контрольными интактными клетками (рис. 3А). Неспецифический сигнал в клетках линии HCT116(p53-/-), как и следовало ожидать, не изменялся после воздействия НТП (рис. 3Б).

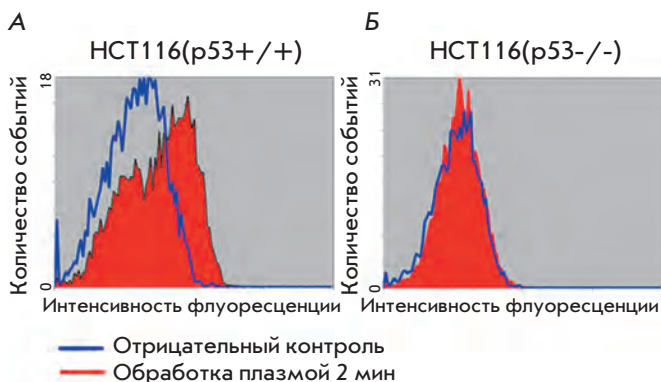
Таким образом, установлено, что обработка эукариотических клеток НТП при субтоксических временах экспозиции приводит к статистически значимому ( $p < 0.05$ ) увеличению количества белка p53 и повышению его транскрипционной активности.

### Воздействие НТП приводит к апоптотической гибели клеток HCT116

На заключительном этапе работы необходимо было идентифицировать тип клеточной смерти индуцируемой обработкой НТП. Среди известных на сегодняшний день механизмов клеточной смерти одним из основных является инициация апоптоза путем программ с участием активированного белка p53 [15]. Один из ключевых ферментов, активизирующихся при апоптозе, – эффекторная каспаза-3 [16]. Активация этого белка является неотъемлемой чертой заключительных стадий апоптотической гибели клеток. Для выявления связей между активацией белка p53 и гибелью клеток HCT116 определили уровень активированной каспазы-3 в клетках сублиний HCT116(p53+/+) и HCT116(p53-/-), обработанных НТП.

В популяции клеток HCT116(p53+/+), обработанных НТП в течение 2 мин, наблюдалось значительное (до 20%) увеличение доли клеток с активной каспазой-3 (рис. 4А), тогда как в клетках HCT116(p53-/-) такая обработка к подобному эффекту не приводила (рис. 4Б). Таким образом, можно заключить, что обработка клеток НТП приводит к p53-зависимой активации основной эффекторной проапоптотической каспазы-3.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что обработка клеток человека НТП при-



**Рис. 3.** Внутриклеточная концентрация белка p53 в клетках HCT116(p53+/+) и HCT116(p53-/-) (А и Б соответственно), контрольных или обработанных НТП в течение 2 мин.

водит к активации белка p53, основного регулятора ответа клетки на стресс, и индуцирует экспрессию p53-зависимых генов, в том числе эффекторной каспазы-3, запуская тем самым гибель клеток по апоптотическому пути. Впервые прямо показано, что апоптоз, вызванный НТП, развивается по p53-зависимому пути. Ранее на основании данных об усилении транскрипции гена p53 и гена p21, контролируемого белком p53, в клетках гепатокарциномы Hep2G человека предположили, что p53 участвует в ответе клеток на облучение НТП [17]. Однако прямых доказательств существования связи между выживаемостью клеток и наличием функционального белка p53 не было. Полученные нами результаты соответствуют индукции сигнального пути, регулируемого  $\beta$ -катенинами, в клетках рака кишечника человека, подвергнутых воздействию НТП, поскольку этот путь связан с основным сигнальным каскадом, контролируемым белком p53 [18]. Еще одна сигнальная система, вовлеченная в клеточный ответ на воздействие НТП, это генерация внутриклеточных активных форм кислорода (ROS, reactive oxygen species) [14]. Внутриклеточные ROS, прямо или опосредованно взаимодействующие с такими компонентами сигнальных путей, как протеинкиназы, фосфатазы, факторы транскрипции, служат вторичными сигнальными молекулами, которые участвуют в контроле клеточного цикла и влияют на окончательный исход событий, запущенных в результате активации белка p53 [19].

Однако последовательность сигнальных событий, развивающихся в клетке в ответ на воздействие НТП, до настоящего времени не установлена. Прежде всего, не полностью выяснен характер повреждений, приводящих к активации белка p53. Ряд исследований указывает на возможность повреждений ДНК как фактора, приводящего к апоптозу облученных клеток. Так, воздействие дибарьерного разряда как источника воздушной плазмы на клетки рака молочной железы MCF10A приводит к фосфорилированию гистона H2A, что является маркером возникновения двухцепочечных разрывов в ДНК [14]. Однако эти результаты противоречат многочисленным данным, полученным на прокариотах и очищенных препаратах ДНК, о минимальном количестве двухцепочечных разрывов, обусловленных воздействием НТП [20–23]. Для объяснения этого противоречия авторы предположили, что двухцепочечные разрывы в ДНК могут возникать, например, в результате образования внутриклеточных ROS под действием НТП [14]. Другим потенциальным сигналом развития апоптоза могут быть повреждения цитоплазматической мембраны. Например, активация кислой сфингомиелиназы при повреждении мембраны и увеличенная продукция церамидов могут приводить к развитию

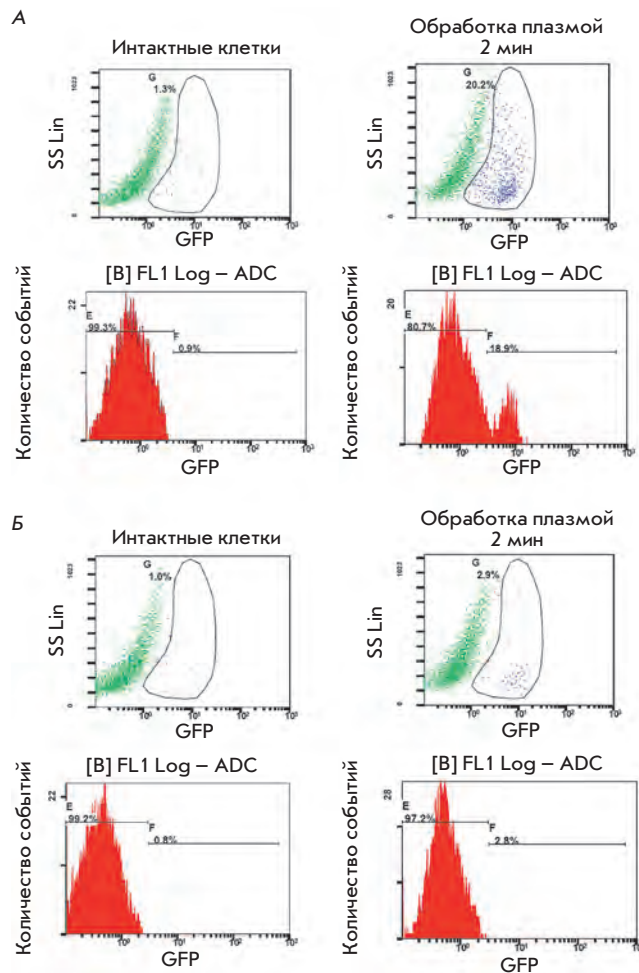


Рис. 4. Количество активной каспазы-3 в клетках НСТ116(p53+/+) и НСТ116(p53-/-) (А и Б соответственно), контрольных или обработанных НТП в течение 2 мин.

как p53-зависимого, так и независимого апоптоза [24]. В пользу этого механизма запуска апоптоза свидетельствуют многочисленные экспериментальные данные, показывающие, что именно поверхностные структуры клетки и, в частности, мембрана, служат основной мишенью для активных частиц НТП [20, 25–27]. Однако доказательств в пользу данного механизма инициации апоптоза не получено, и детали событий, происходящих в клетке сразу после воздействия НТП, не изучены. Вместе с тем, очевидно, что для успешного применения НТП в медицине необходимо понимать, какие сигнальные события НТП запускает в зависимости от дозы и типа плазменного облучения, поскольку именно эти знания позволяют оптимизировать параметры воздействия и получить необходимый эффект.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований показано, что выживаемость клеток карциномы кишечника НСТ116, обработанных НТП, зависит от наличия функционального белка p53. Воздействие НТП на клетки приводит к увеличению внутриклеточной концентрации p53 и индукции экспрессии контролируемых им генов, в частности основной проапоптотической каспазы-3. Таким образом, впервые показано, что обработка клеток карциномы кишечника аргоновой НТП приводит к p53-зависимому апоптозу. Эти результаты важны для понимания возмож-

ностей применения НТП в качестве противоопухолевого средства. ●

*Авторы благодарят ADTEC Plasma Technology Co. Ltd за вклад в создание источника НТП MicroPlaSter β.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственные контракты № 02.512.12.2023, 16.512.12.2013).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фортгов В.Е. Энциклопедия низкотемпературной плазмы. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2004. 530 с.
2. Kong M., Kroesen G., Morfill G., Nosenko T., Shimizu T., van Dijk J., Zimmermann J. // N. J. Physics. 2009. V. 11. № 11. P. 115012–115048.
3. Ермолаева С.А., Петров О.Ф., Миллер Г.Г., Шагинян И.А., Сысолятина Е.В., Мухачев А., Я. Народицкий Б.С., Morfill G.E., Фортгов В.Е., Григорьев А.И. и др. // Вестн. РАМН. 2011. № 10. С. 15–21.
4. Шехтер А.Б., Кабисов Р.К., Пекшев А.В., Козлов Н.П., Перов Ю.Л. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1998. V. 126. № 4. С. 210–215.
5. Stoffels E., Sakiyama Y., Graves D. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2008. V. 36. № 4. P. 1441–1457.
6. Fridman G., Friedman G., Gutsol A., Shekhter A., Vasilets V., Fridman A. // Plasma Proc. Polym. 2008. V. 5. № 6. P. 503–533.
7. Ermolaeva S.A., Varfolomeev A.F., Chernukha M.Y., Yurov D.S., Vasiliev M.M., Kaminskaya A.A., Moisevich M.M., Romanova J.M., Murashev A.N., Selezneva I.I., et al. // J. Med. Microbiol. 2011. V. 60. № 1. P. 75–83.
8. Lee K., Paek K., Ju W., Lee Y. // J. Microbiol. 2006. V. 44. № 3. P. 269–275.
9. Moisan M., Barbeau J., Crevier M., Pelletier J., Philip N., Saoudi B. // Pure Appl Chem. 2001. V. 74. № special. P. 349–358.
10. Vandamme M., Robert E., Dozias S., Sobilo J., Lerondel S., Le Pape A., Pouvesle J. // Plasma Med. 2011. V. 1. № 1. P. 27–43.
11. Georgescu N., Lupu A. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2010. V. 38. № 8. P. 1949–1955.
12. Stoffels E., Roks A., Deelman L. // Plasma Proc. Polym. 2008. V. 5. № 6. P. 599–605.
13. Kieft I., Darios D., Roks A., Stoffels E. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2005. V. 33. № 6. P. 771–775.
14. Kalghatgi S., Kelly C.M., Cerchar E., Torabi B., Alekseev O., Fridman A., Friedman G., Azizkhan-Clifford J. // PLoS ONE. 2011. V. 6. № 1. P. e16270.
15. Wyllie A. // Nature. 1997. V. 389. № 6648. P. 237–238.
16. Abu-Qare A.W., Abou-Donia M.B. // J. Toxicol. Environ. Hlth B Crit. Rev. 2001. V. 4. № 3. P. 313–332.
17. Yan X., Zou F., Zhao S., Lu X., He G., Xiong Z., Xiong Q., Zhao Q., Deng P., Huang J., et al. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2010. V. 38. № 9. P. 2451–2457.
18. Reya T., Clevers H. // Nature. 2005. V. 434. № 7035. P. 843–850.
19. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. // Cell. Physiol. Biochem. 2001. V. 11. № 4. P. 173–186.
20. Venezia R.A., Orrico M., Houston E., Yin S., Naumova Y.Y. // Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2008. V. 29. № 5. P. 430–436.
21. Birmingham J. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2004. V. 32. № 4. P. 1526–1531.
22. Yasuda H., Hashimoto M., Rahman M., Takashima K., Mizuno A. // Plasma Proc. Polym. 2008. V. 5. № 6. P. 615–621.
23. Mizuno A. // NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security / Eds Machala Z., Hensel K., Akishev Y. Germany: Springer Science+Business Media. B.V., 2012.
24. Heffernan-Stroud L.A., Obeid L.M. // Adv. Enzyme Regul. 2011. V. 51. № 1. P. 219–228.
25. Tarasenko O., Nourbakhsh S., Kuo S., Bakhtina A., Alusta P., Kudasheva D., Cowman M., Levon K. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2006. V. 34. № 4. P. 1281–1289.
26. Joshi S.G., Paff M., Friedman G., Fridman G., Fridman A., Brooks A.D. // Am. J. Infect. Control. 2010. V. 38. № 4. P. 293–301.
27. Laroussi M., Mendis D., Rosenberg M. // New J. Phys. 2003. V. 5. № 41. P. 1–10.

УДК 57.085.23

# Митохондриальный путь апоптоза в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 при действии $\alpha$ -токоферилсукцината

М. А. Савицкая\*, М. С. Вильданова, О. П. Кисурин-Евгеньева, Е. А. Смирнова, Г. Е. Онищенко

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: nakomis@mail.ru

Поступила в редакцию 24.05.2012 г.

**РЕФЕРАТ** В связи с распространенностью злокачественных заболеваний большое внимание уделяется поиску соединений, обладающих противоопухолевой активностью и селективностью в отношении опухолевых клеток. К этим соединениям относятся и такие производные витамина Е, как сукцинат витамина Е (СВЕ). В связи с тем, что опухоли кожи трудно поддаются лечению, мы изучали действие СВЕ на культивируемые клетки эпидермоидной карциномы человека при помощи прижизненного окрашивания флуоресцентными красителями, иммуноцитохимического окрашивания и трансмиссионной электронной микроскопии. Показано, что СВЕ вызывает апоптотическую гибель клеток А431, уровень которой зависит от концентрации и продолжительности воздействия применяемого агента. Индукция апоптоза сопровождается гиперпродукцией активных форм кислорода, изменением формы, размеров и ультраструктуры митохондрий, выходом цитохрома с из митохондрий в цитозоль, что позволяет сделать заключение о митохондриальном механизме апоптоза. Таким образом, показано, что митохондрии служат важной мишенью действия СВЕ при запуске каспазозависимой апоптотической гибели клеток эпидермоидной карциномы человека А431 в культуре.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА**  $\alpha$ -токоферилсукцинат, апоптоз, митохондрии, активные формы кислорода, цитохром с.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** СВЕ – сукцинат витамина Е; АФК – активные формы кислорода; АИ – апоптотический индекс; СДГ – сукцинатдегидрогеназа.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время внимание многих исследователей направлено на поиск противоопухолевых средств, селективно действующих на злокачественные клетки, но нетоксичных для нормальных клеток и тканей. В число таких соединений входят производные витамина Е.

Сегодня термин «витамин Е» применяют к целой группе как природных, так и синтетических соединений, называемых токоферолами и токотриенолами, а также к ацетиловым и сукциниловым производным токоферола. Проявления биологической активности витамина Е разнообразны и недостаточно изучены. Некоторые формы витамина Е можно рассматривать в качестве потенциальных противоопухолевых средств, поскольку они могут нейтрализовывать свободные радикалы, подавлять рост трансформированных клеток и индуцировать их дифференцировку, влиять на прохождение клеточного цикла, вызывать

апоптоз, а также усиливать работу иммунной системы [1–3].

Показано, что сам  $\alpha$ -токоферол практически не обладает противоопухолевой активностью, в то время как ряд его производных, в том числе и сукцинат витамина Е ( $\alpha$ -токоферилсукцинат, СВЕ), в той или иной степени проявляют такую активность. Негидролизированный СВЕ не обладает окислительно-восстановительными свойствами, но, в отличие от свободного  $\alpha$ -токоферола, имеет уникальные антипролиферативные и проапоптотические свойства [4]. СВЕ может действовать как на культивируемые опухолевые клетки [5, 6], так и на трансплантированные животным опухоли человека, и опухоли, индуцированные химическими канцерогенами [7–11]. СВЕ может вызывать гибель клеток, остановку клеточного цикла [12, 13], подавлять ангиогенез [14] и защищать организм от действия ионизирующего облучения [15].

Мишени СВЕ в клетках различного происхождения интенсивно изучаются. Показано, что СВЕ запускает апоптотическую гибель ряда опухолевых клеток (рак молочной железы, злокачественная мезотелиома, нейробластома) по митохондриальному пути [16–21]. Тем не менее механизмы СВЕ-индуцированного апоптоза изучены еще недостаточно. Действие СВЕ изучали на культивируемых опухолевых клетках разного происхождения. Опухоли кожи обладают высокой злокачественностью и относятся к числу плохо поддающихся лечению, однако работы, посвященные действию производных витамина Е на трансформированные кератиноциты, в настоящее время практически отсутствуют. Прогноз при злокачественных заболеваниях кожи часто оказывается неблагоприятным.

В связи с этим в представленной работе изучено действие  $\alpha$ -токоферилсукцината на культивируемые клетки эпидермоидной карциномы человека А431.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Культура клеток и постановка эксперимента

Клетки культуры А431 (эпидермоидная карцинома человека) (Институт цитологии РАН, Россия) растили в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота («РАА Laboratories», Австрия) и 80 мг/мл гентамицина («ПанЭко») при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

В качестве растворителя для СВЕ («Sigma») использовали 96% этанол. Первым контролем служили клетки, среда культивирования которых не содержала добавок. В качестве второго контроля в среду культивирования добавляли этанол. Агент и спирт, используемый в качестве второго контроля, вносили на 2 сут после посадки клеток и инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч.

#### Оценка уровня гибели клеток

Долю апоптотических клеток в популяции подсчитывали на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, по стандартной методике. Критериями для распознавания клеток, вступивших в апоптоз, служили такие морфологические признаки, как конденсация хроматина, уплотнение и блеббинг цитоплазмы. Оценивали действие СВЕ в концентрации 20, 40, 60 и 100 мкМ. Препараты анализировали на микроскопе Leica DM 1000 с использованием объектива N PLAN 100x/1.25 Oil. Результаты обрабатывали в программе Microsoft Office Excel 2007.

#### Цитохимия и иммуноцитохимия

Для иммуноцитохимических исследований клетки фиксировали 4% формальдегидом («MP

Biochemicals», Франция), приготовленным на 0.1 М буфере PBS («Sigma») pH 7.2. Препараты окрашивали моноклональными антителами мыши к активной форме каспазы-3 («Sigma»), антителами овцы к цитохрому с («Sigma»). В качестве вторых антител использовали антитела к Ig мыши, конъюгированные с Alexa Fluor-488 («Sigma»), и антитела к Ig овцы, конъюгированные с Alexa Fluor-488 («Invitrogen», США) соответственно. Ядра клеток докрасивали DAPI (100 нМ, «Sigma»). Препараты заключали в PBS–глицерин (1 : 1) и анализировали на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M («Carl Zeiss Inc.», Германия) с использованием объектива Plan-NEOFLUAR 100x/1.30. Снимки обрабатывали с помощью программ Adobe Photoshop и ImageJ.

Митохондрии выявляли при помощи потенциал-зависимого красителя Mitotracker Orange CMTRos (100 нМ, «Invitrogen Molecular Probes»). Клетки фиксировали 4% формальдегидом («MP Biochemicals», Франция), приготовленным на 0.1 М буфере PBS pH 7.2, и заключали в смесь PBS–глицерин (1 : 1).

#### Прижизненные наблюдения

Для выявления АФК в среду добавляли 2',4'-дихлорфлуоресцеиндиацетат (DCFH-DA, «BioChemika», США) в концентрации 10 мкМ и выдерживали в течение 20 мин. В присутствии АФК (пероксид водорода, пероксид-анион, пероксид-радикал) в клетке образуется флуоресцентный продукт окисления – дихлорфлуоресцеин. DCFH-DA вносили через 48 ч после внесения СВЕ в среду культивирования. Фото съемку проводили на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M («Carl Zeiss Inc.») с использованием объектива Plan-NEOFLUAR 20x/0.50. Подсчитывали долю АФК-положительных клеток на снимках. Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel. Фотографии обрабатывали при помощи программы Adobe Photoshop CS3.

#### Трансмиссионная электронная микроскопия

Для электронно-микроскопического исследования клетки фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом («Sigma») с 2% формалином в 0.1 М PBS pH 7.2 («Sigma»). Постфиксацию проводили 1% раствором OsO<sub>4</sub> («Sigma») в PBS в течение 1 ч в темноте. Далее использовали стандартные процедуры приготовления препаратов для трансмиссионной электронной микроскопии. Ультратонкие срезы (60–80 нм) изготавливали на ультрамикротоме Ultratom-5 («LKB», Швеция). Срезы окрашивали 1.5% водным раствором уранилацетата («Serva», США) и цитратом свинца («Serva») по Рейнольдсу. Препараты анализировали при помощи трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 («JEOL») с цифровой фотокамерой

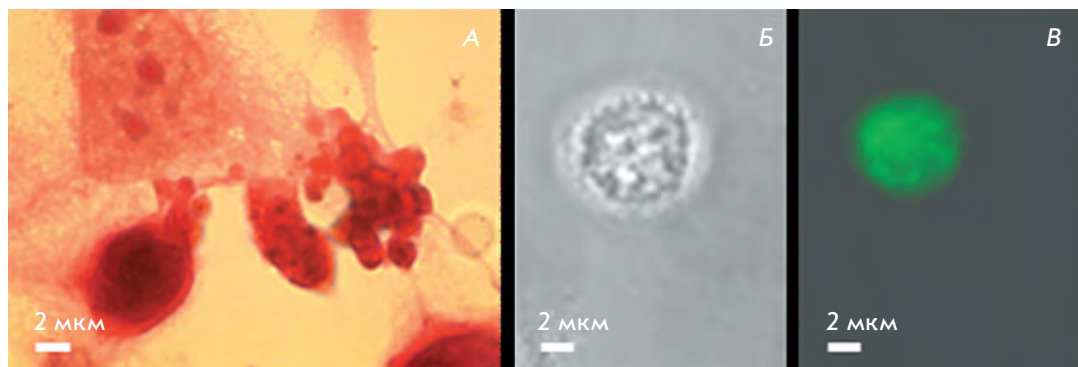


Рис. 1. Апоптоз в культуре клеток А431. А – Окраска гематоксилином и эозином; Б – фазовый контраст; В – иммуноцитохимическое выявление каспазы-3 в клетке, показанной на «Б».

GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы «GATAN» и трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100B («JEOL»).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### СВЕ вызывает апоптотическую гибель клеток А431 и его эффект зависит от концентрации и продолжительности воздействия

На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, обнаружен только один тип гибели клеток – апоптоз. Апоптотические клетки можно было выявить по ряду критериев, таких, как ошаривание, уплотнение цитоплазмы, конденсация хроматина, блеббинг и распад на апоптотические тельца. Некротические клетки не выявлены (рис. 1А). Присутствие активной формы каспазы-3 (рис. 1Б,В) также указывает на апоптотический путь гибели клеток.

Величина АИ в контрольных образцах культуры клеток А431 составляет 0.4–0.9%, а добавление 96% этанола практически не влияет на величину АИ. На 2-е сут инкубации клеток с СВЕ в концентрации 40 мкМ АИ значительно повышается (9.67%) и остается на том же уровне на 3-и сут. При добавлении 60 мкМ СВЕ на 1-е сут АИ практически не меняется, на 2-е резко повышается (более 60%), а на 3-и клетки на стеклах не обнаруживаются. Подобный эффект наблюдается и при действии 100 мкМ СВЕ (63.5%), но величины АИ в этом случае наиболее высокие (рис. 2).

Таким образом, статистический анализ показал, что под действием СВЕ увеличивается уровень гибели клеток линии А431, причем эффект зависит от концентрации и продолжительности воздействия.

При концентрации СВЕ, равной 40 мкМ, и инкубации в течение 48 ч величина АИ заметно повышается, но массовая гибель клеток еще не происходит, поэтому данная доза была выбрана для изучения механизма индукции апоптоза.

### СВЕ вызывает изменение структуры митохондрий и выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль

Согласно опубликованным данным, во многих линиях клеток СВЕ запускает апоптоз по митохондриальному механизму. С целью изучения роли митохондриального механизма в запуске апоптоза анализировали общую структуру хондриома, ультраструктуру митохондрий, локализацию цитохрома с и уровень индукции АФК.

Для анализа состояния хондриома в контроле и при воздействии СВЕ клетки окрашивали потенциал-зависимым красителем Mitotracker Orange СМТМRos, способным накапливаться только в работающих митохондриях. На рис. 3А,Б представлены клетки А431, у которых хондриом образован многочисленными митохондриями, среди которых встречаются небольшие овальные, округлые и нитевидные митохондрии, изогнутые, с перетяжками и т.д. Как правило, митохондрии распределены равномерно по всей цитоплазме, очень редко они образуют скопления вокруг ядра, иногда располагаются в периферической цитоплазме. В отдельных случа-

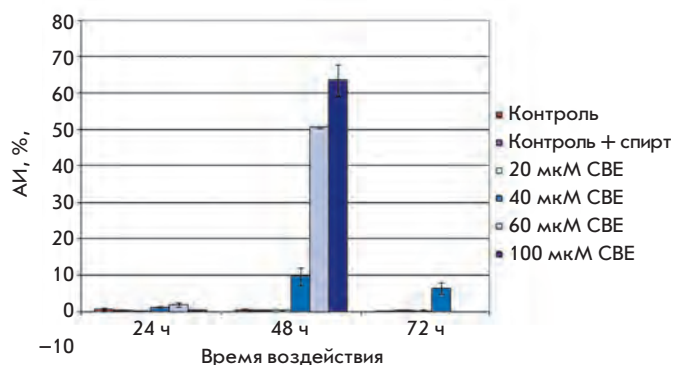


Рис. 2. Зависимость апоптотического индекса клеток в культуре А431 от концентрации СВЕ и времени инкубации.



ях могут встречаться крупные овальные и округлые митохондрии (рис. 3А). При добавлении спирта распределение митохондрий и их форма не изменяются (рис. 3Б).

Под действием СВЕ изменяется форма митохондрий, появляются многочисленные крупные округлые и овальные митохондрии, значительно превосходящие по размеру митохондрии в контрольных клетках. Число таких митохондрий в клетке может различаться, но в целом их, как правило, заметно меньше, чем в контрольных клетках.

Локализацию цитохрома с определяли иммуноцитохимически. Выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль является ключевым процессом в апоптозе, протекающем по митохондриальному («внутреннему») пути.

В контроле и в контроле с добавлением спирта антитела к цитохрому с выявляют данный белок в составе митохондрий. Как видно из рис. 4А,Б митохондрии небольшие, многочисленные, часто имеют нитевидную форму. Иногда встречаются небольшие овальные и округлые митохондрии.

В клетках, которые культивировали в присутствии СВЕ (рис. 4В–Е), можно проследить различную степень окрашивания цитоплазмы и разное количество окрашенных митохондрий, что свидетельствует о выходе цитохрома с из некоторых митохондрий в цитозоль. Так, на рис. 4Г видна клет-

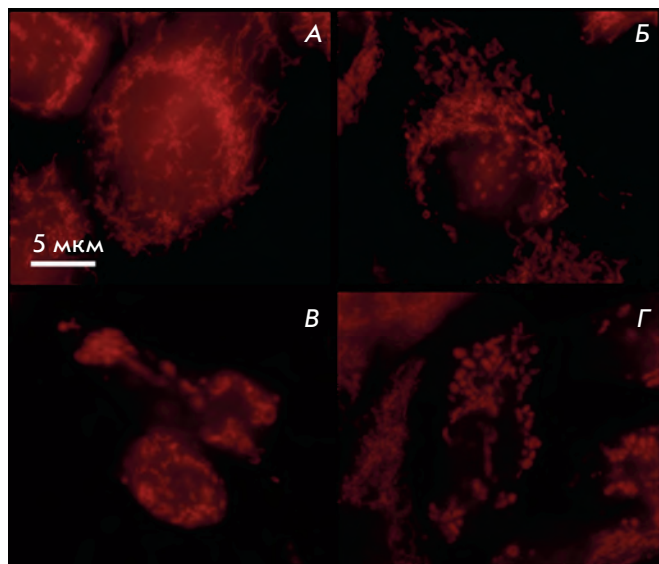
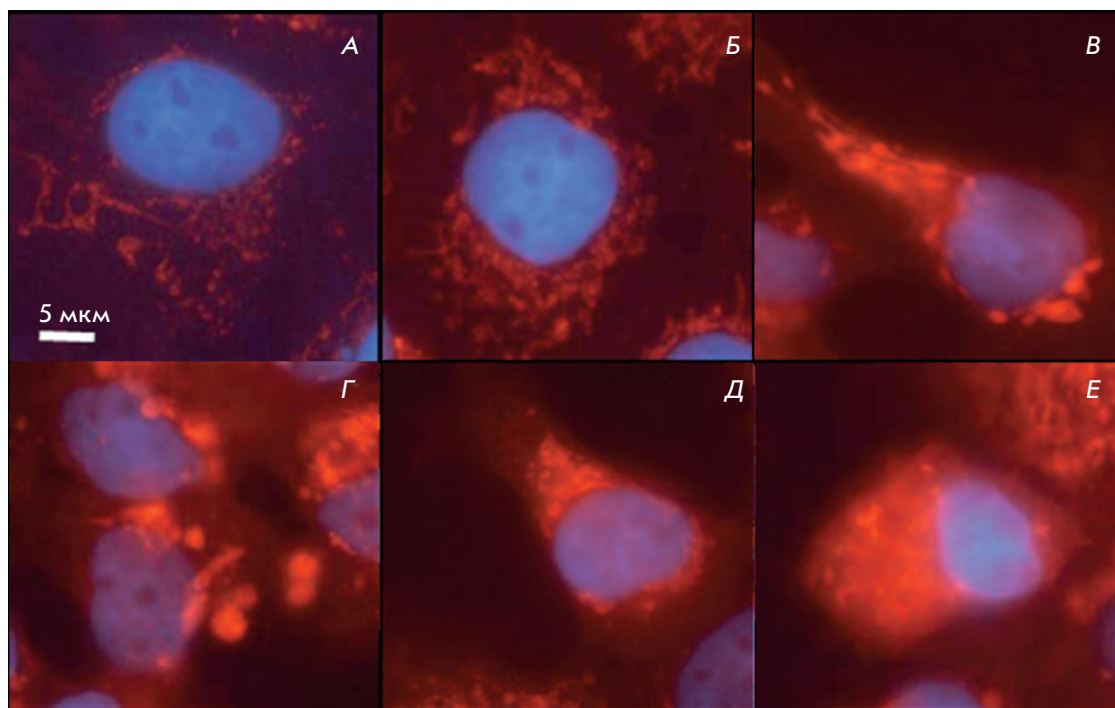


Рис. 3. Митохондрии в клетках А431, окрашенные Mitotracker Orange. А – контроль; Б – контроль с добавлением спирта; В, Г – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.

Рис. 4. Иммуноцитохимическое выявление цитохрома с в клетках А431. А, Б – контроль; В–Е – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.



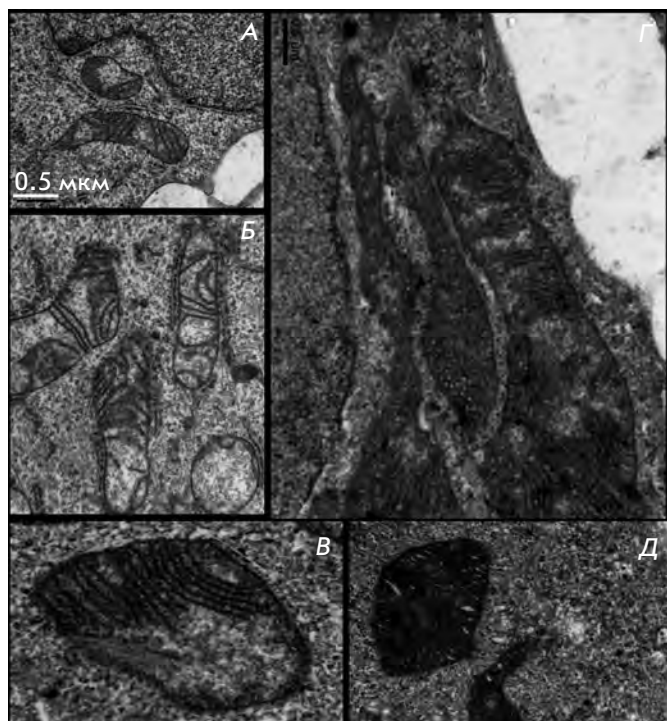


Рис. 5. Ультраструктура митохондрий в клетках А431. А – Контроль; Б – контроль с добавлением спирта; В–Д – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.

ка, митохондрии в которой увеличены в размерах и приобрели округлую и овальную форму. При этом цитоплазма остается практически неокрашенной. На рис. 4Д представлена клетка, митохондрии в которой сходны по размеру с митохондриями контрольных клеток. Однако, в отличие от последних, они имеют вид коротких овальных телец. На рис. 4Е виден выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль. Следует отметить, что отдельные митохондрии содержат цитохром с.

При ультраструктурном исследовании клеток эпидермоидной карциномы обнаруживаются небольшие митохондрии со светлым матриксом и сравнительно немногочисленными тонкими кристами (рис. 5А,Б). При воздействии СВЕ митохондрии претерпевают значительные изменения (рис. 5В–Д). На срезах могут встречаться гигантские митохондрии с большим количеством крист, митохондрии с инвагинациями, отдельные участки которых заполнены многочисленными кристами (рис. 5Г). В некоторых митохондриях матрикс уплотнен, а кристы расширены (рис. 5Д). Встречаются также митохондрии, ультраструктура которых практически такая же, как у митохондрий контрольных клеток. Интересно отметить, что митохондрии с различной

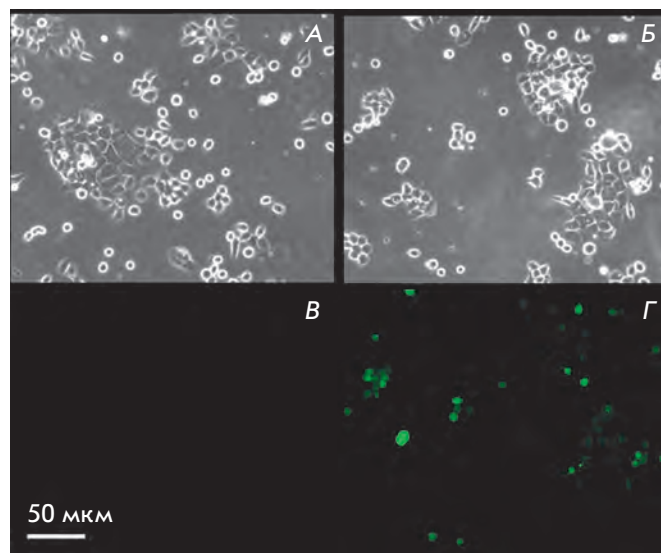


Рис. 6. Прижизненное выявление пероксида водорода в клетках А431. А, В – Контроль; Б, Г – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.

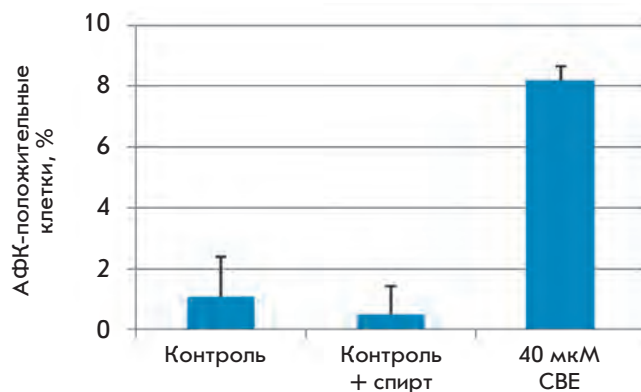


Рис. 7. Прижизненное выявление пероксида водорода в клетках А431. Доля окрашенных клеток в контроле и при воздействии 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч.

ультраструктурой могут встречаться в цитоплазме одной и той же клетки. Возможно, гетерогенность популяции митохондрий отражает различные стадии изменений, происходящих с ними при воздействии СВЕ.

**СВЕ повышает уровень АФК в клетках линии А431**  
 Гибель клеток может опосредоваться увеличением продукции АФК. В связи с этим проведено прижизненное окрашивание клеток красителем DCFH-DA,

что позволяет выявлять пероксид водорода. В контроле окрашивание выявляет одиночные флуоресцирующие клетки (рис. 6А,В), а добавление спирта видимых изменений не вызывает.

Воздействие 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч приводит к значительному усилению продукции АФК в клетках. Доля окрашенных клеток (рис. 7) как в контроле, так и при добавлении 96% этанола относительно невысока и составляет 0.08 и 0.49% соответственно. При этом под действием СВЕ доля клеток с избыточным содержанием АФК значительно повышается и составляет 8.18%.

Таким образом, в ходе данной работы показано, что СВЕ дозозависимо индуцирует апоптотическую гибель клеток в культуре эпидермоидной карциномы человека А431. Морфологически выявляются такие характерные для апоптоза признаки, как блеббинг, конденсация хроматина, фрагментация ядер и распад клетки на апоптотические тельца. Кроме того, апоптотический путь гибели подтверждается тем, что клетки окрашиваются антителами к активной форме каспазы-3. При этом таких признаков некроза, как набухание клетки, не обнаружено. Имеются данные о том, что СВЕ вызывает апоптотическую гибель злокачественных клеток желудка [22], толстого кишечника [10], молочной железы [23, 16], предстательной железы [17], легкого [24], шейки матки, яичника [25], клеток гепатомы [26], остеосаркомы [12, 13], мезотелиомы [27, 28], Т-клеточной лимфомы Jurkat [8, 18, 29] и других злокачественных линий кровяных клеток [8, 19], меланомы и глиомы мыши и нейробластомы крысы и человека [30, 31]. Показано, что апоптоз вызывается микромолярными концентрациями СВЕ, причем эффект зависит от концентрации и продолжительности инкубации [8, 18, 32–35]. Нами показано, что индукция апоптоза в клетках эпидермоидной карциномы человека также является дозозависимой.

В отличие от  $\alpha$ -токоферола, известного своими антиоксидантными свойствами, СВЕ является редокс-неактивным соединением и не обладает антиоксидантными свойствами [35]. Напротив, как показано нами и другими авторами [21], в опухолевых клетках СВЕ способен действовать как прооксидант, усиливая генерацию кислородных радикалов.

Большое количество исследований указывает на то, что главной мишенью действия СВЕ на опухолевые клетки служат митохондрии [18, 19, 35–38]. Нами выявлено значительное изменение ультраструктуры митохондрий, а также выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль клеток линии А431. Можно предположить, что усиление продукции АФК и выход цитохрома с представляют собой связанные

процессы. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что СВЕ способен значительно повышать генерацию АФК в различных линиях клеток, таких, как клетки опухолей молочной железы человека и мыши, Т-клеточной лимфомы Jurkat, фибробласты легкого китайского хомячка, клетки злокачественной мезотелиомы, рака головы и шеи человека [27, 36–40]. В большинстве работ указывается, что ведущая роль в апоптозе, следующем за гиперпродукцией АФК, принадлежит супероксидному анион-радикалу, но Gu et al. [40] показали, что в клетках эпидермоидной карциномы преобладает пероксид водорода, а количество супероксида незначительно. В данной работе выявлено также значительное увеличение доли клеток, в которых наблюдается гипергенерация АФК. Краситель DCFH-DA способен взаимодействовать с пероксидом водорода, следовательно, в нашей работе выявлено образование пероксида водорода. Поскольку в клетках пероксид образуется из супероксидного анион-радикала, по всей вероятности, первичной формой кислородных радикалов служит именно  $O_2^{\cdot -}$ .

Основное место образования АФК внутри клетки – митохондрии, где свободные радикалы генерируются благодаря работе цепи переноса электронов. Показано, что СВЕ способен подавлять активность комплексов I [41] и II дыхательной цепи митохондрий. Ингибирование комплекса II под действием СВЕ наблюдали в клетках рака молочной железы, клетках Jurkat, тимоцитах крысы [36, 42, 43]. Есть данные о том, что активность комплекса II снижается благодаря тому, что СВЕ служит псевдосубстратом для СДГ, связываясь с  $Q_p$ - и  $Q_D$ -сайтами ферментного комплекса. Таким образом, ингибирование носит конкурентный характер. При замещении убихинона на СВЕ в сайте связывания убихинона электроны не транспортируются по гидрофильной части СДГ на FAD, [Fe-S]-центры, гем и убихинон. Вместо этого они рекомбинируют с молекулярным кислородом, образуя супероксидный анион-радикал, накопление которого, в конечном счете, может приводить к апоптозу опухолевых клеток [38].

Известно, что усиление генерации АФК может запускать развитие апоптоза по митохондриальному пути. АФК способны опосредовать формирование дисульфидных мостиков между мономерами Вах в цитозоле, что приводит к образованию каналов во внешней митохондриальной мембране [42], а также разрушать связь цитохрома с с кардиолипином, мембранным фосфолипидом митохондрий, вызывая его гидропероксидацию [43, 44]. АФК, образующиеся при культивировании клеток в присутствии СВЕ, могут вызывать диссоциацию цитохрома с от кардио-

липина и выход белка в цитозоль, где цитохром с запускает активацию каспаз.

Отметим, что цитохром с выходит не одновременно из всех митохондрий. Даже в тех клетках, где цитоплазма достаточно сильно окрашена антителами к цитохрому с, сохраняется несколько митохондрий, содержащих цитохром с. При этом такие митохондрии, как правило, сильно увеличены в размерах и имеют овальную или округлую форму. Такие же крупные митохондрии выявляются при окрашивании клеток потенциал-зависимым красителем Mitotracker Orange. Поскольку для выхода цитохрома с необходимо нарушение проницаемости митохондриальной мембраны, выход должен сопровождаться потерей мембранного потенциала. Таким образом, нами показано, что при воздействии СВЕ в клетках могут сохраняться митохондрии, содержащие цитохром с и обладающие мембранным потенциалом, т.е. митохондрии, участвующие в синтезе АТФ, продукция которого необходима даже на поздних этапах апоптоза, являющегося энергозависимым процессом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что митохондрии являются важной мишенью действия СВЕ на культуру клеток эпидермоидной карциномы А431. Обнаружено, что под действием СВЕ изменяется форма митохондрий и их ультраструктура, усиливается продукция АФК и выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль, что приводит к запуску каспазозависимого апоптоза. Полученные результаты позволяют предложить следующий механизм индукции клеточной гибели под действием СВЕ.  $\alpha$ -Токоферилсукцинат ингибирует действие комплекса II дыхательной цепи, в результате чего транспорт электронов нарушается, и усиливается образование АФК. АФК, в свою очередь, накапливаются в клетке и повреждают митохондрии, что приводит к выходу цитохрома с в цитозоль и запуску программы апоптотической каспазозависимой гибели клетки. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Российского фонда фундаментальных  
исследований (проект № 11-04-01518-а).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Prasad K.N., Edwards-Prasad J. // J. Am. Coll. Nutr. 1992. V. 11. P. 487–500.
- Kelloff G.J., Crowell J.A., Boone C.W., Steele V.E., Lubet R.A., Greenwald P., Alberts D.S., Covey J.M., Doody L.A., Knapp G.G., et al. // J. Cell Biochem. Suppl. 1994. V. 20. P. 282–299.
- Theriault R.L., Lipton A., Hortobagyi G.N., Leff R., Gluck S., Stewart J.F., Costello S., Kennedy I., Simeone J., Seaman J.J., et al. // J. Clin. Oncol. 1999. V. 17. P. 846–854.
- Fariss M.W., Fortuna M.B., Everett C.K., Smith J.D., Trent D.F., Djuric Z. // Cancer Res. 1994. V. 54. P. 3346–3351.
- Kline K., Yu W., Sanders B.G. // Mol. Carcinog. 1998. V. 22. № 4. P. 247–257.
- Kline K., Yu W., Sanders B.G. // J. Nutr. 2001. V. 131. P. 161–163.
- Malafa M.P., Neitzel L.T. // J. Surg. Res. 2000. V. 93. P. 163–170.
- Neuzil J., Weber T., Gellert N., Weber C. // Br. J. Cancer. 2001. V. 84. P. 87–89.
- Malafa M.P., Fokum F.D., Smith L., Louis A. // Ann. Surg. Oncol. 2002. V. 9. P. 1023–1032.
- Weber T., Lu M., Andera L., Zhao Y. // World J. Gastroenterol. 2001. V. 7. P. 83–87.
- Alleva R., Benassi M.S., Pazzaglia L., Tomasetti M., Gellert N., Borghi B., Neuzil J., Picci P. // Cancer Lett. 2006. V. 232. № 2. P. 226–235.
- Alleva R., Benassi M.S., Tomasetti M., Gellert N., Ponticelli F., Borghi B., Picci P., Neuzil J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 331. № 4. P. 1515–1521.
- Yu W., Sanders B.G., Kline K. // Nutr. Cancer. 2002. V. 43. № 2. P. 227–236.
- Dong L.-F., Swettenham E., Eliasson J., Wang X.-F., Gold M., Medunic Y., Stantic M., Low P., Prochazka L., Witting P.K., et al. // Cancer Res. 2007. V. 67. P. 11906–11913.
- Singh V.K., Brown S.D., Kao T.-C. // Int. J. Rad. Biol. 2010. V. 86. № 1. P. 12–21.
- Prochazka L., Dong L.F., Valis K., Freeman R., Ralph S.J., Turanek J., Neuzil J. // Apoptosis. 2010. V. 15. № 7. P. 782–794.
- Shiau C.W., Huang J.W., Wang D.S., Weng J.R., Yang C.C., Lin C.H., Li C., Chen C.S. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 17. P. 11819–11825.
- Neuzil J., Svensson I., Weber T., Weber C., Brunk U.T. // FEBS Lett. 1999. V. 445. № 2–3. P. 295–300.
- Yamamoto S., Tamai H., Ishisaka R., Kanno T., Arita K., Kobuchi H., Utsumi K. // Free Radic. Res. 2000. V. 33. № 4. P. 407–418.
- Yu W., Heim K., Qian M., Simmons-Menchaca M., Sanders B.G., Kline K. // Nutr. Cancer. 1997. V. 27. P. 267–278.
- Gogvadze V., Norberg E., Orrenius S., Zhivotovskiy B. // Int. J. Cancer. 2010. V. 127. № 8. P. 1823–1832.
- Zhao Y., Zhao X., Yang B., Neuzil J., Wu K. // Cancer Lett. 2007. V. 247. № 2. P. 345–352.
- Charpentier A., Groves S., Simmons-Menchaca M., Turley J., Zhao B., Sanders B.G., Kline K. // Nutr. Cancer. 1993. V. 19. P. 225–239.
- Lim S.J., Choi M.K., Kim M.J., Kim J.K. // Exp. Mol. Med. 2009. V. 41. № 10. P. 737–745.
- Anderson K., Simmons-Menchaca M., Lawson K.A., Atkinson J., Sanders B.G., Kline K. // Cancer Res. 2004. V. 64. № 12. P. 4263–4269.
- Min J., Guo J., Zhao F., Cai D. // Wei Sheng Yan Jiu. 2003. V. 32. № 4. P. 343–345.
- Stapelberg M., Gellert N., Swettenham E., Tomasetti M., Witting P.K., Procopio A., Neuzil J. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 27. P. 25369–25376.
- Stapelberg M., Tomasetti M., Alleva R., Gellert N., Procopio A., Neuzil J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 318. № 3. P. 636–641.
- Neuzil J., Zhao M., Ostermann G., Sticha M., Gellert N., Weber C., Eaton J.W., Brunk U.T. // Biochem. J. 2002. V. 362. P. 709–715.

30. Rama B.N., Prasad K.N. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1983. V. 174. № 2. P. 302–307.
31. Swettenham E., Witting P.K., Salvatore B.A., Neuzil J. // *J. Neurochem.* 2005. V. 94. № 5. P. 1448–1456.
32. Wu K., Zhao Y., Liu B.H., Li Y., Liu F., Guo J., Yu W.P. // *World J. Gastroenterol.* 2002. V. 8. № 1. P. 26–30.
33. Zu K., Hawthorn L., Ip C. // *Mol. Cancer Ther.* 2005. V. 4. № 1. P. 43–50.
34. Bellezza J., Tucci A., Galli F., Grottelli S., Mierla A.L., Pololli F., Minelli A. // *J. Nutr. Biochem.* 2012. (Epub. ahead of print.)
35. Neuzil J., Tomasetti M., Zhao Y., Dong L.F., Birringer M., Wang X.F., Low P., Wu K., Salvatore B.A., Ralph S.J. // *Mol. Pharmacol.* 2007. V. 71. № 5. P. 1185–1199.
36. Wang X.F., Witting P.K., Salvatore B.A., Neuzil J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 326. № 2. P. 282–289.
37. Petrova G.V. // *Ukr. Biokhim. Zh.* 2006. V. 78. № 4. P. 104–111.
38. Dong L.F., Low P., Dyason J.C., Wang X.F., Prochazka L., Witting P.K., Freeman R., Swettenham E., Valis K., Liu J., et al. // *Oncogene.* 2008. V. 27. № 31. P. 4324–4335.
39. Kang Y.H., Lee E., Choi M.K., Ku J.L., Kim S.H., Park Y.G., Lim S.J. // *Int. J. Cancer.* 2004. V. 112. № 3. P. 385–392.
40. Gu X., Song X., Dong Y., Cai H., Walters E., Zhang R., Pang X., Xie T., Guo Y., Sridhar R., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. № 6. P. 1840–1848.
41. Dos Santos G.A., Abreu E., Lima R.S., Pestana C.R., Lima A.S., Scheucher P.S., Thomé C.H., Gimenes-Teixeira H.L., Santana-Lemos B.A., Lucena-Araujo A.R., et al. // *Leukemia.* 2012. V. 26. № 3. P. 451–460.
42. Neuzil J., Wang X.F., Dong L.F., Low P., Ralph S.J. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. № 22. P. 5125–5129.
43. Dong L.F., Freeman R., Liu J., Zabalova R., Marin-Hernandez A., Stantic M., Rohlena J., Valis K., Rodriguez-Enriquez S., Butcher B., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. № 5. P. 1593–1600.
44. D'Alessio M., De Nicola M., Coppola S., Gualandi G., Pugliese L., Cerella C., Cristofanon S., Civitavecchia P., Ciriolo M.R., Bergamaschi A., et al. // *FASEB J.* 2005. V. 19. № 11. P. 1504–1506.

УДК 575.1:616.15

# Экспрессия генов при пролиферации и дифференцировке гемопоэтических клеток с Ph-хромосомой *ex vivo*

Н. И. Гринева\*, Е. А. Духовенская, А. М. Тимофеев, Т. В. Ахлынина, Л. П. Герасимова, Т. Е. Манакова, Т. В. Боровкова, Д. А. Шмаров, Т. Г. Сарычева, Н. М. Найденова, А. Р. Гавричкова, Л. Ю. Колосова, Т. И. Колошейнова, Л. Г. Ковалева  
Гематологический научный центр Минздравсоцразвития Российской Федерации, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4  
\*E-mail: nigrin27@mail.ru  
Поступила в редакцию 29.08.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Гены *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *bax*, *gapdh* вовлечены в регуляцию пролиферации, дифференцировки, апоптоза и клеточного цикла *ex vivo* клеток хронического миелолейкоза, содержащих Ph-хромосому и онкоген *bcr/abl*. Экспрессия этих генов коррелирует с регуляцией чередованием этапов пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток трех основных типов, встречающихся при хроническом миелолейкозе. Гены *p53*, *p21*, *mdm2* и *gapdh* сверхэкспрессируются в активно пролиферирующих миелоидных клетках в фазах S и G2/M клеточного цикла и при совпадении этих фаз с этапом пролиферации. Экспрессия этих генов заметно снижается при чередовании пролиферации и созревания, а также на этапах созревания со значительным накоплением нейтрофилов, особенно при многократных чередованиях этапов. В ходе созревания нейтрофилов уровни экспрессии генов падают в ряду *gapdh* > *actin* > *c-myc*, *bcr/abl*, *p21* > *p53* > *bcl2* > *bax*. Уровни экспрессии этих генов в нейтрофилах ниже, чем в миелоцитах, и на порядок ниже, чем в клетках с длительным этапом пролиферации. Экспрессия онкогена *bcr/abl* при длительном созревании и накоплении нейтрофилов ингибируется, а на этапе пролиферации с накоплением миелоцитов возрастает в 2–3 раза. Минимальная экспрессия *bcr/abl* наблюдается при сверхэкспрессии *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-myc* и максимуме клеток в S- и G2/M-фазах. Сверхэкспрессия *bcr/abl* отмечена при низкой экспрессии генов *p53*, *p21*, *mdm2*. В Ph<sup>+</sup>-клетках при бластном кризе и в фазе акселерации хронического миелолейкоза с высокими индексами эффективности (P/D = 5–20) наблюдается сверхэкспрессия генов в ряду *bcr* > *gapdh* > *bcr/abl* и снижение экспрессии *p53*, *bcl2*, *mdm2*, *p21* << *gapdh*. Низкий контроль пролиферации и клеточного цикла генами-регуляторами способствует, очевидно, сверхэкспрессии гена *bcr/abl* и активному образованию *bcr/abl*<sup>+</sup>-клеток. Апоптоз в Ph<sup>+</sup>-клетках индуцируется при экспрессии генов *bax* > *bcl2*, *p53*, *p21*, *c-myc* и *gapdh*. На этапе созревания ингибируется апоптоз, накапливаются нейтрофилы и уменьшается экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** экспрессия генов, регуляция пролиферации и дифференцировки, клетки, содержащие Ph-хромосому, хронический миелолейкоз, ОТ-ПЦР, клеточный цикл, апоптоз.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** УЭГ – уровни экспрессии генов; ПДК – пролиферация и дифференцировка клеток; ХМЛ – хронический миелолейкоз; Ph – Филадельфийская хромосома; Ph<sup>+</sup>-клетки – гемопоэтические (кроветворные) клетки, содержащие Филадельфийскую хромосому; ПК – периферическая кровь; КМ – костный мозг; ЭТС – эмбриональная сыворотка теленка; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; нз – незрелые, делящиеся клетки; з – зрелые клетки, нейтрофилы.

## ВВЕДЕНИЕ

Хромосомные аномалии, транслокации, инверсии, делеции и многочисленные мутации приводят к развитию большинства лейкозов ([1–5] и ссылки там). В результате хромосомной транслокации t(9;22)(q34;q11), возникшей в гемопоэтической (кроветворной) полипотентной стволовой клетке, образуется Филадельфийская хромосома (Ph), которая приво-

дит к хроническому миелолейкозу (ХМЛ), острому и хроническому лимфолейкозам. В клетках с Ph-хромосомой (Ph<sup>+</sup>-клетках) в результате реципрокной транслокации 5'-фрагмента гена *bcr* и 3'-фрагмента гена *abl* образуется химерный онкоген *bcr/abl*, кодирующий активную тирозинкиназу p210/p185, которая участвует в патогенезе ХМЛ. Транслокация приводит к замещению нормальных гемопоэтических

клеток Ph<sup>+</sup>-клетками. В клеточные и молекулярные механизмы патогенеза ХМЛ вовлечены многие гены: *bcl2*, ряд генов *stat* и гены, регулирующие клеточный цикл и апоптоз [1–57].

Способность онкогена *bcr/abl* определять опухолевые свойства, повышать жизнеспособность, активировать пролиферацию и блокировать апоптоз в линиях Ph<sup>+</sup>-клеток изучалась детально [9–7, 42–57]. Обнаружено, что тирозинкиназа p210 *bcr/abl* может как подавлять апоптоз, так и не влиять на него. Данные о блокировании апоптоза при ХМЛ остаются противоречивыми [1–5, 42, 44, 45, 47 и наши неопубликованные данные]. Роль апоптоза при пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup>-клеток ранее не изучали. Наши последние исследования показывают, что апоптоз зависит от этапов пролиферации и созревания, а также от типа Ph<sup>+</sup>-клеток, выделяемых из костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) при ХМЛ [Гринева и др., неопубликованные данные].

Пролиферация и дифференцировка *ex vivo* трех основных типов Ph<sup>+</sup>-клеток регулируется при чередовании этапов пролиферации этих клеток (этап 1) и созревания нейтрофилов (этап 2). На этапе 1 скорость пролиферации превышает скорость созревания. На этапе 2, напротив, выше скорость созревания. Чередование этапов и их скоростей поддерживает эффективность пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток на оптимальном уровне [1–4] и определяет волновой характер регуляции этих процессов.

Цель нашей работы состояла в выяснении роли экспрессии генов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку, апоптоз и клеточный цикл нормальных гемопоэтических клеток, в регуляции этих процессов в Ph<sup>+</sup>-клетках. Мы изучали кинетику экспрессии генов *p53*, *c-myc*, *bcr/abl*, *mdm2*, *p21*, *bcl2*, *bax*, *bcr*, а также генов *gapdh* и *actin* в качестве контрольных, и сопоставляли ряды кинетических кривых и закономерности *ex vivo* пролиферации, дифференцировки, апоптоза и распределения в фазах клеточного цикла Ph<sup>+</sup>-клеток, полученных от больных ХМЛ.

Ph<sup>+</sup>-клетки ХМЛ, состоящие на 90% из гранулоцитов, примечательны способностью совершать полный цикл пролиферации и дифференцировки подобно нормальным миелоидным клеткам, которых в пуле кроветворных клеток на порядок меньше. Это облегчает изучение закономерностей регуляции пролиферации и дифференцировки и их экстраполяцию на нормальные гемопоэтические клетки.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованные материалы: гепарин («Flow», Англия); Limphoprep, среда α-МЕМ («MP Biomedical»,

США); DEPC, HEPES, Трис, эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), цитрат Na, лаурилсаркозил («ICN», США); краситель трипановый синий, L-глутамин и 2-меркаптоэтанол («Serva», Германия); Триреагент, гуанидинтиоцианат («Sigma», США); RQ1 ДНКазы, свободная от РНКаз, РНКазин, dNTP, бычий сывороточный альбумин (BSA), Taq-полимераза, буфер для обратной транскрипции, обратная транскриптаза MuMLV («Promega», США); пенициллин и стрептомицин (ОАО «Биохимик», Саранск, Россия); PBS (10 мМ фосфатный буфер + 0.13 М NaCl + 2.7 мМ KCl, pH 7.4) таблетированный (НПО «Эко-сервис», Россия).

Олигонуклеотидные праймеры (таблица) синтезированы и очищены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) или HPLC фирмой «Синтол» (Москва).

Исследовали Ph<sup>+</sup>-моноклеары, выделенные из ПК и КМ больных ХМЛ в хронической фазе до и в процессе лечения, в фазе акселерации и бластного криза. При ХМЛ моноклеары представлены в основном лейкоцитами и гранулоцитами, поэтому именно эти клетки здесь изучались. Характеристики Ph<sup>+</sup>-клеток и больных ХМЛ, из ПК и КМ которых выделены моноклеары, приведены в [2–5]. Типы мРНК *bcr/abl*: b3a2, b2a2 или e1a2 в Ph<sup>+</sup>-клетках определены с помощью ОТ-ПЦР [2, 5].

Методы выделения моноклеаров, анализа пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток описаны ранее [1–6]. Суспензию (0.8–1.2) × 10<sup>6</sup> клеток/мл в среде α-МЕМ, содержащей 10–20% ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 10<sup>-4</sup> М 2-меркаптоэтанола, 100 ед./мл пенициллина и 50 ед./мл стрептомицина, 25 мМ HEPES-NaOH pH 7.2–7.4, культивировали в строго одинаковых условиях, и отбирали пробы для анализа.

Степень апоптоза и распределение культивируемых Ph<sup>+</sup>-клеток по фазам клеточного цикла анализировали цитофлуориметрически [1–4] в гранулоцитарном гейте с помощью проточного флуориметра EPICS-XL. Пробы Ph<sup>+</sup>-клеток (по 5000 клеток), выделенные из КМ и ПК в градиенте плотности фикола, и пробы, отобранные в процессе культивирования, центрифугировали в течение 7 мин при 600 g и 4°C, промывали PBS и по каплям фиксировали охлажденным 70% этанолом в течение 30 мин при 4°C. Перед измерением взвесь клеток промывали PBS, центрифугировали и инкубировали осадок в 0.5 мл PBS, содержащего пропидий йодид (5 мкг/мл) и РНКазу А (50 мкг/мл), в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Измерения проводили в проточном флуориметре EPICS-XL. Клетки гранулоцитарного гейта анализировали с помощью прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, одновременно ре-

гистрировали флуоресценцию пика FL2 по амплитуде и площади импульса (это позволяло «отсекать» слипшиеся клетки, конгломераты и обрывки клеток) в линейном и логарифмическом масштабе, определяли клетки, находящиеся в апоптозе. К клеткам, вошедшим в апоптоз, относили частицы FL2-Н с гиподиплоидным набором ДНК, которые формировали пик слева от пика клеток с диплоидным набором ДНК (уменьшение размера клеток не превышало двух порядков). Долю гранулоцитов, находящихся в апоптозе, анализировали в гранулоцитарном гейте, где отсутствуют обрывки клеток. Получали ДНК-гистограммы Ph<sup>+</sup>-клеток, в тех же пробах анализировали распределение по фазам клеточного цикла (S, G2/M) при помощи компьютерной программы (SFIT-метод) [7, 10].

Для выделения клеточной РНК использовали пробы, содержащие 10<sup>6</sup> клеток. Каждую пробу лизировали гуанидинизоцианатом согласно [11] с небольшими модификациями [5].

Обработку проб ДНКазой проводили согласно [5]. РНК, выделенную из пробы (10<sup>6</sup> клеток), отжигали с 50 нг смеси гексамеров в 8 мкл воды (70°C, 10 мин). кДНК синтезировали в течение 1 ч при 37°C в 25 мкл буферного раствора для обратной транскрипции («Promega»), содержащего по 2.5 мкМ каждого из dNTP, 20 ед. акт. РНКазина («Promega»), 20 ед. акт. обратной транскриптазы MuMLV («Promega»). Раствор кДНК хранили при -70°C и быстро использовали для проведения ПЦР.

Транскрипцию генов *p53*, *c-myc*, *bcr/abl*, *mdm2*, *p21*, *bcl2*, *bax*, *bcr* и контрольных генов *gapdh* и *actin* анализировали методом ОТ-ПЦР. ОТ-ПЦР проводили со специфическими праймерами на РНК, выделенной из каждой пробы (таблица), в один или два раунда.

ПЦР проводили в 25 мкл раствора, содержащего буфер для ПЦР (50 мМ Трис-НСl pH 8.9, 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мкМ EDTA, 0.14 мг/мл BSA), 2–5 мкл раствора кДНК, 200 мкМ каждого из dNTP, 2.5 ед. акт. Таq-полимеразы («Promega») и 75 нг каждого праймера (таблица). ПЦР (30 циклов) проводили по следующей схеме: денатурация – 1 мин, 94°C; отжиг – 1 мин, 56°C для 1-го и 60°C для 2-го раунда; синтез – 3 мин, 72°C. Отжиг проб кДНК генов *bcr*, *p53*, *mdm2* и *bcr/abl* проводили при 56°C для внешних праймеров и 60°C для внутренних (таблица). Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 6% ПААГ. Гели окрашивали бромидом этидия (1 мкг/мл). Интенсивность флуоресценции амплифицированных фрагментов в данное время (*Jt*) определяли компьютерной денситометрией с помощью программы «Scion Image», учитывая объемы проб для ОТ-ПЦР и электрофореза.

Об экспрессии генов судили по результатам ОТ-ПЦР, проведенной на суммарной РНК Ph<sup>+</sup>-клеток с праймерами, приведенными в таблице. Уровень экспрессии мРНК оценивали по интенсивности флуоресценции (*Jt*) полос, соответствующих продуктам амплификации кДНК. В качестве внутреннего стандарта использовали уровень экспрессии мРНК *gapdh* и/или *actin* в той же пробе.

Экспрессию изоформ мРНК *bax* [9] анализировали с использованием праймеров для амплификации продуктов альтернативного сплайсинга РНК интрона 1 (таблица), накопление ПЦР-фрагмента которого коррелирует с ожидаемой экспрессией *bax*, *bcl2* и других генов, а также с кинетикой апоптоза (рис. 1–9).

Кинетические кривые экспрессии генов, пролиферации, дифференцировки, апоптоза и распределения Ph<sup>+</sup>-клеток по фазам клеточного цикла представляли в полиномиальной аппроксимации. По изменению интенсивности флуоресценции (*Jt*) судили о положении пиков экспрессии РНК и их максимумов, по *Jt/Jgapdh* оценивали относительные уровни экспрессии мРНК. Это предполагает возможность сопоставления с результатами точечных измерений уровней экспрессии, широко применяемых в других исследованиях.

Для обработки кривых экспрессии генов, пролиферации и дифференцировки клеток применяли полиномиальную аппроксимацию шестой степени на том основании, что кривые имеют волнообразный характер с несколькими максимумами и минимумами и не подчиняются логарифмической и экспоненциальной зависимостям. При этом учитывали следующие возможности и ограничения полиномиальной аппроксимации. Оптимальное число обобщаемых данных равно степени аппроксимации минус единица. Аппроксимацию принимали достоверной на основании точности экспериментальных данных ± 10%, приведенной в работах [1–6] (R<sup>2</sup> ≥ 0.81–1). Превышение числа аппроксимируемых точек над показателем степени аппроксимации возможно на один-два пункта. Особое значение в характеристике кинетических кривых имеют точки первого периода роста (пять–восемь точек в наших опытах для отрезка времени 8–10 сут). Отбор проб через 1 сут при ПДК *ex vivo* соответствует ожидаемому времени развития клеточного цикла животных клеток *in vivo*, близкому к 1 сут. Пропуск одной-двух точек на вершине пика при известной кинетике (вычисляется и прогнозируется компьютерной программой по началу пика) позволяет построить кинетическую кривую в целом.

Для построения кинетических кривых пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-гранулоцитов и их субпопуляций: миелоидных клеток (бластов, про-



Олигонуклеотидные праймеры для ОТ-ПЦР

мРНК, мишень	Праймеры, последовательность 5' → 3', GenBank Acc.no		Фрагмент, п.н.
	Внешние, отжиг при 56°C, первый раунд	Внутренние, отжиг при 60°C, второй раунд	
<i>bcr/abl</i> <i>b3a2</i> , <i>b2a2</i>	TGGATGAACTGGAGGCAG NM_005157 (342–361 bp, 20b) TCA CAG GCG TGA TGT AGT T NM_007313 (835–854 bp, 20b) NM_004327 (2896–2913 bp, 22b) (90% гомология)	GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC NM_004327 (3227–3248 bp, 22b) GCTTCACACCATTCCTCCATT NM_007313 (3477–3496 bp, 20b) NM_005157 (289–308 bp, 20b)	378 b3a2, 303 b2a2
<i>bcr</i>	TGGATGAACTGGAGGCAG NM_004327 (2896–2913 bp, 22b) CAGTTTGGCTCAGCTGTGTCCC NM_004327 (3448–3469 bp, 22b)	GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC. NM_004327 (3227–3248 bp, 22b) CAGTGGCTGAGTGGACGATGA NM_004327 (3340–3360 bp, 21b)	134
<i>mdm2</i>	ATGTGCAATACCAACATGTC NM_002392 (297–317 bp, 20b) TAGGGGAAATAAGTTAGCAC NM_002392 (1470–1492 bp, 20b)	CAAGAACTCTCAGATGAAGATG NM_002392 (1092–1114 bp, 22b) TTGATGGCTGAGAATAGTCTTC NM_002392 (1470–1492 bp, 22b)	401
<i>p53</i>	ATTGGCAGCCAGACTGCCTT NM_000546 (219–238 bp, 20b) GGAACAAGAAGTGGAGAATG NM_000546 (1434–1453 bp, 20b)	AGCTACTCCCCTGCCCTCAA NM_000546 (624–643 bp, 20b) GTCTTCCAGTGTGATGATGG NM_000546 (1009–1028 bp, 20b)	405
<i>gapdh</i>	GCTTGTCAATGGAATC NM_002046 (300–319bp, 20b) CACGATACCAAAGTTGTCATG NM_002046 (595–615 bp, 21b)		316
<i>bcl2</i>		TGTGGAAGTGTACGGCCCCAGCATGC NM_000633 (1087–1113 bp, 27b) GCCTGCAGCTTTGTTTCATGGTACATC NM_000633 (1286–1312 bp, 27b)	226
<i>bax</i>		CATCAGGACTCAGTTGT NC_000019 (522–540 bp, 19b) CACTCCTCAAATCTGTGCCA NC_000019 (764–783 bp, 20b)	262
<i>p21</i>		GCCGGAGCTGGGCGCGGATT NM_07846(42–61 bp, 20b) GGCTTCCTCTTGGAAGAAGAT NM_07846 (707–726 bp, 20b)	685
<i>actin, beta</i> (АКТВ)		GCGGGAAATCGTGCGTGACATT M10277complete CDS (2280–2301 bp, 22b) GATGGAGGTTGAAGGTAGTTTCGTG M10277 complete CDS (2583–2606 bp, 24b)	327
<i>c-myc</i>	GAGGСТАТТСТГСССАТТТГ NM_002467 (440–459 bp, 20b) GGCAGCAGCTCGAАТТТСТТ NM_002467 (721–740 bp, 20b)		301

миелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов) использовали морфологический анализ. Состав клеток анализировали на мазках (в трех зонах каждого мазка по 100 клеток в каждой). Концентрацию субпопуляций клеток в пробах вычисляли по их содержанию на мазках в пересчете на  $10^6$  клеток/мл исходной суспензии [1–6].

Кинетические кривые индексов эффективности (P/D, соотношение скоростей пролиферации и созревания нейтрофилов) получали как соотношение накопления незрелых, пролиферирующих клеток, P (бласты, промиелоциты, миелоциты), и накопления созревающих без деления нейтрофилов, зрелых клеток, D (метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы) согласно [1–4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Кинетические кривые уровней экспрессии генов (УЭГ) *p53*, *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *mdm2*, *bcl2*, *bax*, *bcrl*, участвующих в регуляции клеточного цикла [14, 24, 28, 45–48, 52, 58, 59], апоптоза [3, 14, 16–22, 28, 42, 47, 49, 50, 56, 58, 60], пролиферации и дифференцировки получали при культивировании Ph<sup>+</sup>-клеток (моноклеаров), состоящих на 95% из миелоидных Ph<sup>+</sup>-клеток, т.е. при миелопоэзе, изменяющемся при ХМЛ [1–3, 24, 26–28, 42, 43, 46, 48, 51–54, 57–68].

Кинетические кривые экспрессии генов *c-myc*, *p53*, *bcr/abl*, *mdm2*, *p21*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin*, *bcrl* сопоставили с кинетическими кривыми регуляции пролиферации и дифференцировки миелоидных Ph<sup>+</sup>-клеток трех основных типов, их апоптоза и распределения в фазах клеточного цикла. Кривые УЭГ и ПДК получены из одной пробы для каждой точки.

Уровни экспрессии мРНК оценивали по интенсивности флуоресценции (*Jt*) соответствующих продуктов ОТ-ПЦР исследуемых генов. Гены *gapdh* и *actin* использовали в качестве контрольных. По величине *Jt* определяли изменения экспрессии генов и положение ее пиков. По величине *Jt/Jgapdh* судили о соотношении экспрессии генов, но положение пиков, их максимумов и минимумов заметно изменяются вследствие изменений в экспрессии *gapdh*. Ранее изменения в уровне экспрессии *gapdh* наблюдали и другие исследователи [55, 56].

Кинетические кривые экспрессии генов сопоставляли с закономерностями пролиферации и дифференцировки субпопуляций гранулоцитов, апоптоза и распределения Ph<sup>+</sup>-клеток в фазах клеточного цикла при чередовании этапов пролиферации и созревания, регулирующих эффективность этих процессов (индекс P/D) [1–4] и представленных в полиномиальной аппроксимации. Закономерности регуляции пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток изучены ранее [1–6], но здесь они рассмотрены в полиномиальной аппроксимации, так как не подчиняются логарифмической и экспоненциальной зависимости, и кинетические кривые этих закономерностей имеют несколько максимумов и минимумов (рис. 1–9).

Закономерности распределения клеток по фазам клеточного цикла, уровень апоптоза и индексы эффективности P/D, согласно [1–4], различаются у Ph<sup>+</sup>-клеток трех типов, полученных от больных ХМЛ. Типы клеток, их пролиферация и дифференцировка различаются последовательностью чередования этих этапов, их числом и длительностью. Предположение, что экспрессия генов отражает особенности регуляции пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток трех типов, их апоптоза и распределения в фазах клеточного цикла, находит подтверждение в данной работе.

## Экспрессия генов при пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup>-клеток типа 1

Ph<sup>+</sup>-клетки типа 1 характеризуются продолжительным этапом пролиферации (этап 1), скорость которого выше скорости созревания, концентрация незрелых клеток длительно превышает концентрацию зрелых клеток, а индекс P/D<sup>1</sup> ≥ 1–20. Эти клетки отличаются повышенным накоплением миелоцитов, промиелоцитов, бластов при низком накоплении созревающих без деления нейтрофилов и их активном апоптозе [1–3].

На рис. 1А–З представлены кинетические кривые экспрессии генов, пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток типа 1 из КМ и ПК больных ХМЛ с умеренным пролиферативным потенциалом и индексом P/D = 1–5. Видно, что пики с максимальной и минимальной экспрессией генов в клетках КМ группируются в трех зонах. По величине пиков экспрессию генов в этих зонах можно подразделить на активную и умеренно активную. Активная экспрессия генов *bcl2* и *bax* видна в первой зоне (на 1–2 сут). Во второй зоне в интервале 2–7 сут виден широкий пик сверхэкспрессии *p53*, *mdm2* и *p21* с максимумом на 3–5 сут (рис. 1А,Б, клетки КМ). Максимальная экспрессия генов *p21*, *mdm2*, *p53*, *actin*, *gapdh*, *c-myc* снижается в разной степени в том же ряду, достигая своего минимума на 8–9 сут. В 2-й зоне менее активно экспрессируются гены *c-myc*, *bcr/abl*, *gapdh*, *actin*, *bcrl*. Все гены, кроме *bcr/abl*, имеют два минимума экспрессии – на 1–2 и 8–9 сут. В Ph<sup>+</sup>-клетках из ПК гены *p53*, *p21*, *mdm2*, *c-myc*, *bax*, *bcl2* сверхэкспрессируются сходным образом, но пики экспрессии *p21*, *mdm2*, *c-myc* и *gapdh* заметно уже (рис. 1Д,Е).

При пролиферации и дифференцировке клеток сверхэкспрессия генов *p21*, *mdm2* и *p53* достигает своего максимума в соответствии с распределением клеток в фазах S и G2/M, т.е. происходит в активно пролиферирующих миелоидных клетках-предшественниках. К концу цикла пролиферации и дифференцировки с гибелью клеток на 6–7 сут (рис. 1В,Ж) экспрессия этих генов несколько снижается, а затем вновь возрастает на 7–8 сут. Экспрессия генов *c-myc*, *bcr/abl* и *gapdh* при этом становится более умеренной. При этом концентрация пролиферирующих – незрелых – клеток значительно больше концентрации нейтрофилов (зрелых). На всем протяжении пролиферации и дифференцировки скорость накопления пролиферирующих клеток превышает скорость накопления созревающих нейтрофилов, и все клетки имеют общий максимум экспрессии генов при высоком содержании незрелых клеток и весьма низком – нейтрофилов.

Активная экспрессия генов *p53*, *mdm2*, *p21* (в меньшей степени *c-myc*) коррелирует с изменени-

ями концентрации клеток, регуляцией цикла, а также с изменениями апоптоза клеток на 3–4 и 7–10 сут (рис. 1А–3). Сверхэкспрессию *p21*, *p53*, *mdm2*, умеренную и низкую экспрессию остальных генов (*actin*, *c-myc*, *gapdh*, *bcr* и *bcr/abl*) в Ph<sup>+</sup>-клетках из КМ следует отнести к экспрессии генов клеток пролиферативного пула, которые активно накапливаются в G1- и S-фазах клеточного цикла на 3–4 сут. За это время, по-видимому, протекает G1-фаза с синтезом циклинов и киназ, формированием их ансамблей и фосфорилированием белка Rb, что происходит с участием *p21* и белков, отвечающих за прохождение контрольных точек G1/S-перехода [23, 24, 58, 64, 67–71]. Наблюдаемая при этом сверхэкспрессия *p53* означает, что *p53* выполняет свои функции в полном объеме: регулирует транскрипцию, клеточный цикл и его контрольные точки, дифференцировку и апоптоз [10–16].

Максимальный апоптоз клеток из костного мозга наблюдается на 4 сут (~30%), а далее лишь немного уменьшается. Минимальный апоптоз выявляется на 1 сут после быстрого уменьшения его доли вначале. В клетках из периферической крови апоптоз более интенсивен – с двумя максимумами УЭГ на 1 и 5–6 сут и с минимумом на 2–3 сут (рис. 1,3), что не согласуется с УЭГ *bcl2* и *bax*, отвечающих за апоптоз [13, 14, 16–22]. Экспрессия *bcl2*, *bax* в клетках КМ характеризуется двумя пиками с максимумами на 2 сут и минимумом на 4–5 сут, что не соответствует максимумам апоптоза в клетках из КМ и ПК (рис. 1Г,3). Стимулировать апоптоз, как известно, могут также активно экспрессирующиеся гены *p21*, *p53*, *gapdh*, *c-myc* [10–28, 32, 34, 49–51, 55, 56, 67–69]. Белок *p21* является ингибитором циклин-зависимых киназ и медиатором ряда функций *p53*. Экспрессия *p21* отвечает за задержку роста клеток в фазе G1, регуляцию клеточного цикла и апоптоз [23–28, 64, 67, 68, 71]. Если при сверхэкспрессии *p21* рост клеток в фазе G1 не задерживается, то дополнительные молекулы *p21* индуцируют апоптоз и/или терминацию дифференцировки [24, 64, 68]. Активация апоптоза в ответ на экспрессию *p21* происходит здесь на 4 сут при отсутствии в это время экспрессии *bcl2* и *bax* (рис. 1А–Г).

Уровень апоптоза в Ph<sup>+</sup>-клетках ПК во втором пике с максимумом на 5–6 сут существенно выше, чем в клетках из КМ (рис. 1Г,3). Сравнивая УЭГ (рис. 1), можно отметить сходство в характере экспрессии генов *p53*, *bcl2*, *bax* в клетках КМ и ПК, и более узкий пик экспрессии в клетках ПК. Однако в клетках КМ активация экспрессии генов *bax* > *bcl2* с максимумами на 5–6 сут отсутствует и не соответствует второму пику апоптоза, который наблюдается на 4 сут. Предполагается, что в регуляции этого

пика в клетках КМ участвует *p21*, который, согласно [28, 57, 60], регулирует апоптоз. В клетках ПК в это время сверхэкспрессируется также *gapdh* (максимум экспрессии на 4–6 сут). Экспрессия *gapdh* в Ph<sup>+</sup>-клетках КМ возрастает в несколько раз, как и апоптоз (рис. 1Г,3).

Сверхэкспрессия *mdm2* связана с функциями этого фактора транскрипции, модулирующего свойства многих генов и взаимодействующего с различными факторами роста и факторами транскрипции. Белки *mdm2* и *p53* взаимодействуют между собой и негативно регулируют экспрессию друг друга [29–36]. Сверхэкспрессия *mdm2* модулирует, вероятно, функции *p53* и *p21*, регулирует длительность S- и G2/М-фаз клеточного цикла и повышает пролиферативный потенциал Ph<sup>+</sup>-клеток при слабой экспрессии гена *bcr/abl*.

Супрессор опухолевого роста *p53*, активируемый при генотоксическом и клеточном стрессе, защищает нестабильные клетки с помощью экспрессии генов, инициирующих клеточный цикл с торможением пролиферации, арестом апоптоза и репарацией ДНК. При этом *p53* и *mdm2* взаимно активируют друг друга, одновременно стабилизируются и подвергаются деградации. Активация стрессом по механизму обратной связи ведет к активации *p53* и *mdm2* [31–36] и защите клеток от гибели. О взаимодействии *p53* и *mdm2* можно судить по совпадению их кинетических кривых (рис. 1А,Б,Д) с максимумом накопления клеток в S- и G2/М-фазах. Сверхэкспрессию *mdm2* можно связать с активацией отложенного перехода клеток в S- и G2/М-фазы клеточного цикла на 4–6 сут (рис. 1Г,3). Известно, что *mdm2* стимулирует неконтролируемый переход клеток в S-фазу [29]. Кроме того, сверхэкспрессия *mdm2*, непосредственно взаимодействующего с промоторами *p53* и *p21*, приводит к неконтролируемому выходу клеток в S-фазу и к их трансформации [24, 29–31, 67, 68, 71].

Известно, что пролиферация Ph<sup>+</sup>-клеток активируется экспрессией *bcr/abl* [43–48]. В данной работе Ph<sup>+</sup>-клетки из КМ и ПК характеризовались очень низкой экспрессией *bcr/abl*, существенно меньшей, чем *p53*, *mdm2*, *p21* и *c-myc*. Довольно низкие уровни экспрессии *bcr/abl* находятся в зоне максимальной экспрессии генов *p53*, *mdm2*, *p21* и даже *c-myc* на 3–10 сут, что соответствует значениям эффективности пролиферации и дифференцировки, невысоким для Ph<sup>+</sup>-клеток типа 1 (индексы P/D = 1.2–1.8–0.8). Экспрессия *bcr/abl* в клетках ПК несколько выше, чем в клетках КМ. В клетках из ПК отмечается максимум – на 5 сут и два минимума – на 1 и 9 сут. В клетках из КМ экспрессия *bcr/abl* медленно увеличивается к 4–10 сут. Эти различия не отражаются в индексах P/D, которые указывают на сопоставимые скорости

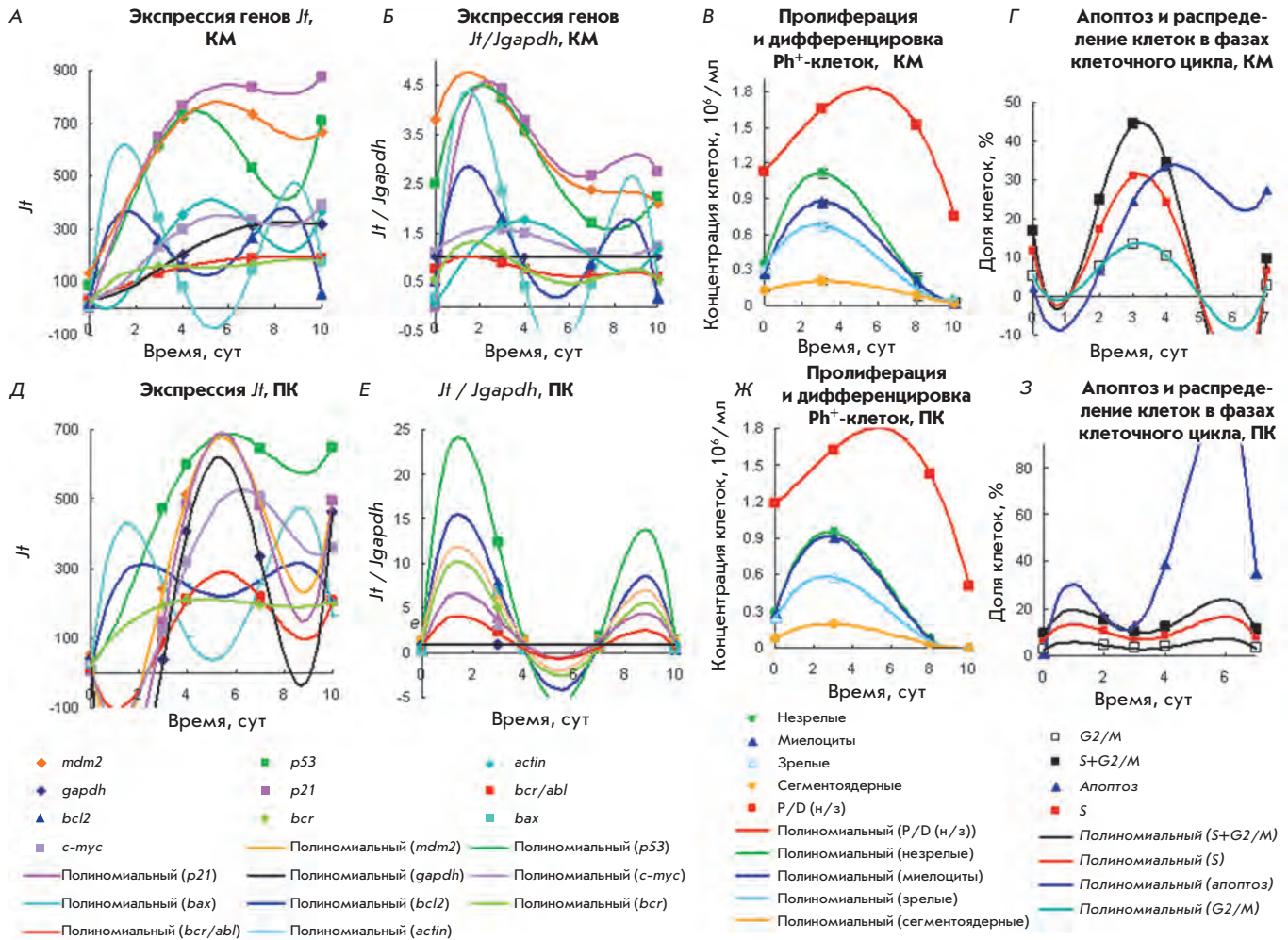


Рис. 1. Экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б, Д, Е) в  $Ph^+$ -клетках с умеренными пролиферативным потенциалом (индексами P/D) и длительностью пролиферации. Сравнение уровней экспрессии этих генов с кинетическими кривыми пролиферации и дифференцировки  $Ph^+$ -клеток (В, Ж), уровнем апоптоза и распределением клеток в фазах клеточного цикла (Г, З). Измерения кинетических кривых выполнены в каждой пробе из  $10^6$   $Ph^+$ -клеток, выделенных из костного мозга (КМ) (А–Г) и периферической крови (ПК) (Д–З). Уровни экспрессии генов (в условных единицах флуоресценции, *Jf*) (А, Д) определяли с использованием ОТ-ПЦР на суммарной РНК из  $10^6$  клеток и *Jf/Jgapdh* (Б, Е). Этап пролиферации, концентрация незрелых > зрелых ([нз] > [з]) и индекс P/D = 1.2–1.8 на 0–10 сут. Полиномиальная аппроксимация шестой степени.

пролиферации и созревания в клетках из КМ и ПК. По-видимому, низкую экспрессию *bcr/abl* при высоком содержании клеток в S- и G2/M-фазах можно объяснить подавлением *bcr/abl* при сверхэкспрессии генов *p53*, *p21*, *mdm2*, *c-myc* – основных регуляторов клеточного цикла [10–16, 23–28, 31–36, 51–54, 67, 68]. Экспрессия этих генов необходима также для пролиферации миелоидных клеток и терминации их дифференцировки. Возможно, снижение уровня экспрессии согласуется с понижением концентрации незрелых делящихся клеток.

Видно, что в  $Ph^+$ -клетках из ПК гены экспрессируются более узким пиком, чем в  $Ph^+$ -клетках из КМ (рис. 1Д–З). В клетках из ПК и КМ экспрессия *p53*, *bcl2*, *bax* начинается сразу и протекает сходным образом, достигая максимума на 2 и 9 сут (*bcl2*, *bax*) и на 5 сут (*p53*). В клетках из ПК гены *p21*, *mdm2*, *c-myc* экспрессируются с задержкой на 3 сут и с максимальным уровнем на 5–6 сут. Затем их экспрессия быстро снижается при более высоком пике апоптоза, чем в клетках из КМ (рис. 1Г,З). Видно, что максимум экспрессии генов *p21*, *p53*, *mdm2* и *c-myc*

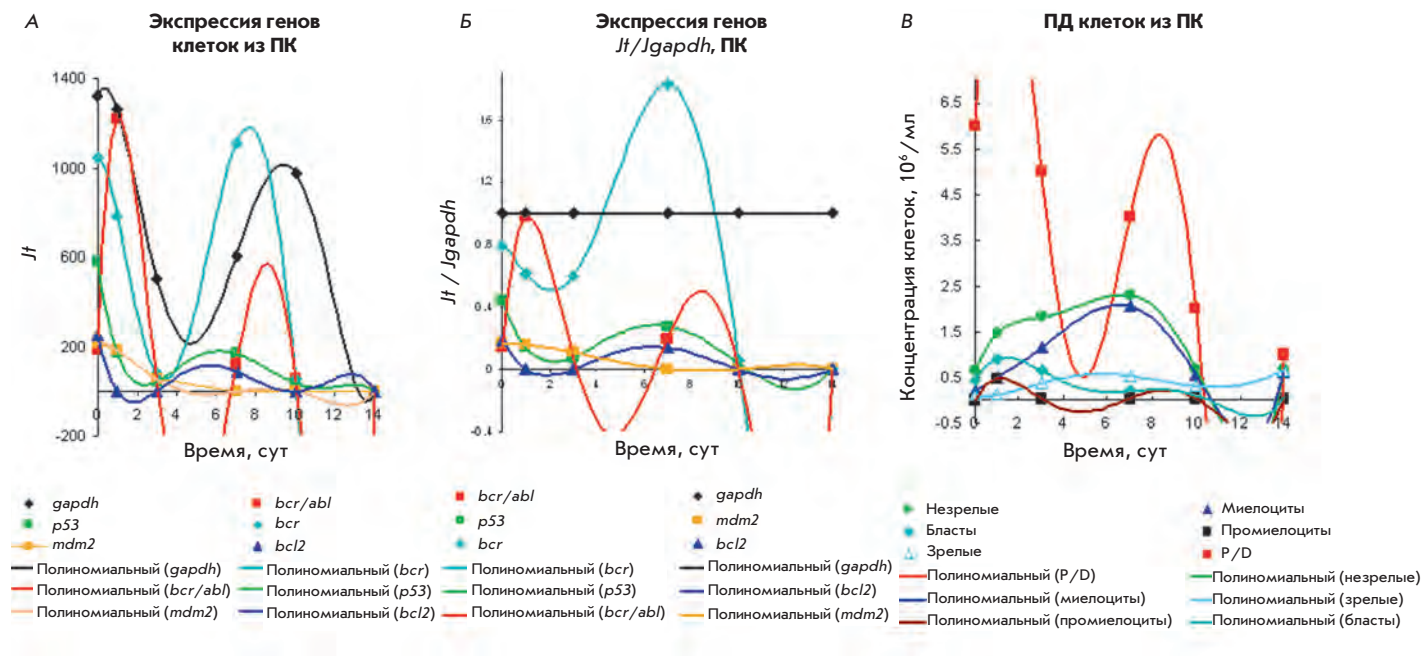


Рис. 2. Экспрессия генов в  $Ph^+$ -клетках ПК типа 1 с высоким пролиферативным потенциалом, длительной пролиферацией и индексом  $P/D = 5-12$ . Кинетические кривые уровней экспрессии генов (УЭГ) *p53*, *mdm2*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *gapdh* (А, Б), а также пролиферации и дифференцировки (В). Условия обработки проб как на рис. 1. Уровни экспрессии генов по ОТ-ПЦР *Jt* (А) и *Jt/Jgapdh* (Б). Продолжительность этапа пролиферации при  $[нз] > [з]$  равна 14 сут. Здесь и далее обозначения как на рис. 1.

по отдельности соответствует максимальному числу клеток из КМ и ПК в S- и G2/M-фазах (рис. 1Г,З). По-видимому, клетки из ПК синхронизированы в большей степени, чем клетки из КМ.

По соотношению  $Jt/Jgapdh$  (рис. 1Б) можно предположить, что экспрессия генов, связанных с пролиферацией клеток из КМ, падает в ряду:  $mdm2 \sim p21 \sim p53 > actin \sim c-myc > gapdh \sim bcr/abl \sim bcr$ . На максимуме пиков УЭГ в клетках КМ уменьшаются в 4.5 раза по сравнению с *gapdh*. В клетках из ПК сверхэкспрессия *gapdh* сочетается с резким снижением уровней экспрессии других генов, поэтому сравнение в координатах  $Jt/Jgapdh$  оказывается здесь бессмысленным.

На рис. 1 видно, что экспрессия ряда генов (в том числе *bcr/abl*) коррелирует с закономерностями пролиферации и дифференцировки, апоптоза и распределения  $Ph^+$ -клеток по фазам клеточного цикла. Корреляция между максимальным накоплением пролиферирующих и дифференцирующихся клеток и экспрессией генов означает, что гены *p21*, *mdm2*, *p53*, *c-myc*, *bcr*, *bcl2* и *bax* участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза  $Ph^+$ -клеток типа 1. Однако «привязать» экспрессию этих генов к различным видам клеток типа 1 нельзя – они продуцируются общим пиком с одновременным максимумом.

На примере  $Ph^+$ -клеток типа 1, выделенных из ПК больного ХМЛ во время бластного криза (рис. 2), можно видеть сверхэкспрессию генов  $bcr > gapdh > bcr/abl$  с двумя максимумами на 1 и 7–10 сут при минимуме на 4–5 сут. Эти клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом (индекс эффективности  $P/D = 2-12$ ) и значительным содержанием клеток  $CD34^+$  [6]. Широкому пику пролиферации и дифференцировки с максимумом пика бластных клеток на 1–3 сут соответствует весьма умеренная экспрессия *p53*, *mdm2*, *bcl2* с максимумами на 0.5, 6 и 9 сут и минимумами на 2–4 и 11 сут. При этом концентрация незрелых клеток значительно больше, чем миелоцитов. К 5–8 сут пик незрелых клеток возрастает, однако он уже состоит в основном из миелоцитов. При этом уровень экспрессии гена *bcr* увеличивается, а *bcr/abl* падает (рис. 2А–В).

Высокие уровни экспрессии *bcr/abl* (рис. 2А,Б) с двумя максимумами соответствуют профилю индексов  $P/D$ , накоплению бластов и миелоцитов в процессе пролиферации и дифференцировки (рис. 2В). Они также отражают начало циклов 1 и 2 пролиферации и дифференцировки с экспрессией генов в ранних миелоидных клетках-предшественниках [6].

Таким образом, пик индекса  $P/D$  на 1 сут и распределение экспрессии генов в ряду

*gapdh* ~ *bcr/abl* > *bcr* >> *p53* ~ *mdm2* > *bcl2* относятся в основном к бластным клеткам (миелоидные клетки-предшественники, примерно на 75% состоящие из бластов и промиелоцитов). Видно, что уровень экспрессии генов *p53*, *mdm2* и *bcl2* в 5 раз ниже, чем у генов *bcr/abl* и *gapdh*. Возможно, при сверхэкспрессии *bcr/abl* и *gapdh* ингибируются гены *p53*, *mdm2* и *bcl2*, или же снижение экспрессии генов *p53* и *mdm2* ведет к бесконтрольному делению Ph<sup>+</sup>-клеток.

Пик пролиферации и дифференцировки незрелых пролиферирующих клеток на 7 сут состоит в основном из миелоцитов, и экспрессия генов в ряду *bcr* >> *gapdh* >> *p53* > *bcl2* ~ *mdm2* > *bcr/abl* на 4–6 сут также определяется миелоцитами. Экспрессия генов в миелоцитах и нейтрофилах далее также уменьшается, что согласуется с низкой экспрессией многих белков и факторов роста в нейтрофилах [51, 57, 64, 65, 68, 69].

С другой стороны, известно, что белок BCR<sub>(64-413)</sub>, сверхэкспрессируемый в Ph<sup>+</sup>-клетках мышей с ХМЛ, фосфорилируется белком *bcr/abl* по остатку тирозина, вследствие чего киназная активность онкобелка *bcr/abl* снижается на 80% [37–40]. Сверхэкспрессия *bcr* (рис. 2) приводит к существенному, но не полному ингибированию *bcr/abl*. Максимум пика экспрессии *bcr* наблюдается на 2 сут раньше пика экспрессии *bcr/abl* и соответствует высоким индексам P/D = 6–12 и быстрому развитию бластного криза ХМЛ у этого больного [2].

Низкая экспрессия *p53* отмечается также в других Ph<sup>+</sup>-клетках в фазе акселерации и бластного криза ХМЛ с высоким пролиферативным потенциалом и индексом P/D = 3–23. Так, на 3 сут обнаруживается экспрессия генов *p53*, не превышающая 1/3 экспрессии *gapdh*. В этих клетках уровни экспрессии *bcr/abl*, *mdm2* и *bcl2* сопоставимы с *gapdh*, при том, что экспрессия *bcr* в 2 раза выше. Ph<sup>+</sup>-клетки с высоким индексом P/D (от другого больного ХМЛ) имеют сходный профиль экспрессии этих генов. Возможно, данные клетки бластного криза ХМЛ несут дефектный *p53*, хотя мутации в этом гене не типичны для ХМЛ.

Итак, Ph<sup>+</sup>-клетки типа 1 при продолжительной пролиферации, концентрации незрелых клеток большей, чем зрелых, и индексе P/D = 2–20 отличаются по составу и уровню экспрессии генов. Для клеток с индексом P/D ~ 5–20 характерно повышенное содержание бластных клеток (от CD34<sup>+</sup> до промиелоцитов), которым соответствует сверхэкспрессия *bcr* > *gapdh* > *bcr/abl* при пониженной экспрессии *p53*, *bcl2* и *mdm*, *p21* < *gapdh*. Активация *bcr/abl* в миелоидных клетках-предшественниках сопровождается низкой экспрессией *p53*, *p21*, *mdm2*. В отсутствие контроля, осуществляемого генами-

регуляторами пролиферации и клеточного цикла, создаются, по-видимому, благоприятные условия для активной пролиферации клеток *bcr/abl*<sup>+</sup>. Возможно, эти Ph<sup>+</sup>-клетки содержат мутантный *p53*.

В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1 с невысоким пролиферативным потенциалом, P/D ~ 1.2–4 и большим содержанием незрелых клеток, чем зрелых, наблюдается умеренная экспрессия *bcr/abl* при сверхэкспрессии *p21*, *mdm2*, *p53*, *bcl2*, *bax*, а также пролиферация и дифференцировка, благополучная для данного клона Ph<sup>+</sup>-клеток. Эти гены участвуют в регуляции клеточного цикла, распределение клеток в S- и G2/M-фазах которого представлено широким пиком на 2–5 сут с максимумом на 3 сут. В этот период экспрессируются гены *p21*, *p53* и *mdm2* и взаимодействуют *p53* и *mdm2*, контролирующие экспрессию друг друга.

В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1 происходит эффективная пролиферация с накоплением незрелых клеток и сверхэкспрессией *p21*, *p53* и *mdm2*. Зрелые клетки (нейтрофилы), образующиеся в период с 3 по 7 сут, быстро выходят в апоптоз. При этом концентрация зрелых клеток падает почти на порядок, что служит дополнительной причиной уменьшения экспрессии генов в ряду *p21* > *mdm2* > *p53*. По совокупности приведенных данных можно сказать, что в зоне 1 пролиферации и дифференцировки (1–4 сут) клеток типа 1 (рис. 1 и 2) экспрессия генов *p21* > *mdm2* > *p53* в 4–4.5 раза выше, чем гена *gapdh*. Далее на 4–10 сут, когда число клеток в S- и G2/M-фазах падает, уровни экспрессии этих генов уменьшаются в 3, 2.5 и 1.5 раза по сравнению с *gapdh* соответственно. На 8–9 сут уровни экспрессии этих генов на кинетической кривой имеют близкие минимумы.

### Экспрессия генов при пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup>-клеток типа 2

Для Ph<sup>+</sup>-клеток типа 2 на этапе созревания характерно значительное накопление нейтрофилов, особенно сегментоядерных, которые существенно блокируют апоптоз и ингибируют пролиферацию Ph<sup>+</sup>-клеток. Пролиферация и дифференцировка происходят длительно с низкой эффективностью (P/D<sup>2</sup> ≤ 1) и скоростью созревания большей, чем скорость пролиферации, и при большей концентрации зрелых клеток, чем незрелых [1–4].

В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 2 (рис. 3А–Г) наиболее активно экспрессируются гены *mdm2* > *p53*, значительно слабее *actin* ~ *gapdh* > *p21* > *bcr* > *c-myc* ~ *bcr/abl* > *bax* > *bcl2* (широкий пик с максимумом на 2 сут), что по длительности и положению максимумов соответствует повышенному (30–40%) накоплению клеток в S- и G2/M-фазах в течение 3–4 сут при низком уровне апоптоза (2–5%, рис. 3Г). Уровни экспрессии генов *p21* > *c-myc* ~ *bcr/abl* > *bax* > *bcl2* ниже, чем у гена

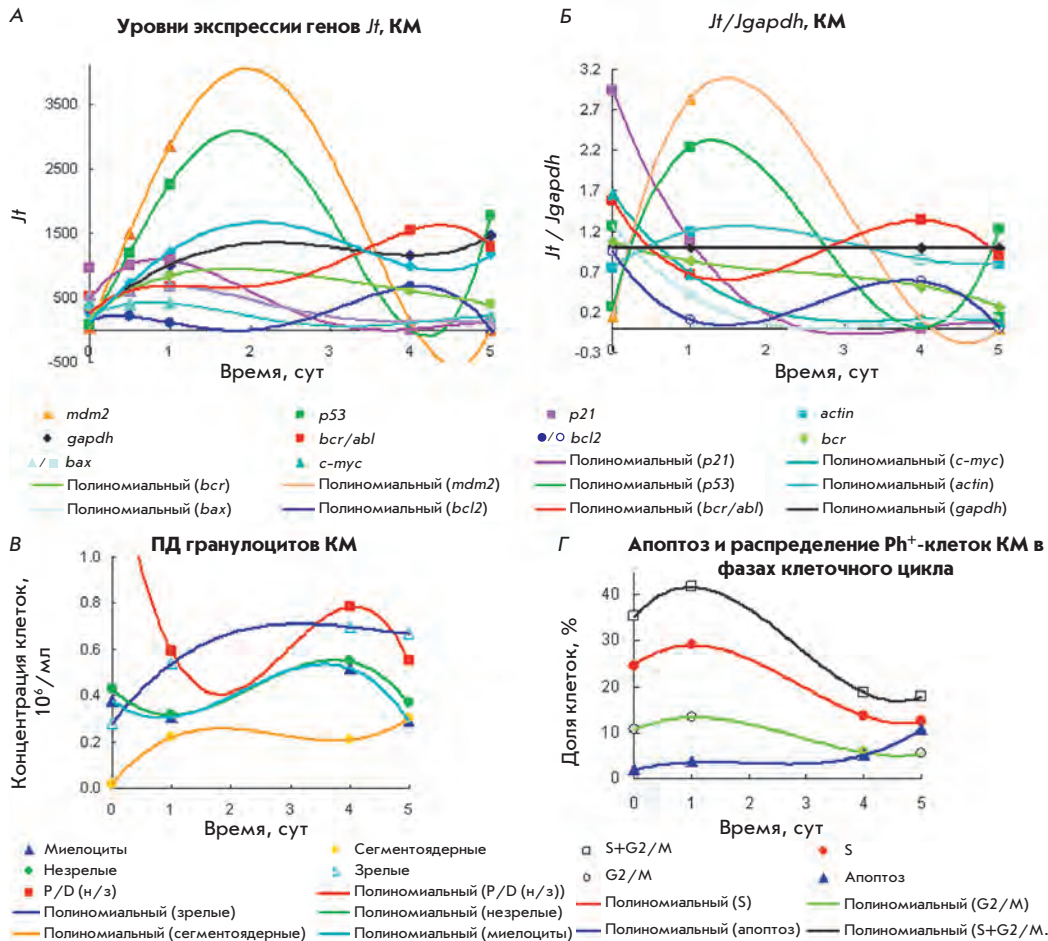


Рис. 3. Экспрессия генов в  $Ph^+$ -клетках типа 2 из КМ при длительном этапе созревания с низкой эффективностью  $P/D \leq 1$ . Кинетические кривые уровней экспрессии генов (УЭГ) *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б), а также пролиферации и дифференцировки (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г)  $Ph^+$ -клеток КМ при  $[z] > [nz]$ . Детали обработки проб как на рис. 1. Уровни экспрессии генов *Jt* (А) и *Jt*/*Jgapdh* (Б).

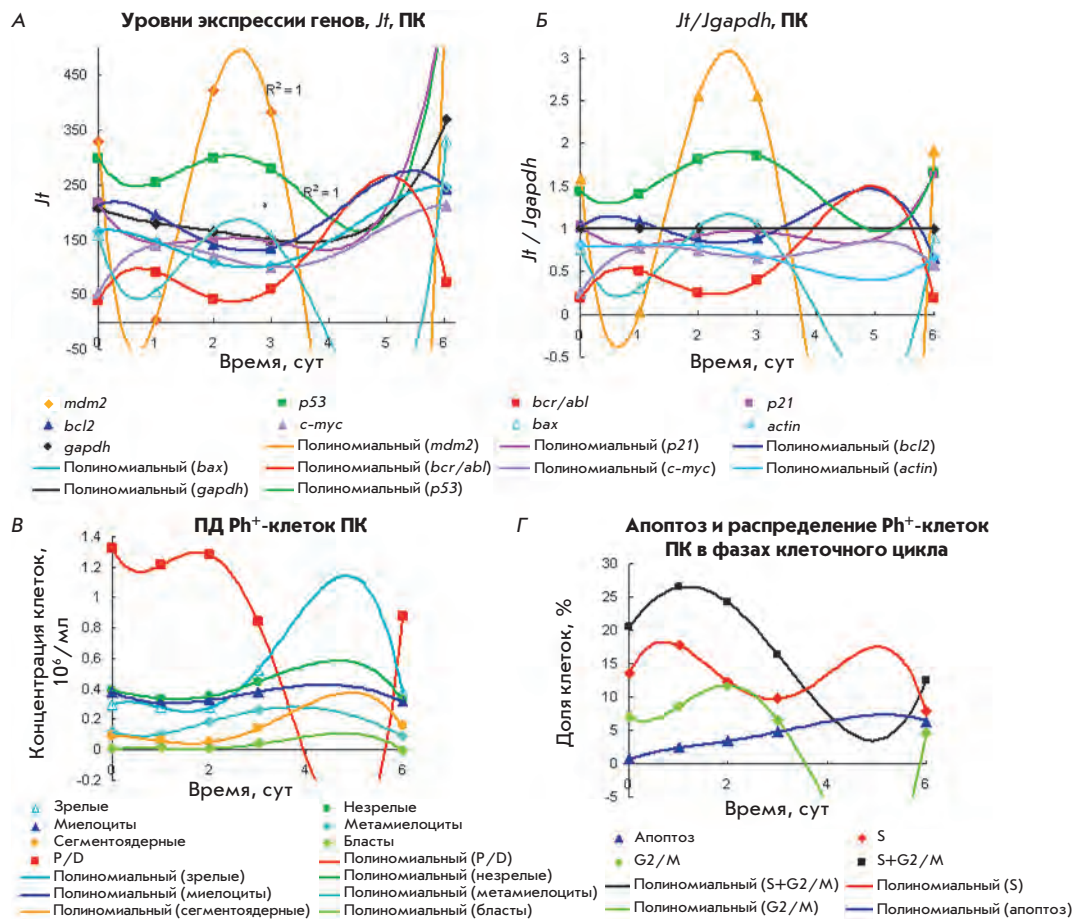
*gapdh*. Ко времени максимума продукции миелоцитов (4–5 сут) экспрессия генов *mdm2* > *p53* приближается к минимуму (4 сут). При этом в течение всего времени наблюдения (5 сут) концентрация нейтрофилов в ~ 2 раза выше, чем миелоцитов, что согласно [1, 3] заметно тормозит накопление незрелых клеток – ингибирует пролиферацию в течение 1–5 сут. Несмотря на большее накопление нейтрофилов, чем незрелых, при совпадении по времени их максимумов и высокого содержания клеток в G2/M + S-фазах (~ 40%) экспрессия *mdm2* > *p53* > *gapdh* остается значительной.

В этих условиях уровни экспрессии *gapdh*, *actin*, *p21*, *bcr*, *c-myc*, *bax* мало изменяются, а уровень *bcl2* составляет не более половины от уровня *gapdh*; у остальных генов этот показатель еще ниже. Таким образом, нейтрофилы и миелоциты при высоком их содержании мало влияют на экспрессию этих генов. Уровни экспрессии генов *p21*, *bcr*, *c-myc*, *bcl2*, *bax* в клетках типа 2 в 2–5 раза ниже, чем в клетках типа 1. Это позволяет отнести сверхэкспрессию генов

*p53* и *mdm2* в  $Ph^+$ -клетках типа 2 к пролиферирующим клеткам в S- и G2/M-фазах, а не к миелоцитам и нейтрофилам на этапе созревания. При этом уровни экспрессии *mdm2* и *p53* в S- и G2/M-фазах клеток обоих типов сходны и составляют 4.5 и 2–3 относительно *gapdh*.

Максимальные уровни экспрессии *bcr/abl* и *bcl2* соответствуют максимуму пика миелоцитов. В случае *bcr/abl* максимум отвечает максимальному накоплению миелоцитов, росту индексов P/D на 4 сут и максимальной экспрессии *bcr/abl* > *gapdh* на 4–5 сут. Экспрессия *bcr/abl* снижается одновременно с накоплением нейтрофилов и возрастает примерно в 2 раза с продукцией миелоцитов. Низкие уровни *bax* и *bcl2* соответствуют низкой доле апоптоза, особенно при *bcl2* > *bax*, когда *bcl2* блокирует апоптоз. Другими словами, миелоциты и нейтрофилы характеризуются низкой экспрессией генов *gapdh* ~ *actin* > *bcr*, *p21*, *bax*, *mdm2*, *p53* и *c-myc*, тогда как уровень экспрессии гена *bcr/abl* достигает своего максимума в миелоцитах (рис. 3А–В).

**Рис. 4.** Кинетические кривые уровней экспрессии генов (УЭГ) *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-мус*, *bcr/abl*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б), а также ПДК (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г) для Rh<sup>+</sup>-клеток типа 3 из ПК с чередованием этапов пролиферации и дифференцировки по схеме 1/2. Уровни экспрессии генов *Jt* (А) и *Jt/Jgapdh* (А, Б). Этап пролиферации на 0–3 сут с [нз] > [з], этап созревания с [з] > [нз] на 3–6 сут.



### Экспрессия генов при пролиферации и дифференцировке Rh<sup>+</sup>-клеток типа 3

Регуляция пролиферации и дифференцировки Rh<sup>+</sup>-клеток типа 3 зависит от последовательности этапов чередования и от схемы чередования: 1/2/1 или 2/1/2, т.е. с какого этапа – пролиферации (1) или созревания (2) – начинается их чередование. Согласно [1–4] пролиферация и созревание протекают параллельно, однако с повышенной скоростью начального этапа чередования по сравнению с последующим. Максимуму скорости пролиферации соответствует минимум скорости созревания и наоборот. В точках пересечения кривых накопления незрелых клеток и нейтрофилов скорости этапов одинаковы и равны 1. Таким образом, чередование этапов определяет волновой процесс пролиферации и дифференцировки клеток. Чередование этапов по схемам 1/2/1 или 2/1/2 различается не только поочередным повышением скорости (либо пролиферации, либо созревания), но также ингибированием пролиферации высокими концентрациями нейтрофилов при [з] >> [нз] [1–4].

Характер экспрессии генов в Rh<sup>+</sup>-клетках, так же как их пролиферация и дифференцировка, зависит

от последовательности этапов чередования и от его начального этапа.

### Экспрессия генов при чередовании пролиферации и созревания по схеме 1/2/1

На рис. 4А–Г видно, что активная экспрессия генов совпадает с максимумами распределения клеток в фазах G2/M + S и индексов P/D (максимум на 2–3 сут, рис. 4В,Г). На этапе 1 (0–3 сут) скорости пролиферации и созревания различаются незначительно (по накоплению незрелых и нейтрофилов) без выраженного максимума (рис. 4В). Примерно на 3 сут (после пересечения кривых накопления незрелых и зрелых клеток) этап пролиферации (P/D = 1.4–1.1 и концентрация незрелых выше, чем зрелых) переходит в этап созревания (3–6 сут) с максимумом накопления нейтрофилов и их компонентов: метамиелоцитов, сегментоядерных, палочкоядерных, и снижением индексов эффективности (P/D<sup>2</sup> < 1). При этом на этапе 2 концентрация нейтрофилов существенно (в 4 раза) увеличивается, достигая максимума на 5 сут, а незрелых и миелоцитов возрастает всего на ~ 20% и также достигает максимума на 5 сут.



При этом зрелых клеток в 3 раза больше, чем незрелых (низкий уровень апоптоза – 3–7%, *рис. 4В,Г*). Видно, что накопление клеток в S-фазе на 5 сут сопровождается незначительным повышением их апоптоза, которое не приводит к увеличению содержания клеток в G2/M-фазе (*рис. 4Г*). Видно также, что 4-кратное увеличение содержания нейтрофилов заметно ингибирует пролиферацию на этапе созревания.

На *рис. 4А–Г* можно видеть, что этапу пролиферации (1) на 2–3 сут соответствуют максимумы экспрессии *mdm2* > *p53* > *bax* > *p21*, минимумы *bcl2* > *c-myc* >> *bcr/abl*, а также первый максимум S-фазы, максимумы G2/M, S+G2/M и индекса P/D. На 0.5 сут видны первый максимум экспрессии *bcr/abl*, минимумы *p53*, *mdm2*, *bax* и максимумы *bcl2*, *c-myc*. Этапу созревания (2) на 3–6 сут (максимум зрелых >> незрелых > метамиелоцитов > сегментоядерных >> бластов и небольшой максимум апоптоза) соответствуют минимумы экспрессии *p53* > *p21* >> *bax*, *mdm2* на 4–5 сут, минимумы клеток в G2/M-, G2+S-фазах и P/D на 5–6 сут, а также максимумы экспрессии *bcr/abl* и *bcl2*. При этом пику 2 непроизводительной S-фазы (не ведущей к G2/M) на 4–6 сут соответствуют максимумы *c-myc* и G2+S и второй минимум P/D на 5–6 сут, а также минимумы экспрессии *p53* ~ *p21* >> *bax* и минимум G2/M на 4–5 сут.

Уровни экспрессии генов (*рис. 4А,Б*) на первом этапе (2–3 сут) снижаются в ряду: *mdm2* >> *p53* > *bax* ~ *gapdh* ~ *p21* ~ *bcl2* > *bcr/abl*, а экспрессия генов *bcl2*, *c-myc* > *bcr/abl* достигает минимума. На этапе 2 (на 5 сут) видны максимумы экспрессии *bcr/abl* ~ *bcl2* > *gapdh* и повышение уровней *actin*, *p53* ~ *p21*, а также *c-myc* при минимальном уровне *bax*. Сверхэкспрессия *mdm2* >> *p53* >> *bax* > *gapdh*, максимум которой наблюдается на 2 сут, соответствует максимальному числу клеток в S- и G2/M-фазах. При этом с завершением пролиферации и переходом к созреванию экспрессия *p53* и *mdm2* резко падает, а *bcr/abl* и *bcl2* возрастает. На этапе созревания по уровню максимальной экспрессии (4–6 сут) гены располагаются в ряду: *bcr/abl* ~ *bcl2* > *gapdh* ~ *actin* ~ *p21* ~ *c-myc*. Максимальные уровни экспрессии *bcr/abl* и *bcl2* наблюдаются при незначительном накоплении незрелых и миелоцитов на 5 сут. При экспрессии *bcl2* >> *bax* апоптоз блокирован (он составляет 2–4% и на 5–6 сут не превышает 7%). Это подчеркивает роль сверхэкспрессии *bcl2* по сравнению с низкой экспрессией *bax* в таком значительном подавлении апоптоза (*рис. 4А,Г*). В случае *bcl2* > *bax* или асинхронности максимумов и минимумов их экспрессии также наблюдалось ингибирование апоптоза в Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1 и 2. Повышение уровней экспрессии ряда генов к 5–6 сут можно считать предвестником этапа

пролиферации, следующего за этапом созревания.

На этапе пролиферации, когда содержание пролиферирующих клеток едва превосходит содержание нейтрофилов, сверхэкспрессия в ряду *mdm2* >> *p53* > *bax* > *gapdh* соответствует максимуму пролиферирующих клеток в S- и G2/M-фазах, а на этапе созревания появляются небольшие максимумы экспрессии *bcr/abl* ~ *bcl2* > *gapdh*. Уровни экспрессии остальных генов ниже, чем у *gapdh* на этапах и пролиферации, и созревания. Экспрессия генов *mdm2* и *p53* резко увеличивается на этапе пролиферации и быстро уменьшается на этапе созревания в соответствии с долей клеток в фазе G2/M. Это означает, что экспрессия гена *mdm2* значительна в пролиферирующих клетках, но низка или отсутствует в нейтрофилах. Активная экспрессия *mdm2*, вероятно, может служить маркером этапа пролиферации и активации клеток в фазе G2/M клеточного цикла. Такой же характер изменения максимумов экспрессии *mdm2*, *p53* и *p21*, совпадающих с максимумом клеток в фазе G2/M (*рис. 5*), отмечается и на этапе созревания с чередованием 2/1.

Экспрессия *bcr/abl* имеет два максимума (*рис. 4А,Б*). На этапе пролиферации с незначительным превышением незрелых клеток над зрелыми, максимум *bcr/abl* < *gapdh*. Однако на этапе созревания, при высокой концентрации зрелых и их значительном превышении над незрелыми, экспрессия максимальна в ряду *bcr/abl*<sup>1</sup> > *gapdh* и *bcr/abl*<sup>1</sup> < *bcr/abl*<sup>2</sup> (*рис. 4А–В*). Отметим, что и здесь при пролиферации и созревании Ph<sup>+</sup>-клеток с чередованием этапов 1/2 экспрессия *bcr/abl* возрастает при снижении УЭГ *p53*, *mdm2* и *p21*. В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 2 и 3 уровень экспрессии *bcr/abl*<sup>1</sup> < *bcr/abl*<sup>2</sup> (*рис. 3 и 4*). В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1 можно встретить и *bcr/abl*<sup>1</sup> < *bcr/abl*<sup>2</sup>, и *bcr/abl*<sup>1</sup> > *bcr/abl*<sup>2</sup>.

Таким образом, экспрессия генов коррелирует с регуляцией пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток типа 3 с чередованием пролиферации и созревания по схеме 1/2. И в этом случае повышенная экспрессия *p53*, *mdm2* и *p21* совпадает с максимумом фаз S+G2/M и соответствует низкой экспрессии *bcr/abl*.

#### Экспрессия генов Ph<sup>+</sup>-клеток с чередованием этапов по схеме 2/1/2

При чередовании пролиферации и созревания по схемам 2/1–2/1/2/1 концентрация Ph<sup>+</sup>-клеток типа 3 последовательно изменяется в ряду: [з] > [нз] → [нз] > [з] → [з] > [нз] (*рис. 5–9*).

На *рис. 5 и 6* видно, что уровни экспрессии генов при созревании и пролиферации соответствуют низкому содержанию пролиферирующих клеток в фазах клеточного цикла (10–20%) при значительной индук-

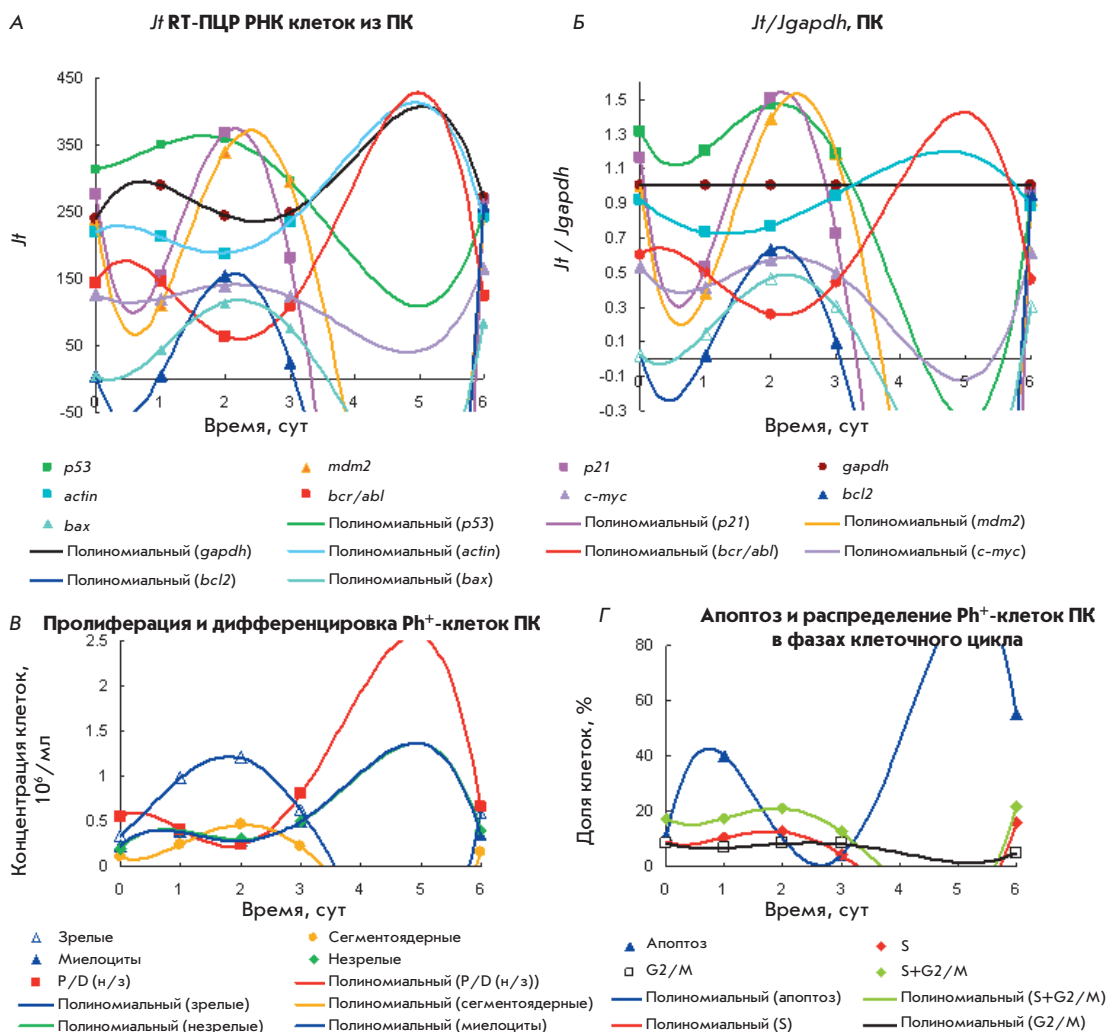


Рис. 5. Уровни экспрессии генов *p53*, *p21*, *mdm2*, *c-мус*, *bcr/abl*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б), а также кинетические кривые ПДК (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г) Rh<sup>+</sup>-клеток типа 3 из КМ с чередованием этапов по схеме 2/1/2. Детали на рис. 1. Уровни экспрессии генов *Jt* (А) и *Jt/Jgapdh* (Б). Этапы созревания при [з] > [нз] на 0–3 и 6 сут; этап пролиферации с [нз] > [з] на 3–6 сут.

ции апоптоза (40–80%). При этом высокое содержание неспособных к делению нейтрофилов на этапе созревания ведет к уменьшению пролиферативного пула клеток в фазах S+G2/M, особенно заметному на рис. 6, и этот пул не увеличивается при пролиферации на 2–6 сут. Возможно, максимум клеток в этих фазах не совпадает со значительным накоплением незрелых на этапе пролиферации. Однако созревающие без деления нейтрофилы, естественно, уменьшают накопление пролиферирующих клеток в фазах S и G2/M, при этом в них снижается экспрессия генов, активность которых существенно повышена в пролиферирующем пуле клеток в фазах S + G2/M.

Здесь уровни экспрессии исследованных генов существенно ниже, чем в предыдущих примерах, в том числе относительно *gapdh*.

При пролиферации и дифференцировке Rh<sup>+</sup>-клеток, начинающейся с этапа созревания, при значительном накоплении нейтрофилов с их ин-

гибированием пролиферации на 0–3 сут (рис. 5 и 6) максимум накопления нейтрофилов соответствует минимумам индекса эффективности P/D и накопления незрелых и миелоцитов. При переходе к этапу пролиферации на 3–5 сут видны минимумы накопления зрелых, рост P/D и минимумы накопления нейтрофилов. При этом концентрации зрелых и незрелых в их максимумах отличаются в 4–5 раз, что позволяет вполне корректно отнести экспрессию генов к нейтрофилам или соответственно к миелоцитам, уже не способным делиться.

На этапе созревания (рис. 5А–Г) максимальная экспрессия *p21*, *mdm2*, *p53* > *bcl2* > *bax* на 2 сут принадлежит не нейтрофилам, а пролиферирующим клеткам в S- и G2/M-фазах (20%), поскольку при повышении накопления миелоцитов в 5 раз на этапе пролиферации на 5 сут экспрессия этих генов не только не увеличивается, но снижается до минимальных значений.

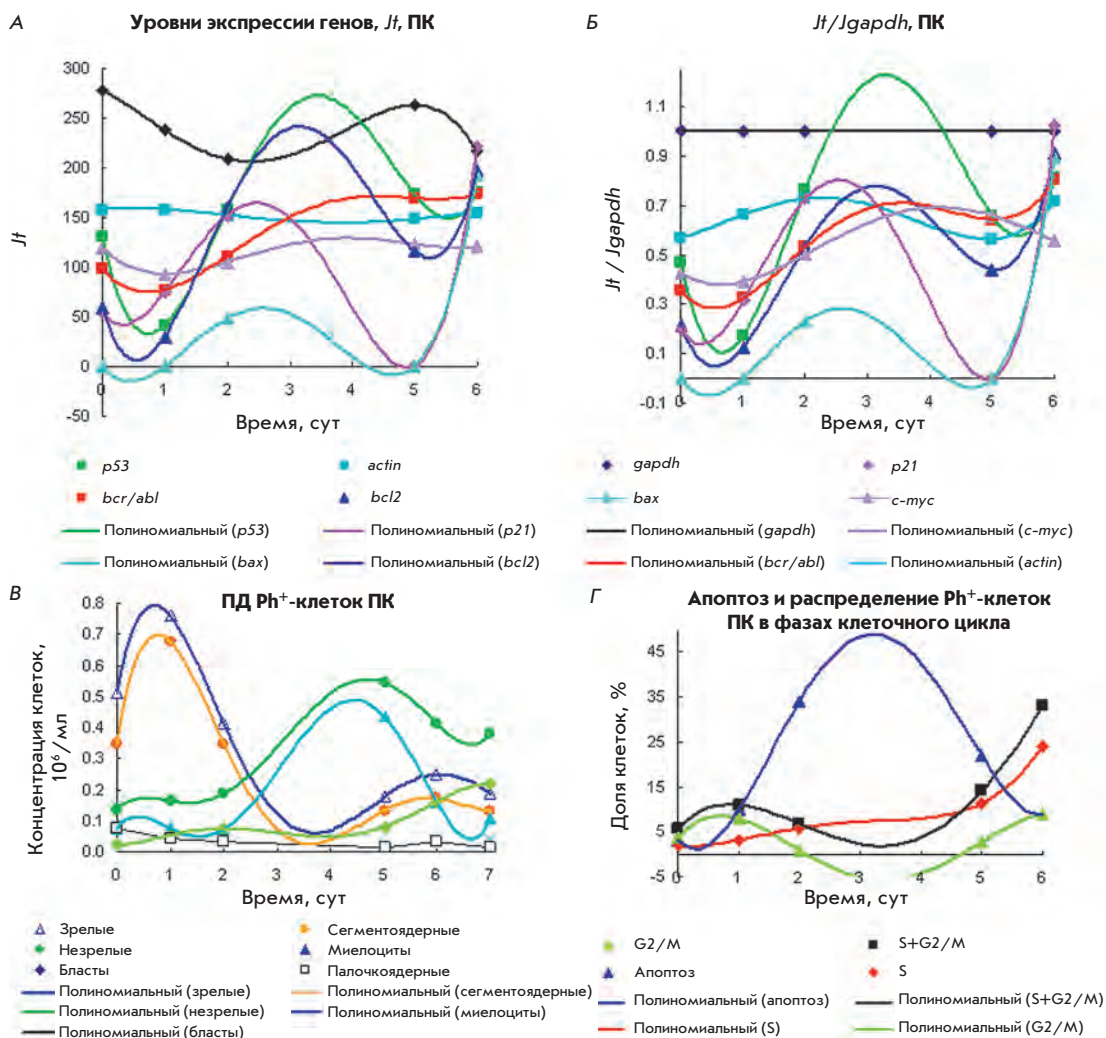


Рис. 6. Экспрессия генов  $p53$ ,  $p21$ ,  $c-myc$ ,  $bcr/abl$ ,  $bcl2$ ,  $bax$ ,  $gapdh$ ,  $actin$  (А, Б), а также кинетические кривые ПДК (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г)  $Rh^+$ -клеток ПК типа 3 с чередованием по схеме 2/1. Детали на рис. 1. Уровни экспрессии генов  $J_t$  (А) и  $J_t/J_{gapdh}$  (Б) для ОТ-ПЦР (проба  $10^6$  клеток). Этап созревания с 0–3 сут при  $[z] > [nz]$ , этап пролиферации с 3–6 сут при  $[nz] > [z]$ .

Максимальный уровень экспрессии генов  $bcr/abl$ ,  $actin$ ,  $gapdh$ ,  $c-myc$ , наблюдаемый на 5 сут, относится уже к миелоцитам ( $P/D^2 = 2.5$ ). Два пика экспрессии  $bcr/abl$  (относительно  $gapdh$ , рис. 5А,Б) при пролиферации миелоцитов в 2 раза больше, чем при созревании нейтрофилов (на 5 и 0.5 сут). На этапе созревания (на 2 сут) видны также минимумы экспрессии генов  $gapdh > actin > bcr/abl$ . Это означает, что экспрессия генов, регулирующих клеточный цикл в пролиферирующих незрелых клетках, активируется и на этапе созревания в соответствии с максимумом клеток в фазах S и G2/M, но уровень экспрессии в 2–3 раза ниже, чем в  $Rh^+$ -клетках типа 1 и 2.

На рис. 5 уровни экспрессии генов  $p21 \sim mdm2 \sim p53 > gapdh$  выше, чем на рис. 6. Из рис. 6 видно, что на этапе созревания содержание клеток в фазах S + G2/M в 2 раза меньше, а нейтрофилов в 5 раз больше, чем незрелых, при значительно большем количестве сегментоядерных нейтрофилов. То есть, чем

выше содержание нейтрофилов, тем меньше клеток накапливается в фазах S и G2/M и тем ниже относительные уровни экспрессии генов  $p21$ ,  $mdm2$ ,  $p53$  и  $gapdh$  (рис. 5 и 6).

На этапе пролиферации с максимумом пика миелоцитов (на 5 сут) только у генов  $bcr/abl$  и  $actin$  уровни экспрессии выше, чем у  $gapdh$ , а у  $p53 > c-myc > bax > mdm2 > p21$  они ниже. Два максимума экспрессии  $gapdh$  коррелируют с максимумами апоптоза (рис. 5А,Б,Г). На рис. 6А,Б,Г видно, что на 2–4 сут только  $p53$  и  $bcl2$  экспрессируются активнее  $gapdh$ . Максимум экспрессии генов  $p53 > gapdh \gg mdm2 > p21$  на 2–4 сут соответствует также максимуму широкого пика апоптоза (на 2–5 сут). Это отличается от умеренной экспрессии  $gapdh$  в ранее обсуждаемых примерах пролиферации и дифференцировки без чередования этапов и, вероятно, связано с участием  $gapdh$  в индукции апоптоза с максимумом на 1 и 5 сут. Отметим, что экспрессия  $p53$ ,  $c-myc$  и  $bcl2$ ,

минимальная на этапе пролиферации на 3–6 сут, составляет 0.5–0.7 от максимального уровня экспрессии *gapdh* (рис. 6). На рис. 6 видно, что максимумы экспрессии генов  $p53 > mdm2 > p21$  на 2–4 сут соответствуют также максимуму широкого пика апоптоза (на 2–5 сут).

Известно, что экспрессия *p21*, *p53*, *gapdh* и *c-myc* может отвечать за индукцию апоптоза [13–16, 20, 21, 28, 55, 56]. На этапе пролиферации на 3–6 сут в отсутствие экспрессии *bax* и *bcl2* апоптоз индуцируется, очевидно, с участием генов *gapdh*, *p21* и *p53* (рис. 5 и 6).

Отметим, что уровень экспрессии *bcr/abl* на 0.5–1 сут соответствует максимальному кратковременному накоплению миелоцитов и незрелых клеток-предшественников миелоцитов. Экспрессия генов, достигающая максимума на 0.5 сут, изменяется в ряду  $p53 > gapdh > actin > bcr/abl$ . Уровень экспрессии гена *bcr/abl* на 0–1 сут в 2 раза ниже, чем на 5 сут, что также связано с ингибированием пролиферации  $Ph^+$ -клеток при повышенной концентрации нейтрофилов (рис. 5 и 6).

Таким образом, относительные изменения уровня экспрессии генов в  $Ph^+$ -клетках соответствуют чередованию этапов по схеме 2/1 (от созревания к пролиферации). Экспрессия генов согласуется с ингибированием пролиферации незрелых клеток нейтрофилами, созревающими без деления. Экспрессия генов на этапе созревания с максимальным содержанием нейтрофилов (в виде сегментоядерных при небольшой доле пролиферирующих клеток в фазах S и G2/M) в несколько раз ниже, чем в  $Ph^+$ -клетках типа 1–3 с максимумом пула пролиферативных клеток. В этих случаях экспрессия генов однозначно повышена в активно пролиферирующих клетках в фазах S и G2/M. При этом нейтрофилы, как неделящиеся клетки, в этих фазах отсутствуют.

Низкая экспрессия исследуемых генов в самих нейтрофилах видна на этапах созревания  $Ph^+$ -клеток типа 2 и 3 (рис. 3–6), что согласуется с пониженной продукцией в нейтрофилах многих белков и факторов роста [51, 57, 64, 65, 68, 69].

Видно (рис. 6), что в клетках типа 3 с чередованием этапов 2/1 на этапе созревания при повышенном содержании нейтрофилов понижены уровни экспрессии всех генов. Уровни экспрессии генов  $p21 \sim mdm2 \sim p53 > gapdh > c-myc$  при созревании в 3–5 раз ниже, чем на этапе пролиферации (рис. 5 и 6). При этом изменяется характер экспрессии *p21* и *mdm2*. Пики их экспрессии, достигающей максимума на 1 или 2 сут, сужаются, а затем снижаются до минимума в соответствии с завершением фаз S и G2/M клеточного цикла по времени.

Отметим, что на этапе пролиферации с накоплением миелоцитов существенно повышается экспрессия *bcr/abl*. На этапе созревания нейтрофилов экспрессия *bcr/abl* в ~ 2 раза ниже, чем при накоплении миелоцитов. На этапе пролиферации экспрессия *bcr/abl* зависит от вида и концентрации пролиферирующих миелоидных клеток-предшественников (бластов), экспрессия *bcr/abl* в которых, возможно, подавляется активной экспрессией *p53*, *mdm2* и *p21*. Дополнительно к ингибированию пролиферации в  $Ph^+$ -клетках типа 3 с чередованием 2/1 на этапе созревания происходит ингибирование экспрессии *bcr/abl* до минимума – в 1.5–3 раза ниже *gapdh* (рис. 5–6). При этом в нейтрофилах в максимуме созревания (1–2 сут с сегментоядерными нейтрофилами, составляющими основное содержание) заметно экспрессируются только *gapdh* и *actin*. Минимальные уровни *c-myc*, *bcr/abl*,  $p53 > p21 > bcl2 > bax$  в 2–10 раз ниже, чем у *gapdh* (рис. 6А,Б), что согласуется с низким содержанием клеток в фазах S и G2/M (< 12%).

При длительном чередовании этапов 2/1/2/1  $Ph^+$ -клеток с очень низким содержанием в фазах S и G2/M (от 5 до 2%) и активном апоптозе экспрессия генов также коррелирует с чередованием этапов созревания и пролиферации. При этом экспрессия генов  $bcr/abl > gapdh \geq c-myc$  повышена, а у генов *mdm2*, *p53*, *bcl2* остается на низком уровне и при созревании, и при пролиферации (рис. 7А,Б). Экспрессия гена *bcr/abl* характеризуется двумя пиками, большими, чем у гена *gapdh* и  $bcr/abl^1 > bcr/abl^2$  на этапах созревания и пролиферации соответственно (рис. 7). Этап созревания с высоким накоплением нейтрофилов сопровождается экспрессией  $bcr/abl > gapdh > c-myc > p53 > mdm2$ , которая к 5 сут стремится к минимуму. На этапе пролиферации (5–7 сут) уровни экспрессии снова возрастают до максимума (на 7–8 сут) и затем снижаются с четкой очередностью. Так максимумы и минимумы накопления  $Ph^+$ -клеток при созревании и пролиферации чередуются так же, как максимумы и минимумы экспрессии генов в ряду *c-myc*, *bcr/abl*, *gapdh*, *p53*. При этом им соответствуют высокие уровни экспрессии генов *bcr/abl* и *c-myc* и очень низкие – *bcl2* и *mdm2*. Быстро растущее накопление нейтрофилов приводит к подавлению пролиферации незрелых и экспрессии их генов и снижению содержания клеток в S- и G2-фазах до 3–5% (рис. 7В,Г). Последовательность этих событий отражается на уровне экспрессии генов в ряду:  $c-myc \sim gapdh \sim bcr/abl > p53 > mdm2$  на 1–9 сут (рис. 7А–Г).

В другом примере  $Ph^+$ -клеток из КМ (рис. 8) с чередованием этапов 2/1/2/1 при повышенном содержании клеток в S- и G2-фазах (~ 30%, с двумя их максимумами на 2 и 6 сут) видны два максимума экспрессии

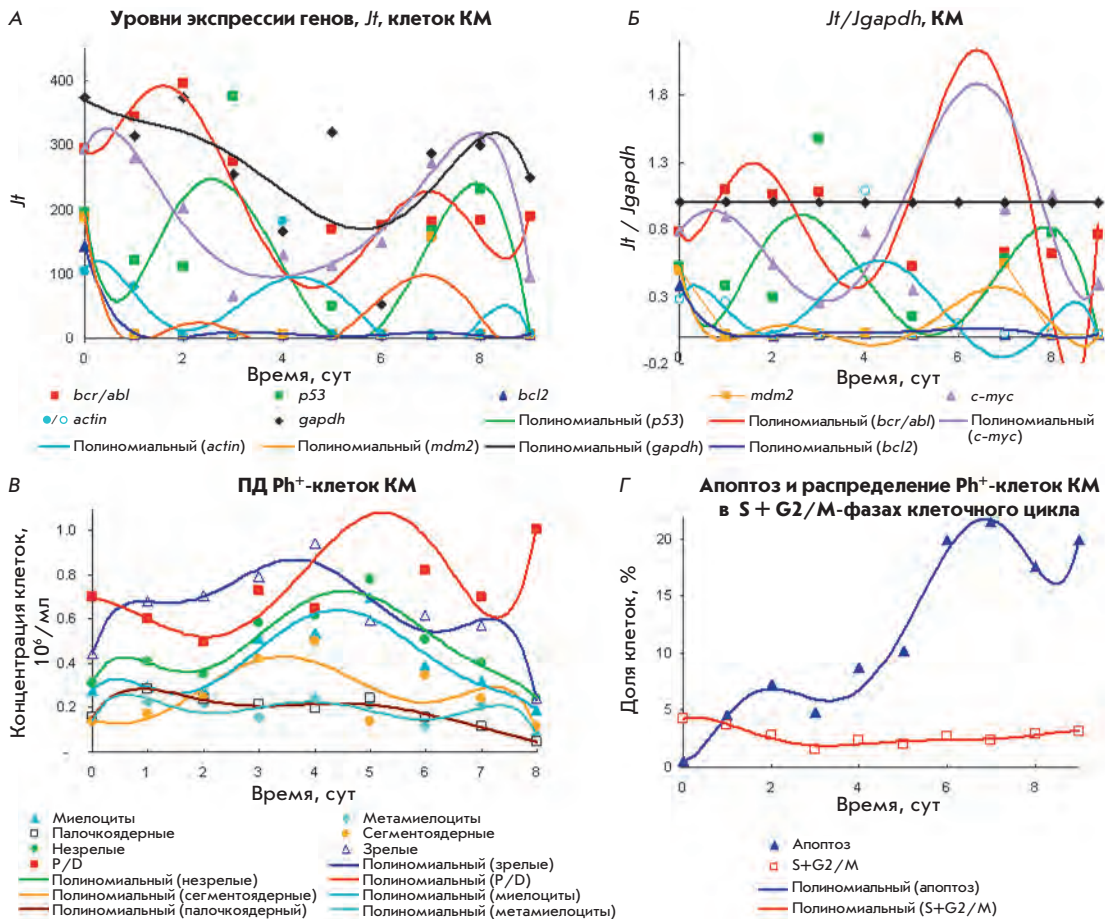


Рис. 7. Экспрессия генов *p53*, *mdm2*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcl2*, *gapdh*, *actin* (А, Б), а также кинетические кривые ПДК (В), апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (Г) в  $Ph^+$ -клетках типа 3 из КМ с чередованием этапов по схеме 2/1/2/1. Детали на рис. 1. Уровни экспрессии генов  $J_t$  (А) и  $J_t/J_{gapdh}$  (Б). Этапы созревания 0–5 и 6–8 сут с  $[z] > [nz]$ , этапы пролиферации на 5–6 и 8 сут при  $[nz] > [z]$ .

генов: первый на этапе созревания:  $p21 > bax \sim c-myc \sim actin \gg bcr/abl$  и  $gapdh \sim bcl2 \sim p53 > mdm2$ ; второй на этапе пролиферации:  $c-myc \sim p21 > bax \gg bcr/abl > actin$  и  $gapdh > mdm2 > p53 > bcl2$ . Второй максимум уровней экспрессии  $p21 > bax \sim c-myc$  на порядок выше первого. В  $Ph^+$ -клетках из ПК (рис. 9) от того же больного ХМЛ экспрессия генов  $p21 > bax \sim c-myc$  была значительно ниже уровней экспрессии в клетках из КМ (рис. 8) и оставалась высокой на этапе пролиферации при трехкратном накоплении нейтрофилов ПК на этапе созревания. То есть при значительном накоплении нейтрофилов подавляется экспрессия генов на этапах созревания даже с повышенным содержанием клеток в фазах S + G2/M.

Результаты, представленные на рис. 7–9, примечательны тем, что рис. 7 показывает влияние длительного избытка нейтрофилов над незрелыми на экспрессию генов и на полное подавление пула пролиферирующих клеток в S + G2/M-фазах при низком уровне апоптоза. А на рис. 8–9 видно подавление нейтрофилами экспрессии генов на этапе созревания при совпадении существенного максимума клеток в S + G2/M-фазах (30%). Однако при пере-

ходе к пролиферации со значительным накоплением незрелых пролиферирующих клеток в условиях 50–80% индукции апоптоза (до того 10–20%) образуется второй максимум накопления пролиферирующего пула в фазах S+G2/M. При этом экспрессия генов  $p21 > bax \sim c-myc > bcr/abl > mdm2$  возрастает на порядок при минимумах  $p53 > bcl2$ . Другими словами, нейтрофилы способны подавлять и задерживать образование пула пролиферирующих клеток в фазах клеточного цикла и/или подавлять экспрессию соответствующих генов. В этих терминах можно также интерпретировать и результаты, представленные на рис. 4–6.

Итак, при пролиферации и дифференцировке с чередованием этапов 2/1 – 2/1/2/1 экспрессия генов в нейтрофилах и миелоцитах согласуется с типами клеточной регуляции чередованием этапов, апоптоза и распределения  $Ph^+$ -клеток ХМЛ в фазах клеточного цикла. Это также дополнительно свидетельствует о блокировании нейтрофилами апоптоза и ингибировании пролиферации  $Ph^+$ -клеток. Уровни экспрессии генов на этапах созревания определяются максимальным накоплением клеток в S- и G2/M-фазах клеточ-

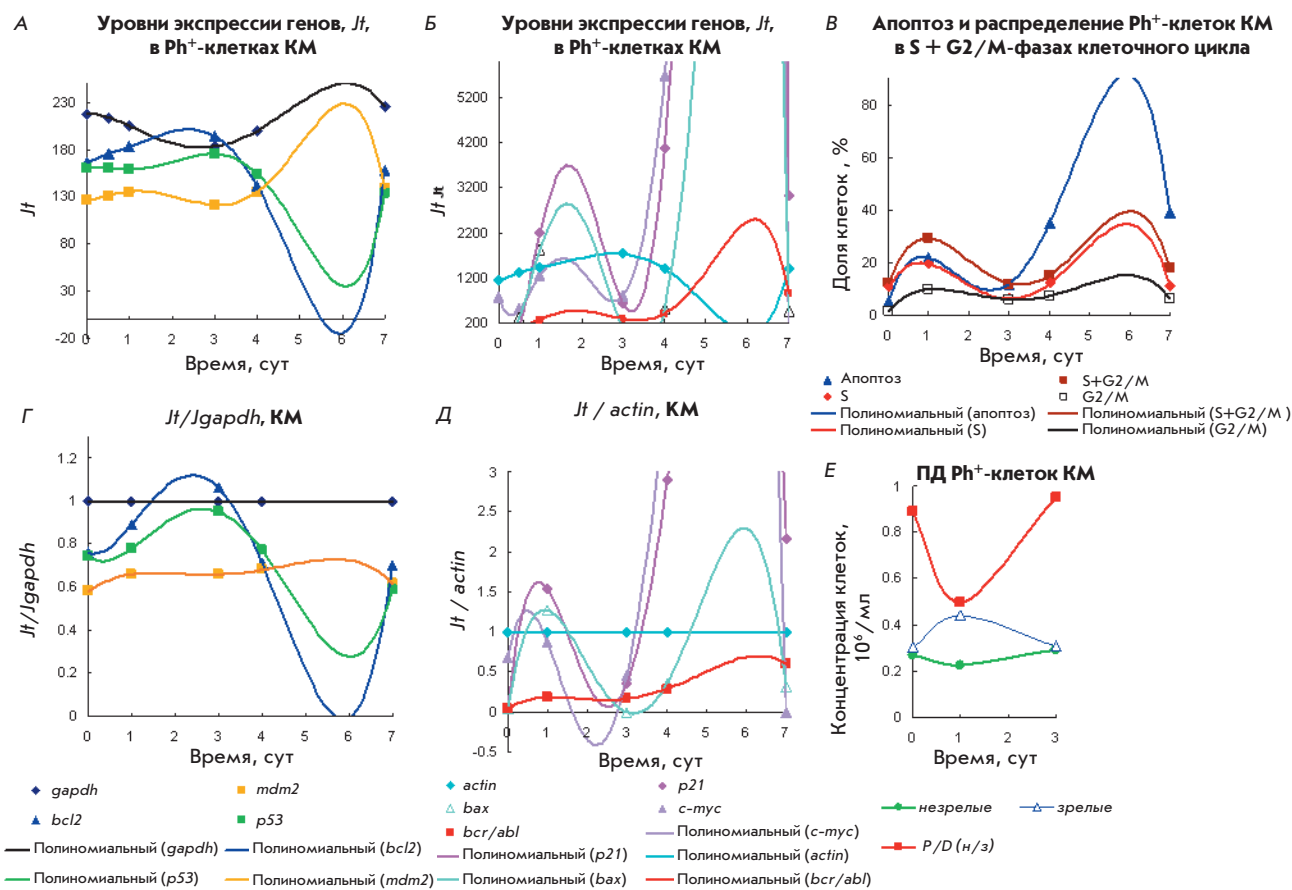


Рис. 8. Кинетические кривые уровней экспрессии генов *p21*, *c-мус*, *bcl2*, *p53*, *mdm2*, *bcr/abl*, *baх*, *gapdh*, *actin* (А, Б, Г, Д), а также ПДК (Е), апоптоза и распределения в фазах клеточного цикла (В)  $Ph^+$ -клеток из КМ типа 3 с чередованием этапов по схеме 2/1. Детали на рис. 1. *Jt* (А, Б), *Jt*/*Jgapdh* (Г, Д). Этап созревания с [з] > [нз] на 0–3 сут, этап пролиферации с [нз] > [з] на 3–7 сут.

ного цикла и ингибированием пролиферации нейтрофилами. Совпадение максимумов накопления клеток в S + G2/M-фазах и на этапе пролиферации указывает на их значение в повышении уровней экспрессии генов *p21*, *mdm2*, *p53*, *baх*, *c-мус* в 1.5–7 раз.

В нейтрофилах на этапе созревания уровни экспрессии остальных генов в 2–10 раз ниже, чем у гена *gapdh*. Это сопоставимо с уровнями экспрессии в клетках 2-го типа и в 5–10 раз ниже, чем в незрелых клетках первого типа.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В полученных от больных ХМЛ гемопоэтических клетках, содержащих Ph-хромосому и онкоген *bcr/abl*, определены кинетические кривые экспрессии 10 генов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку, клеточный цикл и апоптоз. Экспрессия основных регуляторов клеточного цикла – *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-мус*, *bcr/abl*, *baх*, *bcl2* и *gapdh*, в диф-

ференцирующихся пролиферирующих миелоидных  $Ph^+$ -клетках и нейтрофилах, созревающих без деления, коррелирует с регуляцией процессов пролиферации и дифференцировки, с индукцией апоптоза и распределением клеток в фазах клеточного цикла *ex vivo*. Сравнение кинетики экспрессии генов и закономерностей регуляции пролиферации и дифференцировки  $Ph^+$ -клеток *ex vivo* с функциями этих генов показало, что эти гены участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки *ex vivo*  $Ph^+$ -клеток трех основных типов, а также в чередовании пролиферации (1) и созревания (2).

Определенные нами уровни экспрессии генов можно считать оценочными, выявляющими тенденцию, поскольку данные ОТ-ПЦР сравнивали с уровнями экспрессии *gapdh* и *actin*, которые также изменяются (измеряли в тех же пробах) в ходе культивирования, а не применяли внутренние стандарты на каждый ген.

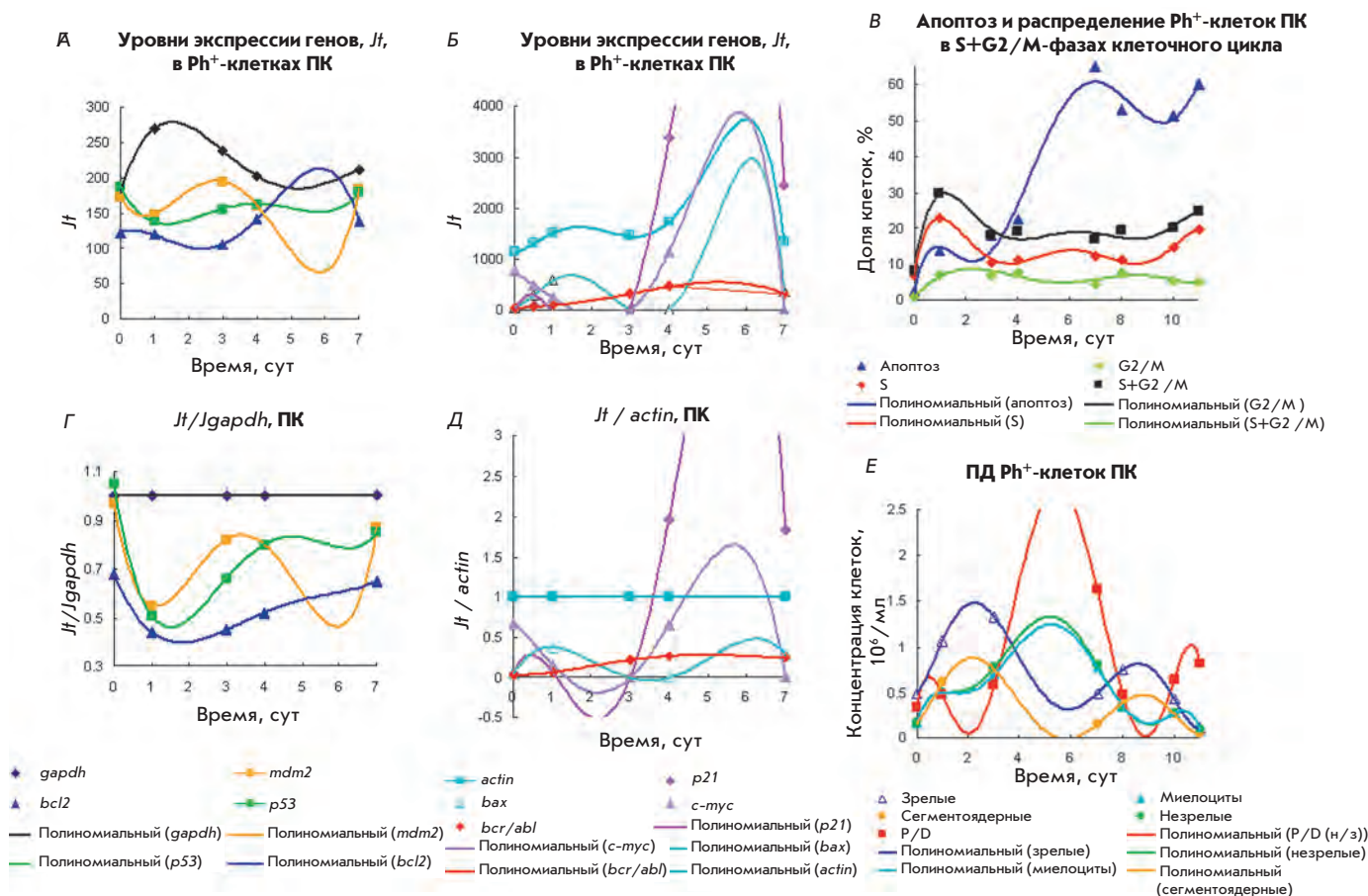


Рис. 9. Экспрессия генов *p21*, *c-мус*, *bcl2*, *p53*, *mdm2*, *bcr/abl*, *bax*, *gapdh*, *actin* (А, Б, Г, Д) в сравнении с кинетикой апоптоза и распределения клеток в фазах клеточного цикла (В), а также ПДК (Е) для  $Rh^+$ -клеток из ПК типа 3 с чередованием этапов по схеме 2/1/2. Детали на рис. 1. *Jt* (А, Б), *Jt*/*Jgapdh* (Г, Д). Этап созревания с [з] > [нз] на 0–4 сут, этап пролиферации с [нз] > [з] на 4–7 сут.

Обнаружено, что экспрессия генов изменяется синхронно с регуляцией пролиферации и дифференцировки, фазами клеточного цикла и апоптозом. Это показывает, что рассмотренные гены участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки пролиферирующих миелоидных  $Rh^+$ -клеток и нейтрофилов. Полученные результаты соответствуют опубликованным данным о закономерностях экспрессии этих генов в других клетках. Они также согласуются с закономерностями пролиферации и дифференцировки, клеточного цикла и апоптоза в других системах. Это свидетельствует о пригодности использованных методов и кинетических кривых, полученных с помощью ОТ-ПЦР, для изучения экспрессии генов. Низкая экспрессия генов в нейтрофилах согласуется с низкой продукцией белка *p21*, ряда специфичных белков и многих факторов в гемопоэтических нейтрофилах [51, 57, 64, 65, 68, 69].

Кинетический подход к изучению экспрессии генов методом ОТ-ПЦР при сравнении с кинетикой пролиферации и дифференцировки клеток в полиномиальной аппроксимации оказывается вполне информативным для исследования регуляции пролиферации и дифференцировки, клеточного цикла и апоптоза гемопоэтических клеток, пролиферирующих с дифференцировкой и созревающих без деления. Полученные результаты позволяют поставить новые вопросы, важные для понимания экспрессии генов и механизмов ХМЛ. Один из них – участвуют ли гены *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-мус* в ингибировании экспрессии *bcr/abl*. Второй вопрос – является ли экспрессия *bcr/abl* генотоксическим или клеточным стрессом для гемопоэтических клеток, и как реагируют на это гены *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-мус*.

Результаты работы свидетельствуют, что повышению скорости пролиферации и агрессивности пролиферирующих  $Rh^+$ -клеток с высокой экспрессией гена

*bcr/abl* способствует пониженная экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, создающая условия для неконтролируемой экспрессии *bcr/abl*. Сверхэкспрессия генов *p53*, *p21*, *mdm2* и *c-myc*, основных регуляторов клеточного цикла, напротив, подавляет экспрессию *bcr/abl* в Ph<sup>+</sup>-клетках и образование клеток *bcr/abl*<sup>+</sup>.

## ВЫВОДЫ

1. Экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*, *bcr*, *bcl2*, *bax*, *gapdh*, *actin* участвует в общей программе регуляции *ex vivo* пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>-клеток при ХМЛ.

Экспрессия этих генов согласуется с пролиферацией и дифференцировкой Ph<sup>+</sup>-клеток трех типов и с их регуляцией чередованием этапов пролиферации (1) и созревания (2) по схемам 1/2/1 и 2/1/2, а также с пролиферацией и дифференцировкой на этапах только пролиферации (тип 1) или только созревания (тип 2).

2. В активно пролиферирующих миелоидных клетках-предшественниках, накапливающихся в S- и G2/M-фазах клеточного цикла, сверхэкспрессируются гены *p53*, *p21*, *mdm2* >> *gapdh*. Сверхэкспрессия этих генов наблюдается в клетках типа 1 и при совпадении максимума клеток в S- и G2/M-фазах с этапом пролиферации в Ph<sup>+</sup>-клетках типов 2 и 3. При созревании и повторных чередованиях этапов пролиферации и созревания, где накапливаются нейтрофилы и миелоциты, экспрессия генов существенно снижается, а при чередовании по схеме 2/1/2 уменьшается также доля клеток в S- и G2/M-фазах клеточного цикла.

3. В нейтрофилах на этапе созревания уровень экспрессии падает в ряду *gapdh* > *actin* > *c-myc*,

*bcr/abl*, *p21* > *p53* > *bcl2* > *bax*; в миелоцитах уровень экспрессии этих генов также не достигает уровня *gapdh*.

4. Экспрессия гена *bcr/abl* в Ph<sup>+</sup>-клетках типов 2 и 3 имеет два пика – снижается на этапе созревания при блокировании апоптоза и накоплении нейтрофилов и усиливается в 2–3 раза на этапе пролиферации с накоплением миелоцитов. Минимуму экспрессии *bcr/abl* соответствует сверхэкспрессия генов *p53*, *mdm2*, *p21*, *c-myc* и максимум клеток в S- и G2/M-фазах клеточного цикла.

5. На этапе созревания ингибируется апоптоз, накапливаются нейтрофилы и уменьшается экспрессия генов *p53*, *mdm2* и *p21*, *c-myc*, *bcr/abl*. Апоптоз в Ph<sup>+</sup>-клетках индуцируется при экспрессии генов *bax* > *bcl2*, *p53*, *p21*, *c-myc* и *gapdh*.

6. В Ph<sup>+</sup>-клетках типа 1, полученных при бластном кризе и в фазе акселерации ХМЛ, с индексами эффективности P/D ~ 5–20 и высоким содержанием клеток CD34<sup>+</sup> и промиелоцитов, наблюдается сверхэкспрессия генов *bcr* > *gapdh* > *bcr/abl* при пониженной экспрессии *p53*, *bcl2*, *mdm*, *p21* < *gapdh*. При этом сверхэкспрессия *bcr/abl* в миелоидных предшественниках сопровождается низкой экспрессией *p53*, *p21*, *mdm2*. Предполагается, что снижение/отсутствие контроля генов регуляторов пролиферации, дифференцировки и клеточного цикла способствует сверхэкспрессии гена *bcr/abl* и активной продукции клеток *bcr/abl*<sup>+</sup>. ●

Работа поддержана Российским фондом  
фундаментальных исследований  
(грант № 06-04-08372-офи).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Сарычева Т.Г., Шмаров Д.А., Тимофеев А.М., Найденова Н.М., Колосова Л.Ю., Колошейнова Т.И. и др. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 3. С. 120–133.
- Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Сарычева Т.Г., Шмаров Д.А., Тимофеев А.М., Найденова Н.М., Саркисян Г.П., Боровкова Т.В. и др. // Рос. биотерапевт. журн. 2009. Т. 8. № 4. С. 53–68.
- Ахлынина Т.В., Гринева Н.И., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Шмаров Д.А., Сарычева Т.Г., Боровкова Т.В., Найденова Н.М., Саркисян Г.П., Тимофеев А.М. и др. // Рос. биотерапевт. журн. 2010. Т. 9. № 2. С. 3–12.
- Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Сарычева Т.Г., Шмаров Д.А., Тимофеев А.М., Найденова Н.М., Саркисян Г.П., Боровкова Т.В. и др. // Рос. биотерапевт. журн. 2010. Т. 9. № 4. С. 61–76.
- Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Саркисян Г.П., Боровкова Т.В., Духовенская Е.А., Манакова Т.Е., Найденова Н.М., Тимофеев А.М., Гринева Н.И. // Цитология. 2007. Т. 49. С. 889–900.
- Гринева Н.И., Барышников А.Ю., Герасимова Л.П., Боровкова Т.В., Саркисян Г.П., Манакова Т.Е., Ахлынина Т.В., Логачева Н.П., Найденова Н.М. // Рос. биотерапевт. журн. 2007. Т. 6. № 2. С. 21–32.
- Dean P.N. // Cell Tissue Kinet. 1980. V. 13. P. 299–302.
- Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
- Edlich F., Banerjee S., Suzuki M., Cleland M.M., Arnoult D., Wang C., Neutzner A., Tjandra N., Youle R.J. // Cell. 2011. V. 145. P. 104–116.
- Levine A.J. // Cell. 1997. V. 88. P. 323–331.
- Ko L.J., Praves C. // Genes Dev. 1996. V. 10. P. 1054–1072.
- Chylicki K., Ehinger M., Svedberg H., Gulberg U. // Cell Growth Differ. 2000. V. 11. P. 561–571.
- Miyashita T., Kraevsky S., Kraevsky M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B., Reed J.C. // Oncogene. 1994. V. 9. P. 1799–1805.
- Wang Y., Okan I., Szekely L., Klein G., Wiman K.G. // Cell Growth Differ. 1995. V. 6. P. 1071–1075.
- Brosh R., Rotter V. // Mol. Biosyst. 2010. V. 6. № 1. P. 17–29.
- Hale A.J., Smith C.A., Sutherland L.C., Stoneman V.E.,



- Williams G.T. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 236. № 1. P. 1–26.
17. van Delft M.F., Huang D.C.S. // *Cell Res.* 2006. V. 15. P. 203–213.
18. Latier L., Cartron P.F., Juin P., Nedelkina S., Manon S., Bechinger B., Vallete F.M. // *Apoptosis.* 2007. V. 12. P. 887–896.
19. Fletcher J.L., Meusburger S., Hawkins C.J., Riglar D.T., Lee E.F., Fairlie W.D., Huang D.C.S., Adams J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 18081–18087.
20. Adams J.M. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 2481–2495.
21. Green D.R., Kroemer G. // *Science.* 2004. V. 305. P. 626–629.
22. Yin X.M., Olevai Z.N., Korsmeyer S.N. // *Nature.* 1994. V. 369. P. 321–323.
23. Yusen. L., Martindale J.L., Gorospe M., Holbrook N.J. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 31–35.
24. Sherr C.J., Roberts J.M. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. P. 1149–1165.
25. El-Deiry W., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B. // *Cell.* 1993. V. 75. P. 817–825.
26. Macleod K.F., Sherry N., Hannon G., Besch D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., Jacks T. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. P. 935–944.
27. Parker S.B., Eichele G., Zhang P., Rawis A., Sands A.T., Bradley A., Olson E.N., Hasper J.W., Elledge S.G. // *Science.* 1995. V. 267. P. 1024–1027.
28. Lee E.W., Lee M.S., Camus S., Ghim J., Yang M.R., Oh W., Ha N.C., Lane D.P., Song J. // *EMBO J.* 2009. V. 28. P. 2100–2113.
29. Freedman D.A., Wu L., Levine A.J. // *Cell Mol. Life Sci.* 1999. V. 55. № 1. P. 96–107.
30. Momand J., Zambetti G.P., Olson D., George D., Levine A.P. // *Cell.* 1992. V. 69. P. 1237–1242.
31. Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. // *Nature.* 1997. V. 387. P. 296–299.
32. Wu L., Levine A.J. // *Mol. Med.* 1997. V. 3. № 7. P. 441–451.
33. Stommel J.M., Wahl G.M. // *Cell Cycle.* 2005. V. 4. № 3. P. 411–417.
34. Xia M., Knezevic D., Tovar C., Huang B., Heimbrook D.C., Vassilev L.T. // *Cell Cycle.* 2008. V. 7. № 11. P. 1604–1612.
35. Momand J., Wu H.H., Dasgupta G. // *Gene.* 2000. V. 242. № 1–2. P. 15–29.
36. Asher G., Lotem J., Sachs L., Kahana C., Shaul Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 13125–13130.
37. Arlinghaus R.B. // *Oncogene.* 2002. V. 21. P. 8560–8567.
38. Hawk N., Sun T., Xie S., Wang Y., Wu Y., Liu J., Arlinghaus R.B. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 2. P. 386–390.
39. Ling X., Ma G., Sun T., Liu J., Arlinghaus R.B. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 2. P. 298–303.
40. Chen S., O'Reilly L.P., Smithgall T.E., Engen J.R. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 383. № 2. P. 414–423.
41. Melo J.V. // *Blood.* 1996. V. 88. P. 2375–2384.
42. Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V. // *Blood.* 2000. V. 96. P. 3343–3356.
43. Primo D., Flores J., Quijano S., Sanchez M.L., Sarasquete M.E., del Pino-Montes J., Gaarder P.L., Gonzalez M., Orfao A. // *Brit. J. Haematol.* 2006. V. 135. P. 43–51.
44. Holyoake T.L., Jiang X., Eaves A.C., Eaves C.J. // *Leukemia.* 2002. V. 16. P. 549–558.
45. Buckle A.M., Mottram R., Pierce A., Lucas G.S., Russell N., Miyan J.A., Whetton A.D. // *Mol. Med.* 2000. V. 6. P. 892–902.
46. Coppo P., Dusanter-Fourt I., Millot G., Nogueira M.M., Dugray A., Bonnet M.L., Mitjavila-Garcia M.T., Le Pasteur D., Guilhot F., Vainchenker W., et al. // *Oncogene.* 2003. V. 22. P. 4102–4110.
47. Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. // *Mol. Cell Biol.* 1995. V. 15. № 10. P. 5531–5541.
48. Traycoff C.V., Haistead B., Rice S., McMahl J., Srouf E.F., Cornetta K. // *Brit. J. Haematol.* 1998. V. 102. P. 759–767.
49. Juin P., Hunt A., Littlewood T., Griffiths B., Swigart L.B., Korsmeyer S., Evan G. // *Mol. Cell Biol.* 2002. V. 22. № 17. P. 6158–6169.
50. Mitchell K.O., Ricci M.S., Miyashita T., Dicker D.T., Jin Z., Reed J.C., El-Deiry W.S. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 6318–6325.
51. Liebermann D.A., Hoffman B. // *Stem Cells.* 1994. V. 12. № 4. P. 352–369.
52. Gartel A.L., Shchors K. // *Exp. Cell Res.* 2003. V. 283. № 1. P. 17–21.
53. Hoffman B., Amanullah A., Shafarenko M., Liebermann D.A. // *Oncogene.* 2002. V. 21. P. 3414–3421.
54. Kleine-Kohlbrecher D., Adhikary S., Eilers M. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006. V. 302. P. 51–62.
55. Berry M.D., Boulton A.A. // *J. Neurosci. Res.* 2000. V. 60. № 2. P. 150–154.
56. Bustin A.S. // *J. Mol. Endocrinol.* 2000. V. 25. P. 169–193.
57. Goldman J.M., Melo J.V. // *Acta Haematol.* 2008. V. 119. № 4. P. 212–217.
58. Khwaja A., Tatton L. // *Blood.* 1999. V. 94. P. 291–301.
59. Josefson D., Myklebust J.H., Lomo J., Sioud M., Blomhoff H.K., Smeland E.B. // *Stem Cells.* 2000. V. 18. P. 261–272.
60. Daniel N.N. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. P. 7254–7263.
61. Bedi A., Sharkis S.J. // *Curr. Opin. Hematol.* 1995. V. 2. P. 12–21.
62. Madrigal-Velázquez M., Avilés A., Neri N., Huerta J., Martínez-Jaramillo G., Mayani H. // *Leuk. Lymphoma.* 2006. V. 47. P. 665–673.
63. Graham S.M., Vass J.K., Holyoake T.L., Graham G.J. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. P. 3111–3120.
64. Liu Y., Martindale J.L., Gorospe M., Holbrook N.J. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 31–35.
65. Berliner N., Hsing A., Graubert T., Sigurdsson F., Zain M., Bruno E., Hoffman R. // *Blood.* 1995. V. 85. P. 799–803.
66. Eaves C., Jiang X., Eisterer W., Chalandon Y., Porada G., Zanjani E., Eaves A. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003. V. 996. P. 1–9.
67. Chin Y.E., Kitagawa M., Su W.C., You Z.H., Iwamoto Y., Fu X.Y. // *Science.* 1996. V. 272. P. 719–722.
68. Steinman R.A., Huang J., Yaroslavskiy B., Goff J.P., Ball E.D., Nguyen A. // *Blood.* 1998. V. 91. P. 4531–4542.
69. Borregaard N., Cowland J.B. // *Blood.* 1997. V. 89. P. 3503–3521.
70. Moore S., Haylock D.N., Levesque J.-P., McDiarmid L.A., Samels L.M., To L.B., Simmons P.J., Hughes T.P. // *Blood.* 1998. V. 92. P. 2461–2470.
71. Matsumura I., Ishikawa J., Nakajima K., Oritani K., Tomiyama Y., Miyagawa J., Kato T., Miyazaki H., Matsuzawa Y., Kanakura I. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. № 5. P. 2933–2943.

## 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](http://www.actanaturae.ru). Договор, подписанный от имени всего авторского коллектива первым или последним автором, следует выслать на адрес редакции: 119311, Москва, а/я 136, редакция журнала «ActaNaturae», 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).
- Во всем тексте, кроме даты поступления, 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, 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, подписей к рисункам, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах:  $T_{пл}$  – температура плавления,  $T_{ф.п}$  – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не  $\mu$ М; нм, но не nm).

- Знак «-» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «•» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистов 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.**

**Sigma** – биохимические реактивы  
для исследований в области естественных наук.

Sigma является мировым лидером в области биохимических продуктов для фундаментальных исследований:

- антитела,
- антибиотики,
- клеточные культуры,
- ферменты,
- субстраты,
- ингибиторы,
- нуклеотиды,
- белки,
- пептиды,
- буферы,
- липиды,
- углеводы.

Sigma – это продукты и информационная поддержка для решения Ваших индивидуальных научных задач!

**SIGMA-ALDRICH™**

- Геномика – самый широкий выбор инструментов для выделения, очистки, амплификации нуклеиновых кислот.
- Функциональная геномика – лучшие решения для исследований РНК.
- Клеточная биология, клеточная сигнализация и нейробиология – антитела, токсины, агонисты и антагонисты рецепторов, продукты молекулярной биологии.
- Протеомика – комплексные решения для выделения, очистки и анализа нативных и рекомбинантных белков.
- Метаболомика – углеводы, аминокислоты, липиды, витамины, ферменты, ингибиторы, гормоны.
- Клеточные культуры – Полный спектр продуктов для культуральных исследований, партнер Европейской Коллекции Клеточных Культур (ECACC)

сайт **memini.ru**

Когда врач и пациент  
говорят на одном языке



### Деменция: диагностика, лечение, уход за больным и профилактика

*По разным оценкам, в России от деменции страдают от 1,2 до 1,9 млн человек. На деле проблема гораздо масштабнее. Из-за утраты больным самостоятельности бремя ухода за ним несут родственники и другие близкие.*

Сайт memini.ru — социальный проект, созданный при поддержке компании «Мерц Фарма», информирует специалистов и родственников пациента о последних достижениях науки и предоставляет площадку для их обсуждения.

Поиск

- Поиск клиники
- Энциклопедия
- Консультации
- Тесты
- Уход

**Общение**

**Темы раздела**

Профилактика деменции

Как влияет на психическое состояние смена обстановки?



ФЕСТИВАЛЬ ИДЕЙ И ЗНАНИЙ  
**ИСКУССТВО НАУКИ**  
**2013**



ПЕРЕЗАГРУЗКА...

