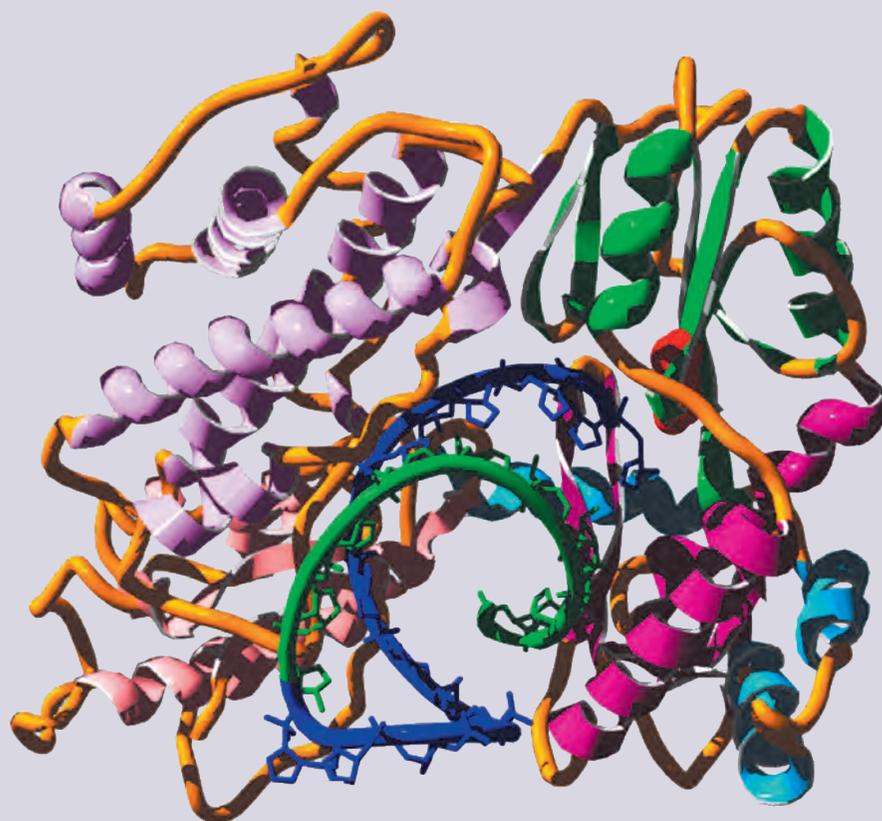


Acta Naturae

Фактор свертывания крови IX для терапии гемофилии В



ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ:
ДОСТИГНУТЫЕ РУБЕЖИ И НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ
СТР. 36

ФУНКЦИИ ТЕЛОМЕРАЗЫ: УДЛИНЕНИЕ
ТЕЛОМЕР И НЕ ТОЛЬКО
СТР. 44

Письмо редакторов

Уважаемые читатели!
Итак, мы подошли к выходу 13-го номера нашего журнала. Несмотря на эту цифру, полагаем, что этот номер для нас счастливый – наконец-то наша длительная борьба за включение в PubMed закончена – вы можете видеть содержание, абстракты и полные тексты всех статей «Acta Naturae» в этой базе данных. Поздравляем всех авторов, читателей и издателей нашего журнала с этим знаменательным событием – теперь «Acta Naturae» стала по-настоящему полноценным изданием! Будем надеяться, что со временем журнал приобретет и достойный импакт-фактор – это в первую очередь зависит от качества вашей работы, уважаемые авторы!

Теперь о текущем номере. «Форум» посвящен важной для всех теме – публикационной активности российских ученых в ведущих мировых журналах и критериям качества этих журналов. Не секрет, что не всегда хорошие результаты наших ученых получают достойное завершение в виде публикаций в высокорейтинговых международных журналах. Полагаем, что материалы «Форума» дадут объективное представление о сложившейся ситуации, а также окажут помощь в решении

достаточно сложных вопросов публикации.

Научная часть журнала, как всегда, открывается обзорами, которых на этот раз три. Прежде всего, это публикация патриарха отечественной физико-химической биологии академика Д.Г. Кнорре. Название обзора не требует комментариев. Полагаем, что эта публикация будет интересна всем. Остальные обзоры посвящены актуальным задачам современной науки о жизни. Как всегда, значительная доля номера посвящена медицинским приложениям рассматриваемых проблем, что, безусловно, отражает общемировые тенденции.

Возвращаясь к началу этой заметки – появлению «Acta Naturae» в PubMed, хочется призвать будущих авторов нашего журнала к публикациям только высокого качества, как это было до сих пор. Редакция со своей стороны будет по-прежнему доброжелательно, но строго подходить к получаемым от вас материалам. Выражаем надежду, что сотрудничество между всеми нами принесет хорошие плоды!

До встречи в следующем номере «Acta Naturae»! ●

Редакционная коллегия

Наука и технологии России – STRF.ru



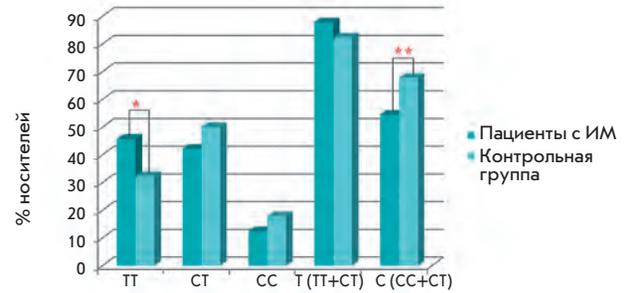
- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются, 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

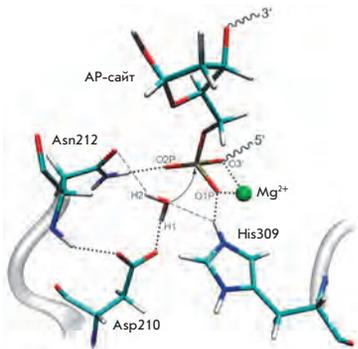
Участие гена *TGFB1* в формировании предрасположенности к инфаркту миокарда

Р. М. Барсова, Б. В. Титов, Н. А. Матвеева,
А. В. Фаворов, И. Н. Рыбалкин, Т. Н. Власик,
Э. М. Тарарак, Т. С. Сухина, Р. М. Шахнович,
М. Я. Руда, О. О. Фаворова

Проведен анализ частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфных участков гена трансформирующего фактора роста бета 1 (*TGFB1*), влияющих на уровень продукции цитокина TGF-β1 у больных инфарктом миокарда, русских по этнической принадлежности. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли гена *TGFB1* в формировании предрасположенности к инфаркту миокарда, в том числе к раннему и повторным.



Частоты носительства аллелей и генотипов полиморфного участка 869T>C гена *TGFB1* у пациентов с инфарктом миокарда и индивидов контрольной группы.



Активный центр полноатомной модели фермент-субстратного комплекса APE1.

Построение механистической полноатомной модели апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека APE1 для виртуального скрининга новых ингибиторов

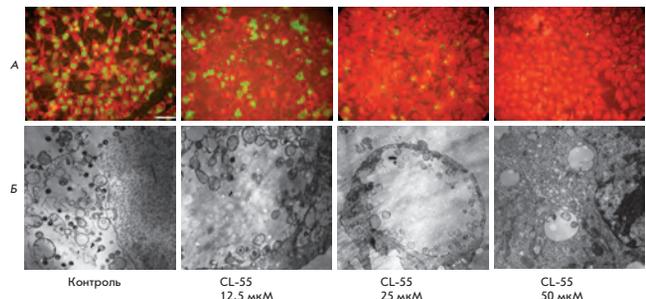
И. Г. Халиуллин, Д. К. Нилов, И. В. Шаповалова, В. К. Швядас

Создана полноатомная молекулярная модель апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1 (APE1) человека – одного из ключевых ферментов системы репарации ДНК. В результате обобщения расчетных и экспериментальных данных обоснован выбор механизма действия APE1 с остатком Asp210 в качестве акцептора протона. Выявлены взаимодействия в активном центре, наиболее важные для связывания субстрата и потенциальных ингибиторов APE1.

Создание ингибиторов системы секреции типа III *S. trachomatis*, подавляющих развитие острой и хронической хламидийной инфекции

Н. А. Зигангирова, Е. С. Заякин, Л. Н. Капотина,
Е. А. Кост, Л. В. Диденко, Д. Ю. Давыдова,
Ю. П. Румянцева, А. Л. Гинцбург

Система секреции типа III (ССТТ) рассматривается как один из основных факторов патогенности грамотрицательных бактерий. ССТТ – перспективная мишень для разработки антибактериальных препаратов широкого спектра действия, не вызывающих развития резистентности и эффективных при острой и хронической формах инфекции. Получен новый класс ингибиторов ССТТ хламидий, обладающих высокой ингибирующей активностью при минимальном повреждении эукариотической клетки.



Дозозависимое ингибирование внутриклеточного цикла развития *S. trachomatis* при действии CL-55.

Acta Naturae

ТОМ 4, № 2 (13), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 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. Габитов, 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. Швьядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Е.А. Новосёлова
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Директор по стратегическому развитию:
Е.Л. Пустовалова

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

Корректурa: 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 80 05.
E-mail: actanaturae@gmail.com, enovoselova@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 июня 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

В. А. Маркусова

Качество научных журналов
и основные критерии для включения
в информационную систему
Web of Science компании
Thomson Reuters 6

М. Н. Коцемир

Публикационная активность
российских ученых в ведущих
мировых журналах 15

ОБЗОРЫ

Д. Г. Кнорре

Физико-химическая биология:
достигнутые рубежи
и новые горизонты. 36

М. П. Рубцова, Д. П. Василькова, А. Н. Малякко,
Ю. В. Нарайкина, М. Э. Зверева, О. А. Донцова

**Функции теломеразы:
удлинение теломер и не только 44**

Н. А. Орлова, С. В. Ковнир,
И. И. Воробьев, А. Г. Габибов

**Фактор свертывания крови IX
для терапии гемофилии В. 62**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Р. М. Барсова, Б. В. Титов, Н. А. Матвеева,
А. В. Фаворов, И. Н. Рыбалкин, Т. Н. Власик,
Э. М. Тарарак, Т. С. Сухина, Р. М. Шахнович,
М. Я. Руда, О. О. Фаворова

**Участие гена *TGFB1* в формировании
предрасположенности
к инфаркту миокарда 76**

И. Г. Халиуллин, Д. К. Нилов,
И. В. Шаповалова, В. К. Швядас

**Построение механистической
полноатомной модели
апуриновой/апиримидиновой
эндонуклеазы человека *AP1*
для виртуального скрининга
новых ингибиторов 83**

Н. А. Зигангирова, Е. С. Заякин, Л. Н. Капотина,
Е. А. Кост, Л. В. Диденко, Д. Ю. Давыдова,
Ю. П. Румянцева, А. Л. Гинцбург

**Создание ингибиторов системы секреции
типа III *C. trachomatis*, подавляющих
развитие острой и хронической
хламидийной инфекции 90**

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Ю. А. Морозов, Л. М. Хромых,
И. И. Дементьева, М. А. Чарная,
Н. Л. Куликова, Д. Б. Казанский

**Рекомбинантный человеческий
циклофилин А тормозит образование
фибринового сгустка *in vitro* 102**

Правила для авторов 106

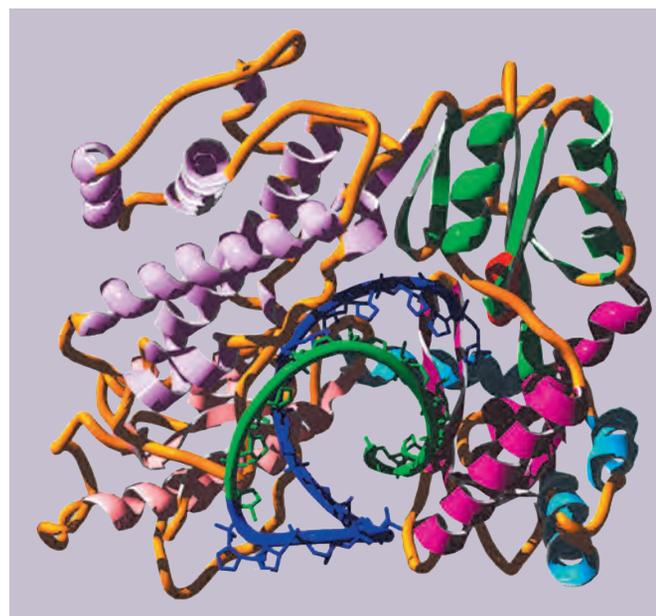


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Пространственная структура комплекса TERT
T. castaneum и РНК-ДНК-дуплекса.
(См. статью Рубцовой и др.)

Качество научных журналов и основные критерии для включения в информационную систему Web of Science компании Thomson Reuters

В. А. Маркусова

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

E-mail: markusova@viniti.ru

Поступила в редакцию 02.05.2012 г.

РЕФЕРАТ Рассмотрены основные критерии отбора научных журналов для включения их в информационную систему Web of Science (WoS) компании Thomson Reuters. К этим критериям относятся: соответствие журнала мировым стандартам, международный состав редколлегии, цитируемость авторов и членов редколлегии, импакт-фактор журнала и доля самоцитируемости в нем. Отмечается необходимость единообразной транслитерации фамилии автора и использования унифицированного англоязычного названия и адреса организации, а также включения информации о финансирующей организации (номер гранта и название фонда).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА научные журналы, импакт-фактор, цитируемость, самоцитируемость, критерии отбора, Journal Citation Report, Web of Science.

БИБЛИОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ИХ РОЛЬ В ОЦЕНКЕ НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ОРГАНИЗАЦИЙ И УНИВЕРСИТЕТОВ

Огромные геополитические изменения, произошедшие за последние 20 лет, и в том числе распад СССР, значительно изменили ландшафт мировой научной системы. С 1990-х волна либерализации рынка привела к созданию экономики нового типа, сопровождаемой беспрецедентным уровнем промышленной активности и роста инвестиций в сектор высоких технологий и связанных с этим структурных изменений в экономике. Правительства многих стран, в том числе развивающихся, рассматривая науку и технику как важнейший фактор экономического роста и развития, поставили задачу построить наукоемкую экономику. В опубликованном в январе 2012 г. Отчете Национального научного фонда США «Пока-

затели науки и техники» – Science & Engineering Indicators-2012 (SEI) www.nsf.gov – представлена детальная картина значительных изменений в численности студентов, аспирантов, пост-доков¹ и исследователей как в США, так и в других индустриальных и развивающихся странах, приведена впечатляющая статистика об инвестициях в науку в США, Европейском союзе, Китае, России и других ведущих странах мира. Рассмотрены меры, принятые развивающимися странами, для развития инфраструктуры науки и техники (S&T), стимулирования промышленных исследований и разработок (R&D), расширения системы высшего образования и построения национальных систем фундаментальных исследований, а также открытия своих рынков для торговли и иностран-

¹ Пост-док – это исследователь, получивший степень PhD и продолжающий исследовательскую и педагогическую деятельность в университете.

ных инвестиций. Вследствие экономического кризиса инвестиции в инновационные исследования и разработки подвергаются экономическому прессингу, в связи с чем все большее внимание уделяется возможностям измерения результативности и эффективности национальных инновационных систем. Специальная 5-я глава Отчета посвящена библиометрической статистике, характеризующей уровень исследований и разработок (R&D) в этих странах. Эта статистика построена на основе данных, содержащихся в расширенной версии Указателя научных ссылок по естественным наукам и технике – Science Citation Index-Expanded (SCI-E), и в расширенной версии Указателя научных ссылок по общественным наукам – Social Science Citation Index-Expanded (SSCI-E), входящих в состав информационной системы «Паутина науки» – Web of Science (WoS) компании Thomson Reuters (далее TR).

Публикация в престижном международном журнале, включенном в WoS, является наиболее надежным способом доведения результатов исследования до мирового научного сообщества. Отметим, что среди специалистов, занимающихся оценками результативности научной деятельности, все научные журналы, включенные в WoS, называются «международными». Престиж научного журнала или его информационная значимость оценивается величиной импакт-фактора журнала (ИФ).

В соответствии с Постановлением Президиума РАН № 211 от 12.10.2010 г. «О создании комиссии по оценке результативности деятельности научных организаций» институты РАН собирают обширную статистику, включая и библиометрические показатели: количество публикаций сотрудников института в различных базах данных (БД), цитируемость и средневзвешенный ИФ организации. В журнале «Вестник РАН» [1] обсуждались «подводные камни», возникающие при использовании этих показателей, и отмечалось, что оценки результативности научной деятельности должны быть основаны на решениях экспертов в соответствующей области знания, а библиометрические показатели служат лишь дополнительным инструментом для принятия решений.

Разразившийся в 2008 г. мировой экономической кризис вынудил многие зарубежные финансирующие организации, поддерживающие фундаментальные исследования, усилить внимание к библиометрии как объективному источнику качества научной продукции. Например, в Великобритании агентство по оценке результативности научных исследований (UK Research Assessment Exercises) связывает распределение финансирования универ-

ситетов с показателями научной продуктивности. Наблюдается также тенденция усиления внимания руководства университетов к публикациям в престижных международных научных журналах с высоким импакт-фактором. К сожалению, негативным последствием этой тенденции стало прекращение выпуска ряда национальных научных журналов по общественным наукам в Нидерландах [2].

Историческим моментом в использовании информационных потоков научной литературы, состоящих из статей и содержащихся в них ссылок, стало опубликование в 1955 г. д-ром Ю. Гарфилдом статьи в журнале «Science» [3], в которой он изложил концепцию указателя научных ссылок. В 1963 г. состоялся выпуск экспериментального Указателя научных ссылок – «Science Citation Index» (SCI) – по естественным наукам и технике. В 1964 г. принадлежавший Ю. Гарфилду Институт научной информации – Institute for Scientific Information (ISI) – начал регулярно публиковать SCI. С 2001 г. ISI принадлежит компании Thomson Reuters – лидеру на рынке мировой индустрии информационных ресурсов.

Научное сообщество довольно быстро оценило возможности использования огромных массивов библиографической информации как инструмента оценки эффективности научной деятельности стран, университетов и научных организаций. Впервые библиометрические показатели результативности науки в США и других странах мира были опубликованы в Отчете «Показатели науки» – «Science Indicators», подготовленном Национальным научным фондом США в 1972 г., и с тех пор выпускаются регулярно раз в два года. С 1996 г. эти отчеты называются Science & Engineering Indicators (SEI).

Принцип построения всех информационных продуктов, выпускаемых ISI, основан на том, что с конца XIX века статья, опубликованная в научном журнале, считается формой научной коммуникации. Известная американская поговорка «Публикуйся или погибнешь» – свидетельство того, что количество опубликованных статей служит значимым фактором профессионального признания исследователя и способствует его продвижению по служебной лестнице. Нобелевский лауреат академик В.Л. Гинзбург отмечал, что «необходимое условие успехов в научной работе, а конкретно, в обеспечении международного признания этих успехов – своевременная публикация этих работ и поддержка лучших из них» [4].

В наши дни, как и 100 лет назад, научная статья содержит ссылки на работы предшественников. Отсутствие ссылок рассматривается как один из признаков низкой квалификации начинающего автора и затрудняет публикацию статьи в научном журнале. Когда автор ссылается на работу других ученых, он тем самым указывает на концептуальное тематическое соотношение между своей и цитированными работами. Ссылки, не являясь строго формализованным языком, позволяют устанавливать внутренние смысловые связи между публикациями [5].

Десятки тысяч статей, заметок, писем в редакцию и обзоров, которые публикуются ежедневно в научных журналах, и миллионы ссылок между этими статьями обеспечивают путь проникновения в коммуникацию знания, способствуют процессам его распространения в науке и получению эмпирических данных о значимости исследования и научной активности «единицы» производства знания.

По мере накопления колоссальных массивов библиографической

информации в ISI и одновременного интенсивного развития вычислительной техники в США появилась возможность создания нового информационного продукта, основанного на взаимосвязях научных журналов. Указатель цитируемости научных журналов – Journal Citation Reports (JCR) по естественным и техническим наукам, содержащий статистику по 3000 научных журналов, был выпущен впервые в 1975 г. и с тех пор издается ежегодно. С 1978 г. публикуется специальная версия этого Указателя по общественным наукам JCR-Social Sciences. «Сейчас, – сказал Ю. Гарфилд, – многие ученые и редакторы делают ужасную ошибку, когда думают, что SCI был создан только для того, чтобы производить его побочный продукт JCR. Основная цель этих ресурсов – информационное обеспечение исследователей, хотя массивы библиографических записей являются неопределимым источником наукометрической информации» [6]. Впервые понятие «**импакт-фактор**» (ИФ) было предложено Ю. Гарфилдом совместно с д-ром И. Шером (Irving Sher) в 1955 г. [7]. Введение этого термина способствовало более качественному отбору научных журналов, осуществляемому библиотеками и информационными службами. ИФ быстро стал популярен как символ научного престижа журнала, хотя его значения сильно различаются в зависимости от области знания и его релевантности предметной области.

Создание и развитие методов анализа библиографической информации привели к появлению новой научной дисциплины – наукометрии. Как отмечал Ю. Гарфилд, «мы являемся свидетелями превращения библиометрических исследований в новую отрасль индустрии – оценку результативности научных исследований,

выполняемых в университетских и научных коллективах» [6]. И хотя в научном сообществе растет недовольство увлечением бюрократами из различных фондов и министерств всевозможными рейтингами и оценками, влияние этих показателей на финансирование фундаментальной науки в мире все более заметно.

За последние 10 лет прогресс в развитии баз данных и информатизация практически всех социальных институтов и процессов привели к созданию сетевых технологий, позволяющих работать с колоссальными массивами информации. Примером такой сетевой технологии является информационная платформа «База знаний» – Web of Knowledge (WOK), одна из составляющих которой – информационная система Web of Science (WoS), включает расширенные версии Указателя SCI-Expanded, Social Science Citation Index-Expanded и Art & Humanities Citation Index. В настоящее время WoS является крупнейшей базой данных по цитированию, в которой индексируются более 800 млн ссылок в статьях, опубликованных с 1900 по 2010 г. Для подготовки WoS обрабатываются 12600 научных журналов. Достигнутый уровень развития сетевых технологий позволяет использовать колоссальные массивы информации в интересах решения наукометрических задач. По существу, мы можем говорить о становлении «сетевой» наукометрии. Сетевая технология позволяет получить более адекватные оценки вклада российской науки в мировую сокровищницу знаний.

В 2005 г. известная компания по изданию научной литературы Elsevier (Нидерланды) создала и разместила в Интернете информационную систему SCOPUS, в состав которой вошли научные статьи и содержащиеся в них ссылки

из 18000 научных журналов начиная с 1996 г. Для подготовки этой системы используются 230 российских журналов. Система SCOPUS обрабатывает больше российских журналов, чем Web of Science, однако она страдает значительными недостатками, в частности, получить надежные результаты при поиске по названиям российских научных организаций и РАН в целом чрезвычайно сложно. Значительная часть журналов, включенных в БД SCOPUS, не отличается высоким качеством. Однако компания Elsevier очень активно действует на постсоветском пространстве, организуя многочисленные семинары для потенциальных пользователей. Процедура поиска организаций в этой системе сложнее, чем в SCI. Войти в систему SCOPUS научному журналу значительно легче, чем в Web of Science, так как «пороговые критерии» в этой БД существенно ниже.

Отметим, что все сопоставительные оценки о вкладе национальной науки в мировую и рейтинги университетов основаны на библиометрических показателях Web of Science. Мониторинг этих библиометрических показателей проводится во всех промышленно развитых странах. Данные о научной продуктивности помогают принимать стратегические решения о том, в каких направлениях должны развиваться научные исследования, оценивать позиции научной организации или университета по отношению к мировым стандартам в той или иной области знания.

ТРЕБОВАНИЯ К НАУЧНЫМ ЖУРНАЛАМ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В ИНФОРМАЦИОННУЮ СИСТЕМУ WEB OF SCIENCE (WoS)

Предлагая журнал для включения в любой зарубежный информационный ресурс, нужно помнить о миссии журнала как основного канала коммуникации науки. Би-

блиографическая информация (включая почтовый и электронный адрес автора, место работы и источник финансирования) и все ссылки в журнале широко используются для сбора библиометрической информации и рассматриваются как показатели результативности научной деятельности, этим параметрам придается большое значение.

Научный журнал выполняет различные функции, которые в целом дают представление:

- о направлениях развития науки и ее достижениях, ее конкурентоспособности и степени интеграции в мировое научное общество;
- о публикационной активности авторов;
- о публикационной активности и рейтинге организаций;
- о степени признания и уровне публикаций в мировом сообществе по данным их цитирования;
- о качестве национальных журналов в сравнении с мировым потоком изданий в соответствующей предметной области и т.д.

Теоретической основой для отбора журналов в SCI послужили исследования английского библиографа С. Брэдфорда. В 1930 г. он сформулировал одну из важнейших закономерностей в распределении публикаций в научной периодике – закон рассеяния. Согласно этому закону, в списке журналов, относящихся к какой-либо тематике и расположенных в порядке убывания числа статей по заданному вопросу, можно выделить три зоны, содержащие одинаковое число статей по заданному вопросу. Эти зоны различаются количеством и качеством составляющих их журналов: в первую зону (зону ядра) входят профильные журналы, посвященные непосредственно заданной тематике; во вторую зону – журналы, частично посвященные смежным областям знания; в самую многочисленную,

третью зону – журналы, тематика которых далека от заданного предмета. Количество журналов в этих трех зонах соотносится как $1 : n : n^2$, где n зависит от тематики [8]. Именно эта закономерность является одним из основных принципов комплектования фондов библиотек и деятельности всех информационных служб.

Например, анализ 7621 журнала, входящего в БД «Указатель цитируемости научных журналов» – **Journal Citation Reports (JCR)**, за 2008 г. показал, что менее 300 журналов получают примерно 50% ссылок и содержат около 30% опубликованных статей. Ядро, состоящее из 3000 научных журналов, публикует около 80% всех статей, из которых 90% были процитированы по крайней мере один раз. Это ядро изменяется в соответствии с эволюцией науки, поэтому задача персонала компании состоит в обновлении списка обрабатываемых журналов, идентификации и оценке новых журналов. При этом журналы, которые стали менее полезными, исключаются.

В первые годы выпуска SCI редакторы научных журналов настороженно относились к включению их изданий в обработку для выпуска SCI, однако в течение нескольких лет ситуация в корне изменилась. Признание научным сообществом научно-информационного значения SCI и его коммерческий успех привели к тому, что на Ю. Гарфилда обрушился поток обращений редакторов, смысл которых сводился к одному «Не убивайте нас и включите в SCI» [9]. С начала 70-х гг. на обложках научных журналов впервые появилась надпись «включен в SCI».

В основу принципов отбора научной периодики для информационных продуктов Thomson Reuters положены три показателя, связанные как с качественной, так и с ко-

личественной характеристикой научных журналов:

- данные по цитируемости;
- соответствие журнала определенным научным и издательским параметрам (journal standard);
- оценка экспертов.

Компания TR использовала полученные на протяжении десятилетий технологические и научные достижения ISI, уникальной информационной службы, впервые начавшей обрабатывать ссылки, содержащиеся в научных статьях, письмах в редакцию, редакторских колонках и рецензиях на книги, опубликованных в журналах. Эти данные служат незаменимым источником информации о количественных характеристиках, используемых для оценки научных журналов, издаваемых в течение длительного времени.

Отбор новых журналов базируется, в основном, на их качественной экспертизе. Процесс оценки научных журналов и их исключение из системы – это непрерывный процесс. Каждые две недели журналы добавляются или исключаются из информационных продуктов TR. Ежегодно персонал компании изучает около 2000 наименований новых научных журналов и выбирает только 10–12% из них.

Мониторинг журналов ведется непрерывно, чтобы гарантировать пользователю соответствие этих журналов высоким научным стандартам и их релевантность информационным ресурсам, в которые они включены. Процесс отбора журналов относится ко всем журналам, входящим в Web of Science, независимо от того, в какую БД они должны быть включены: Science Citation Index-Expanded, Social Science Citation Index-Expanded или Art & Humanities Citation Index. Особое внимание уделяется оценке журналов по общественным и гуманитарным наукам вследствие специфики моде-

лей цитируемости в этих областях знания (более низкие показатели цитируемости, чем в естественных науках).

Редакторы TR, которые отвечают за оценку научных журналов, имеют образование в той области знания, с которой они работают. Поскольку мониторингом журналов они занимаются ежедневно, то они являются экспертами по научным журналам в соответствующих областях знания.

Заглавия научных статей

Заглавия научных статей должны быть информативными:

- в заглавиях статей можно использовать только общепринятые сокращения;

- в переводе заглавий статей и рефератов на английский язык не должны использоваться транслитерации, за исключением непереводаемых названий, имен собственных, названий приборов и др. объектов; недопустим непереводаемый сленг. Это также касается авторских резюме (аннотаций) и ключевых слов.

Географический аспект

Если журнал не является каким-либо выдающимся исключением и его тематика представляет интерес только для небольшого региона, он вряд ли будет включен в ресурсы компании TR. По опыту известно, что лучшие статьи из стран третьего мира были опубликованы в международных журналах, поэтому при необходимости выбора одного из двух научных журналов в той же самой предметной области предпочтение отдается журналу с международной ориентацией. Конечно, такая политика создает дополнительные трудности для авторов из стран третьего мира, пытающихся выйти на международную арену. TR всегда упрекали, а теперь это считается общепризнанным, что эта служба оказывала предпочтение

американским и западноевропейским журналам. Ю. Гарфилд объяснял это «сверхизбыточностью» исследований, выполняемых в США и Западной Европе, результаты которых публикуются на английском, немецком и французских языках. Анализ советских журналов всегда уделялось особое внимание. Если исследование в ISI показывало, что какой-либо советский журнал не обрабатывался для подготовки указателя SCI, но высоко цитировался другими журналами-источниками, то этот журнал включался в обработку. Так было, например, с журналом «Теплофизика». В настоящее время в информационной системе Web of Science отражаются 166 российских журналов, из них 157 в БД Science Citation Index, шесть – в Social Science Citation Index (в действительности, два из них – американские журналы, освещающие политику и экономику СНГ, России и Китая) и три отечественных журнала («Вопросы истории», «Вопросы философии» и «Социологические исследования») в Art & Humanities Citation Index.

Глубина охвата предметной области

Глубина охвата предметной области является одним из критериев оценки при решении вопроса о включении в издания TR нового журнала. На основе личного опыта работы редактора TR с каким-либо профессиональным научным обществом или издателем может быть принято решение об отборе нового журнала, которое это общество или издатель начали выпускать. К сожалению, хорошие показатели качества ранее выпускаемых журналов не всегда гарантируют высокое качество нового журнала. Поэтому руководство TR не связывает себя обязательством о включении любого нового журнала. Естественным является

ожидание от уважаемого издателя, имеющего солидный опыт работы, что выпускаемый новый журнал будет обладать высоким качеством. Однако зачастую издатели, подталкиваемые представителями особо заинтересованной группы специалистов, преждевременно начинают выпускать новый журнал. Более того, огромное сообщество издательских организаций не является монолитным по отношению к издательским стандартам, в том числе существуют значительные расхождения в качестве и периодичности издания журналов. Те же сообщения справедливы для ряда журналов, субсидируемых правительством или частично субсидируемых другими организациями. Судьба таких изданий может зависеть от ежегодных флуктуаций бюджета.

Соответствие журнала основным стандартам

Своевременность опубликования – это один из критериев в процессе оценки. На первом этапе рассмотрения претендентов на включение в ресурсы TR от журнала требуется соответствие заявленной периодичности. Способность журнала выходить четко по расписанию означает, что в портфеле редакции имеется значительное количество неопубликованных материалов. Для журнала неприемлемо нарушать установленные сроки публикации. Для подтверждения своевременности публикации необходимо последовательно направить в компанию TR три текущих выпуска журнала по мере их опубликования.

Компания TR обращает также внимание на соблюдение журналом международной издательской конвенции, которая оптимизирует возможности поиска статей-источников. К ним относятся: информативное название журнала, наглядное представле-

ние названий статей и рефератов, полное библиографическое описание всех содержащихся в статьях ссылок, а также полные адресные данные каждого автора и организации.

В современном мире английский язык является универсальным языком науки. По этой причине TR в первую очередь рассматривает журналы, публикуемые на английском языке или, как минимум, имеющие библиографические описания и рефераты на английском. В WoS представлено достаточное количество журналов, которые публикуют на английском только библиографическую информацию. Однако очевидно, что в дальнейшем журналы, наиболее важные для международного научного сообщества, будут публиковаться полностью на английском языке. Это утверждение особенно справедливо в области естественных наук.

Другой важный показатель стандарта журнала – **институт рецензирования**, который гарантирует качество представляемых материалов в целом и полноту цитируемой литературы.

Содержание журнала

Как отмечалось выше, ядро научной литературы формирует основу для всех научных дисциплин. Это ядро не является статичным, оно меняется в соответствии с эволюцией науки. Наука развивается, появляются новые научные направления, и новые журналы возникают по мере того, как опубликованные материалы по новым научным направлениям достигают критической величины. Задача редакторов – определить, обогатит ли новый журнал информационный ресурс или эта тематика и так представлена достаточно хорошо.

Редакторы TR имеют в своем распоряжении колоссальное количество цитируемой литерату-

ры и огромный опыт ежедневной работы с новыми журналами. Поэтому они в состоянии оценить возникающие научные направления и активные области исследований, опубликованные в новой научной литературе, а также необходимость включения в БД нового научного журнала.

Международный состав авторов и редколлегии

Редакторы TR обращают внимание на международный состав авторов, редакторов и членов редакционно-издательского совета журналов. Это важный фактор для журналов, имеющих целью охватить международное научное сообщество. Задача персонала компании состоит в обновлении списка обрабатываемых журналов, идентификации и оценке новых журналов. Современные научные исследования проводятся на глобальном уровне, и международная направленность журнала, скорее всего, важна для мирового научного сообщества.

Однако имеется много превосходящих региональных журналов, предназначенных скорее для местной аудитории, чем для международной. Как правило, они не отличаются многообразием материалов из разных стран и TR не предъявляет к ним этого требования.

Все региональные журналы, выбранные для включения в информационные БД TR, должны иметь полную библиографическую информацию на английском языке (название статьи, реферат, ключевые слова, адреса авторов) и пройти систему рецензирования. **Все ссылки, содержащиеся в статьях, должны быть на латинице.** В Интернете существует достаточно много бесплатных программ для создания библиографических описаний на латинице. Достаточно набрать в Google поиск со словами «cre-

ate citation» и вы получите несколько бесплатных программ, позволяющих автоматически создавать ссылки по предлагаемым стандартам. Причем описания можно создавать для разных видов публикаций (книга, статья из журнала, Интернет-ресурс и т.п.). Например, сайт <http://www.easybib.com/>.

Анализ цитирования

Процесс оценки научного журнала является уникальным, поскольку редакторы TR обладают огромным массивом данных по цитируемости. Следует обратить внимание на важность интерпретации этих данных и их понимание. Использование количественных показателей цитируемости должно происходить только в контексте журнала, принадлежащего той же предметной области. Например, в области кристаллографии статей не так много, и они не содержат такое количество ссылок, как в области биотехнологии или генетики. Или другое направление – гуманитарные науки, которые отражаются в Art & Humanities Index (A&HI). Статьям, опубликованным в этой области знания, нужно существенно больше времени, чтобы аккумулировать значительное количество ссылок. Но в других областях, таких, как науки о живой природе (life sciences), нет ничего необычного, если статья достигнет пика цитирования через 2–3 года после опубликования. Эти факты обязательно должны учитываться для правильного использования данных.

Оценка показателей цитирования проводится как минимум на двух уровнях. Сначала выявляются показатели цитируемости самого журнала, что определяют по значению импакт-фактора или общего количества ссылок на этот журнал. Затем оценивают показатели цитируемости отдельных авторов. Такой анализ всегда

полезен, особенно в случае нового научного журнала, который пока еще не имеет длительной истории цитируемости.

Подобным образом оцениваются журналы, которые не были включены в БД TR и нуждаются в повторной оценке. Это журналы, у которых наблюдается рост цитируемости вследствие различных причин: из-за перевода статей на английский, изменения редакционной направленности журнала, смены издателя и т.д. **Поскольку в распоряжении TR имеется вся цитируемая литература, представленная более чем в 12500 журналах, компании доступна информация о цитируемости журналов как включенных, так и не включенных в ее информационные ресурсы.**

Самоцитируемость

Самоцитируемость – это количество ссылок на статьи, опубликованные в этом же журнале. Например, если журнал X был процитирован всеми журналами 15000 раз, включая 2000 ссылок в этом же журнале, то доля его самоцитируемости составит $2 \times 100 / 15 = 13.3\%$.

Все журналы имеют тенденцию публиковать статьи по определенной тематике, а поскольку научные достижения опираются на предыдущие исследования, нет ничего необычного в некотором самоцитировании журнала. Однако выявить преднамеренное использование самоцитирования достаточно сложно.

Высокий уровень самоцитируемости не является необычным для журналов-лидеров в соответствующей области знания, поскольку в них постоянно публикуются статьи высокого уровня или посвященные новой, быстро развивающейся научной дисциплине. В идеале, авторы ссылаются на свои предыдущие исследования, поскольку они наиболее

релевантны выполняемой ими работе, независимо от того, в каком журнале они хотят опубликоваться. Однако у таких журналов самоцитирование может стать доминирующим в общем уровне цитируемости. Потенциально самоцитируемость может исказить истинное значение (место) журнала в данной предметной области.

Из всех журналов, включенных в JCR-Science Edition, 80% имеют долю самоцитируемости менее 20%. Значительное превышение этого показателя от нормы вынуждает TR еще раз проэкзаменовать журнал, чтобы определить, как повлияла избыточная самоцитируемость на рост импакт-фактора. Если будет выявлено, что самоцитируемость была использована не надлежащим образом, то импакт-фактор этого журнала не будет опубликован и будет принято решение о целесообразности исключения журнала из Web of Science.

В научном сообществе существует некий миф о том, что редакционные коллегии могут манипулировать импакт-фактором. Приведем любопытный пример. Журнал «The World Journal of Gastroenterology» имел блестящий старт. В 2000 г. его первый ИФ составил 0.993. В последующие годы ИФ достиг 1.445, 2.532 и 3.318 соответственно. Однако в 2004 г. журнал был исключен из JCR. Неизменный рост ИФ произошел не из-за признания этого издания другими авторами, а из-за самоцитирования. При подсчете ИФ выяснилось, что более 90% ссылок составляло его самоцитирование. Журнал снова был включен в JCR в 2008 г., и его ИФ составил 2.081 при доле самоцитирования всего 8%.

М. Маквей (Marie McVeigh), директор отдела по выпуску JCR и библиографической информации, в 2003 г. изучила факторы,

являющиеся причиной высокой самоцитируемости. Оказалось, что самоцитируемость не зависит от объема или предметной направленности журнала, а определяется моделью поведения индивидуальных журналов. Если исключить самоцитирование при подсчете ИФ, то это не повлияет на ранги большинства журналов. Когда М. Маквей выявляет журналы, у которых ИФ в основном основаны на самоцитировании, то она поступает с ними, как родители с шалящими детьми, она их наказывает и дает им время «исправиться».

Журналам отводится на это короткий период времени (обычно несколько лет), за который редакторы научных журналов осознают последствия своей прежней политики и, если они следуют общепринятым нормам и правилам, то их включают в JCR [10].

Адреса организаций и авторов

Необходимо следовать существующим правилам транслитерации и придерживаться единообразного написания (на латинице) фамилий авторов и названий организаций. Эти данные имеют огромное значение для сбора аналитической статистики о деятельности организации и индивидуальных исследователей. В WoS существует специальный раздел «**author finder**», в котором приводятся сведения об организации, в которой работает исследователь и о его публикациях. РАН теряет очень много работ из-за того, что наши ученые забывают о принадлежности их организации к РАН.

Если мы хотим улучшить показатели статистики по РАН в мировых ресурсах, то нужно просить редакторов научных журналов, издаваемых РАН, всегда публиковать одну и ту же англоязычную версию названия института РАН. Конечно, авто-

ры обязаны использовать одно и то же название организации, иначе их реальный вклад будет трудно определить.

Опыт работы автора этой публикации с WoS показал, что отечественные исследователи иногда даже забывают в адресе организации указать страну «Россия».

В компании TR разработан идентификатор исследователя RESEARCHER ID, доступ к которому открыт для всех пользователей Интернета <http://researcherid.com>.

Нужно зайти на сайт по указанному адресу, ввести свои данные и записать принятое англоязычное название института. Далее по электронной почте вы получите информацию о вашем идентификаторе исследователя. Это позволит в дальнейшем автоматически добавлять ваши публикации в ваш профиль, а также сохранять при работе с WoS до 10000 библиографических записей, полученных при поиске.

Источник финансирования

Представленные в конце статьи сведения об источниках финансирования, включая номер гранта, являются важной информацией, позволяющей проводить поиск в WoS. Поэтому редакции журналов должны обращать внимание на наличие таких сведений.

Общественные науки и Social Science Citation Index

Все журналы по общественным наукам проходят через такой же процесс оценки, как и журналы в области естественных и технических наук. Рассматривается следование журнала общепринятым стандартам, включая своевременность выпуска издания, содержание журнала, международный состав и цитируемость. Статистика по цитируемости учитывает, что общие

показатели цитируемости в области общественных наук обычно значительно ниже, чем в области естественных и технических наук. Особое внимание уделяется журналам, тематикой которых являются региональные исследования, поскольку они играют особую роль в области общественных наук. Именно локальная направленность представляет интерес для научных исследований.

Гуманитарные науки и Art & Humanities Citation Index

Для гуманитарных наук так же важно соблюдение журналом общепринятых стандартов, включая своевременный выпуск издания. Модели цитируемости в области гуманитарных наук, однако, не всегда следуют некоторым предсказуемым моделям в области общественных, естественных и технических наук. Кроме того, статьи по гуманитарным наукам часто содержат ссылки на книги, музыкальные произведения, произведения литературы и искусства. Англоязычный текст не является обязательным требованием в некоторых областях гуманитарных наук, в которых национальная специфика объекта исследования не нуждается в этом. Например, исследования по региональной литературе.

Веб-сайт журнала

Сайт научного журнала – это один из показателей его представленности («visibility») в Интернете. На сайте целесообразно указать, какие зарубежные и отечественные БД обрабатывают ваш журнал. При разработке сайта желательно посмотреть зарубежные аналоги вашей предметной области знания. Система ссылок (links) должна быть представлена на русско- и англоязычных сайтах. Правила для авторов по подготовке рукописей должны обновляться и соответствовать возможностям,

предоставляемым новыми информационными технологиями. Необходимо постоянно проводить обновление сайта.

ПРОЦЕДУРА ЗАПРОСА НА ВКЛЮЧЕНИЕ НАУЧНОГО ЖУРНАЛА В ИНФОРМАЦИОННЫЕ РЕСУРСЫ THOMSON REUTERS

При направлении запроса о включении журнала в TR необходимо проверить следующее:

- заглавия научных статей должны быть информативными – это требование рассматривается в экспертной системе как одно из основных;
- в заглавиях статей можно использовать только общепринятые сокращения;
- в переводе заглавий статей и рефератов на английский язык не должно быть транслитераций с русского языка, кроме непереводимых названий – имен собственных, приборов и др.; не используется непереводимый сленг, известный только русскоговорящим специалистам;
- рецензирование каждой научной публикации в журнале;
- соблюдение периодичности выпуска издания;
- наличие ISSN (для печатного и/или электронного издания);
- наличие списков цитируемой литературы в латинском алфавите;
- наличие англоязычного названия журнала;
- год публикации;
- том и номер выпуска;
- наличие англоязычного названия статьи;
- номера страниц или номер статьи (требуется то или другое, номер статьи не должен быть номером DOI). Если журнал имеет нумерацию страниц и нумерацию статей, перечислите их отдельно так, как показано в скобках (art. № 23, pp. 6–10, а не 23.6.–23.10);
- наличие англоязычного резюме к каждой научной статье;

– фамилии авторов и адреса, включая электронный адрес автора, который отвечает за распространение репринтов;

– все идентификаторы статьи, такие, как DOI, PII и другие номера статьи;

– полное содержание каждого выпуска должно включать сведения о страницах/номере каждой статьи (кроме тех случаев, когда в журнале была опубликована одна статья);

– информация об источнике финансирования и номер гранта (если имеется);

– присвоение этих идентификаторов как в статьях-источниках, так и в ссылках помогает использованию цитирующих и цитируемых статей и правильной идентификации службами реферирования и индексирования.

Для рассмотрения вопроса о включении журнала в информа-

ционную систему Web of Science необходимо:

1. оформить бесплатную подписку на журнал;

2. отправить сразу несколько последних выпусков журнала;

3. отправлять каждый последующий номер журнала по адресу: Thomson Reuters ATTN: PUBLICATION PROCESSING, 1500 Spring Garden Street, Fourth Floor, Philadelphia, PA 19130 USA. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов В.В., Варшавский А.Е., Маркусова В.А. // Вестник РАН. 2011. № 7. С. 587–593.
2. Halfman W., Leydesdorff L. Is inequality among universities increasing? Gini coefficients and the elusive rise of elite universities. www.loet@leydesdorff.net
3. Garfield E. Citation Indexes for Science // Science. 1955. V. 122. № 3159. P. 108–111.
4. Гинзбург В.Л. Сами виноваты? Почему Россия получает мало Нобелевских премий // Поиск. 2007. № 47. С. 4.
5. Price D.J. de S. Little Science, Big Science. New York: Columbia University Press, 1963.
6. Garfield E. A Century of Citation Indexing. Key note address // 12th COLLNET Meeting, September 20–23, 2011. Istanbul: Istanbul Bilgi University, 2011.
7. Garfield E. The Agony and the Ecstasy – The History and Meaning of the Journal Impact Factor // J. Amer. Med. Association. 2006. V. 295. № 1. P. 90–93.
8. Михайлов А.И., Черный А.И., Гиляревский Р.С. Научные коммуникации и информатика. М.: Наука, 1976. 435 с.
9. Garfield E. Errors – theirs, ours, yours // Current Contents. 1974. V. 25. P. 5–6.
10. Gaming the Impact Factor Puts Journal In Time-out. www.scholarlykitchen.sspnet.org

14 мая 2012 г. прошло расширенное заседание Научно-издательского совета РАН с представителями компании Thomson Reuters во главе с вице-президентом Д. Тестой (J. Testa). Г-н Теста выступил с докладом о политике отбора научных журналов в базу данных Web of Science и ответил на вопросы аудитории.

По итогам расширенного заседания НИСО прошла встреча Д. Тесты с вице-президентами РАН А.И. Григорьевым и С.М. Алдошиным. На встрече обсуждалась дальнейшая совместная работа РАН и ком-

пании Thomson Reuters по следующим направлениям:

- возможность расширения охвата российских журналов для включения в базу данных Web of Science;
- итоги бесплатного тестового доступа институтов РАН к БД Web of Science;
- проведение ИПРАН совместно с компанией Thomson Reuters международной конференции по проблемам наукометрии 10–12 октября 2013 г.;
- создание рабочей группы по вопросам библиометрии и сотрудничества между РАН и компанией Thomson Reuters.

Публикационная активность российских ученых в ведущих мировых журналах

М. Н. Коцемир

Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000, Москва, ул. Мясницкая, 18

E-mail: mkotsemir@hse.ru, maxkotsemir@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.04.2012 г.

РЕФЕРАТ Цель данного аналитического обзора – определение динамики и структуры публикаций российских авторов, а также определение места российской науки в глобальном научном процессе. Методы библиометрического анализа позволяют проводить количественный анализ научной кооперации, результативности и других аспектов функционирования науки. Информационная база для таких исследований – материалы баз данных научного цитирования, которые содержат библиографические описания статей, опубликованных в научных журналах (в основном англоязычных) по значительному числу областей науки. На основе этих данных рассчитываются различные показатели (общий объем и динамика числа публикаций, цитируемость, уровень соавторства, индекс специализации и другие) на разных уровнях агрегирования (отдельные исследователи, научные организации, страны и регионы мира). Результаты библиометрических исследований могут быть использованы для изучения трендов развития различных научных направлений, оценки результативности деятельности научных организаций, общей оценки научного потенциала страны (его слабых и сильных мест), выявления наиболее продуктивных ученых в разных областях науки, проведения межстрановых сравнений, изучения сетей взаимодействия научных коллективов.

В статье анализируются базовые показатели публикационной активности ученых в России и ведущих странах в период 2001–2011 гг. Публикационная активность российских ученых рассматривается в контексте отдельных областей науки. Это позволит выявить области специализации отечественных научных работ. Также исследуется динамика высокоцитируемых публикаций и показателей международного научного сотрудничества российских исследователей. Для анализа публикационной активности используются материалы базы данных научного цитирования Web of Science, а также аналитического электронного ресурса Essential Science Indicators, разработанного на базе материалов Web of Science компанией Thomson Reuters.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА публикационная активность, библиометрические индикаторы, публикации российских авторов, уровень цитируемости, межстрановой анализ.

ВВЕДЕНИЕ

В библиометрических исследованиях используются международные и национальные индексы научного цитирования, которые содержат библиографические описания статей, а также пристатейные списки литературы. В российской статистической практике публикационная активность стала оцениваться сравнительно недавно [1–5]. В последние годы активно развивается российский индекс научного цитирования (РИНЦ), однако на сегодняшний день он не отражает публикационную активность российских ученых в до-

статочном объеме. Поэтому в настоящей статье информационной базой будут служить материалы базы данных научного цитирования Web of Science и электронного аналитического ресурса Essential Science Indicators, разработанного на базе Web of Science. Web of Science была создана Юджином Гарфилдом в 1964 г. Это самая первая в мире база данных научного цитирования. Владелец базы – информационная корпорация Thomson Reuters. По состоянию на 2011 г. Web of Science сохранила порядка 48 млн записей научных публикаций более чем

в 15 тыс. названий научных изданий. База также охватывает материалы более 148 тыс. различных конференций. Глубина охвата научных публикаций – до 1900 г.

В Essential Science Indicators представлены данные по трем базовым показателям публикационной активности (число публикаций, число ссылок, полученных этими публикациями, а также среднее число ссылок на одну публикацию) для 144 стран мира за последние 10 лет. Этот десятилетний промежуток времени в свою очередь разбивается на пятилетние подпериоды (на мо-

Таблица 1. Языковая структура российских публикаций: 2001–2011 (%)

Язык	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Английский	94.1	91.3	93.0	93.0	93.9	94.2	94.0	95.0	94.7	94.4	94.8
Русский	4.6	6.3	4.5	5.0	4.1	3.8	4.4	3.5	3.1	1.9	3.9
Прочие	1.3	2.5	2.5	2.0	2.0	2.0	1.6	1.5	2.2	3.7	1.3

Примечания. 1. Языковая структура российских публикаций была рассчитана как динамика удельного веса российских публикаций на рассматриваемых в таблице языках (английский язык, русский язык и прочие языки) в общем числе публикаций российских авторов для каждого рассмотренного в таблице года.

2. Для получения первичной информации с портала Web of Science использовалась опция «Analyze results» (для выбранной страны «Россия» и выбранного временного периода «2001–2011 гг.»), а затем исходные данные загружались из категории «Languages». Для анализа отбирались следующие типы документов: научная статья («article»), доклад на конференции («proceedings paper») и обзор («review»).

Источник: расчеты авторов по материалам Web of Science. Использовались все базы данных Web of Science.

мент написания статьи в Essential Science Indicators были доступны данные для 2001–2005, 2002–2006, 2003–2007, 2004–2008, 2005–2009, 2006–2010 и 2007–2011 гг.). Публикации сгруппированы по основным 22 областям науки (согласно классификации Essential Science Indicators).

При межстрановом анализе в большинстве случаев мы будем рассматривать страны, в которых суммарное за 2001–2011 гг. число публикаций в научных журналах, индексируемых в Web of Science, превышало 10000. Полученная таким образом выборка состоит из 57 стран. В отдельных случаях будут рассматриваться все страны мира.

Публикация считается принадлежащей определенной стране, если ее автор (или хотя бы один из соавторов) в своем рабочем адресе указал эту страну. Такие выражения, как «публикации российских авторов», «российские публикации», «публикации России», «публикации авторов из России», используются как синонимы. Под «публикацией» подразумеваются следующие типы документов – научная статья («article»), доклад на конференции («proceedings paper») и обзор («review»).

При межстрановом анализе публикационной активности необходимо принимать во внимание тот факт, что в базах данных научного цитирования доминируют англоязычные публикации. Публикации на английском языке составляли 94.8% от общего числа публикаций, охваченных базой Web of Science за 1990–2011 гг., на французском языке – всего лишь 1.2%, на немецком – 1.1%, на русском – только 0.6%, на японском – 0.22%, а на китайском языке – 0.1%. Кроме того, в этих базах данных недостаточно полно отражена публикационная активность в таких областях, как математика, компьютерные, естественные и технические науки, и наименее полно – в социальных и гуманитарных науках. Эти ограничения необходимо принимать в расчет при интерпретации библиометрических данных.

МИРОВЫЕ ТРЕНДЫ ПУБЛИКАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ

Базовый показатель публикационной активности – это число публикаций в реферируемых научных журналах. При сравнении публикационной активности в разных странах также анализируют удельный вес публикаций

стран в общемировом числе публикаций и позиции стран в мировом рейтинге по числу публикаций. Ранее уже упоминалось, что базы данных международного цитирования охватывают незначительное число неанглоязычных публикаций. Следовательно, анализ публикаций авторов из неанглоязычных стран будет касаться в основном их англоязычных статей, которые составляют относительно невысокую долю от совокупного потока публикаций этих стран. Например, в Web of Science индексировалось порядка 10% всех российских публикаций [1]. Таким образом, для таких стран, как Россия, Япония, Китай, Индия, страны Юго-Восточной Азии, Латинской Америки и Ближнего Востока, показатели публикационной активности оказываются искусственно заниженными.

В структуре Web of Science выделяются следующие базы данных:

- Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED);
- Social Sciences Citation Index (SSCI);
- Arts & Humanities Citation Index (A&HCI);
- Conference Proceedings Citation Index-Science (CPCI-S);

Таблица 2. Динамика российских публикаций: 2001–2011

Год	Число российских публикаций	Удельный вес российских публикаций в общемировом числе публикаций, %
2001	28 665	2.97
2002	29 612	3.00
2003	28 648	2.75
2004	28 835	2.64
2005	28 281	2.45
2006	27 462	2.24
2007	28 926	2.16
2008	30 673	2.16
2009	30 904	2.09
2010	29 224	2.06
2011	28 573	2.12

Примечание. Для получения первичной информации с портала Web of Science использовалась опция «Analyze results» (для выбранной страны «Россия»), а затем исходные данные загружались из категории «Publication years». Для анализа отбирались следующие типы документов: научная статья («article»), доклад на конференции («proceedings paper») и обзор («review»).

Источник: расчеты авторов по материалам Web of Science. Использовались все базы данных Web of Science.

– Conference Proceedings Citation Index–Social Science & Humanities (CPCI-SSH).

В настоящей работе во всех расчетах, таблицах и рисунках используются материалы всех баз данных, входящих в состав Web of Science.

На портале Web of Science (с помощью опции «Analyze results») данные о научных публикациях можно представлять в разных разрезах. В частности, языковая структура публикаций российских авторов в научных журналах, индексируемых в Web of Science, выглядит следующим образом (табл. 1). Подавляющее большинство (93 – 95%) работ – это публикации на английском языке. В исследуемый период на публикации на русском языке приходится от 1.9 до 6.3% общего числа российских работ в научных журналах, индексируемых в Web of Science.

Число российских публикаций в ведущих мировых журналах в 2011 г. по сравнению с 2001 г. не-

значительно сократилось (табл. 2). Их наименьшее число за десятилетие пришлось на 2006 г. (27462 публикации), после чего наметилась позитивная динамика. Аналогично менялся и удельный вес российских публикаций в их общемировом потоке. Он снизился с 2.97 в 2001 г. до 2.12% в 2011 г.

В последнее десятилетие США были лидером по числу публикаций в ведущих научных журналах (табл. 3). Россия в этом рейтинге потеряла 6 позиций за 2001–2011 гг., опустившись с 9-го на 15-е место. Россия пропустила вперед Испанию, Индию, Австралию, Южную Корею, Бразилию и Нидерланды. Положение Канады и стран Западной Европы в этом рейтинге практически не изменилось.

Среди стран исследуемой выборки наибольший прирост числа публикаций (в 11.5 раз за 2001 – 2011 гг.) показал Иран (табл. 4). Высоким (более чем на 200% за указанный период) ростом числа работ в ведущих научных

журналах отличались также Малайзия, Пакистан, Китай, Саудовская Аравия, Таиланд и Турция. Из европейских стран наибольший их прирост показала Португалия (149%). Сокращение числа публикаций в научных журналах, индексируемых в Web of Science, в 2011 г. по сравнению с 2001 г. наблюдалось в Японии (на 7.4%), Венесуэле (на 8.2%) и Беларуси (на 15.9%).

Страны с быстрорастущей публикационной активностью за указанный период улучшили свое положение в рейтинге по числу публикаций. Иран «отыграл» 23 рейтинговые позиции (переместившись с 42-го места на 19-е), Малайзия – 15 (с 45-го места на 34-е), Пакистан – 11, Португалия – 9, Турция – 7, Колумбия – 6, Саудовская Аравия, Таиланд, Бразилия и Китай – по 4. Соответственно многие государства, находящиеся за пределами первой десятки этого рейтинга, существенно ухудшили свое положение. 6 и более позиций потеряли (помимо России) такие страны, как Венесуэла (6 позиций), Венгрия, Болгария, Словакия (по 7 позиций), Беларусь (8 позиций), а также Украина (12 позиций).

Динамичный рост потока научных публикаций в развивающихся странах привел к тому, что доминирование США по числу публикаций несколько сократилось. В 2001 г. на долю США приходилось 31.5% общемирового количества научных работ, а в 2011 г. – 27.1%. При этом в 2001 г. удельный вес страны, занимавшей второе место в рейтинге (Япония), составлял 8.9%, а к 2011 г. он вырос до 13.6% (в 2011 г. эту позицию занимал Китай).

Данные о публикационной активности разных стран в электронном аналитическом ресурсе Essential Science Indicators, разработанном на базе материалов

Таблица 3. Первые 25 стран мирового рейтинга по числу публикаций

№	2001			2011		
	Страна	Число публикаций страны	Удельный вес страны в общемировом числе публикаций, %	Страна	Число публикаций страны	Удельный вес страны в общемировом числе публикаций, %
1	США	303 917	31.48	США	366 507	27.13
2	Япония	86 096	8.92	Китай	184 029	13.62
3	Великобритания	83 582	8.66	Великобритания	105 411	7.80
4	Германия	77 982	8.08	Германия	97 070	7.19
5	Франция	55 259	5.72	Япония	79 751	5.90
6	Китай	44 575	4.62	Франция	67 990	5.03
7	Канада	38 645	4.00	Канада	58 855	4.36
8	Италия	38 453	3.98	Италия	55 253	4.09
9	Россия	28 667	2.97	Испания	50 256	3.72
10	Испания	26 350	2.73	Индия	46 172	3.42
11	Австралия	25 483	2.64	Южная Корея	45 971	3.40
12	Нидерланды	21 779	2.26	Австралия	44 244	3.28
13	Индия	19 272	2.00	Бразилия	34 122	2.53
14	Южная Корея	19 194	1.99	Нидерланды	33 523	2.48
15	Швеция	17 422	1.81	Россия	28 577	2.12
16	Швейцария	15 566	1.61	Тайвань	28 553	2.11
17	Бразилия	13 324	1.38	Швейцария	24 655	1.83
18	Тайвань	13 018	1.35	Турция	23 470	1.74
19	Польша	12 824	1.33	Иран	21 768	1.61
20	Бельгия	11 964	1.24	Швеция	21 389	1.58
21	Израиль	10 836	1.12	Польша	20 818	1.54
22	Финляндия	8 822	0.91	Бельгия	18 686	1.38
23	Австрия	8 779	0.91	Дания	13 468	1.00
24	Дания	8 754	0.91	Австрия	12 852	0.95
25	Турция	7 233	0.75	Израиль	12 493	0.93

Примечания. 1. Для получения информации об общемировом числе публикаций на портале Web of Science во вкладке «Advanced search» вводился поисковый запрос «PY=2001 AND 2011», а затем с использованием опции «Analyze results» исходные данные загружались из категории «Document types». Для анализа отбирались следующие типы документов: научная статья («article»), доклад на конференции («proceedings paper») и обзор («review»).

2. Для получения информации о числе публикаций в исследуемых странах на портале Web of Science использовалась опция «Analyze results» (для 2001 и 2011 гг.), а затем исходные данные загружались из категории «Countries/territories». Для анализа отбирались следующие типы документов: научная статья («article»), доклад на конференции («proceedings paper») и обзор («review»).

3. Сумма удельных весов по всем странам превышает 100%, так как некоторые публикации написаны в соавторстве исследователями из нескольких стран.

Источник: расчеты авторов по материалам Web of Science. Использовались все базы данных Web of Science.

Таблица 4. Страны исследуемой выборки с наиболее динамично растущим числом публикаций: 2001 – 2011

Страна	Число публикаций		Увеличение числа публикаций в 2001–2011 гг. (раз)
	2001	2011	
Иран	1 891	21 768	11.51
Малайзия	1 216	8 713	7.17
Китай	44 575	184 029	4.13
Пакистан	739	5 682	5.47
Саудовская Аравия	1 451	5 651	3.89
Таиланд	1 727	5 991	3.47
Турция	7 233	23 470	3.24

Примечание. Для получения первичной информации с портала Web of Science использовалась опция «Analyze results» (для представленных в таблице стран), а затем исходные данные загружались из категории «Publication years». Для анализа отбирались следующие типы документов: научная статья («article»), доклад на конференции («proceedings paper») и обзор («review»).

Источник: расчеты авторов по материалам Web of Science. Использовались все базы данных Web of Science.

Web of Science, представлены в подразделе «Countries/territories» раздела «Citation Rankings» (опция «View table of graph data»). Для заданной страны для пятилетних временных промежутков (а также для 2001–2011 гг.) приводятся следующие показатели (опция «View table of graph data»):

- 1) число публикаций – показатель «Number of papers»;
- 2) число ссылок на публикации – показатель «Number of citations»;
- 3) среднее число ссылок в расчете на одну публикацию (средняя цитируемость одной публикации) – показатель «Average citations per paper».

Последний показатель – это, по сути, отношение второго показателя к первому. Все указанные показатели могут быть рассчитаны как для каждой из 22 областей науки, так и для общего потока публикаций – категория «All fields» (все области науки).

Аналогичные показатели приводятся и для общемирового потока научных публикаций. Данные об общемировых показателях публикационной активности представлены в подразделе «Baselines» раздела «Citation Analysis» (опция «View field rankings table»). Так же как и в случае отдельных стран, общемировые показатели публикационной активности можно рассчитать как для 22 областей науки, так и для общего потока публикаций для заданных пятилетних периодов, а также для 2001–2011 гг.

Здесь необходимо отметить, что сумма числа публикаций (и числа ссылок на них) по всем областям науки дает общее число публикаций страны за определенный пятилетний временной интервал. То есть 22 области наук, выделенные в Essential Science Indicators, тематически не пересекаются друг с другом. В то же

время сумма публикаций (и числа ссылок на них) по всем странам не дает общемирового числа публикаций (и числа ссылок на них) в силу того, что часть публикаций подготовлена в международном соавторстве, и такие публикации приписываются всем странам, авторы которых принимали участие в ее подготовке. Соответственно при суммировании публикаций (и ссылок на эти публикации) по странам некоторые публикации (и ссылки на такие публикации) будут учитываться несколько раз. Электронный аналитический ресурс Essential Science Indicators позволяет получить данные о фактическом числе научных публикаций (и ссылок на них) для всех стран мира (раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table» указанного электронного ресурса).

Российская структура научных работ по областям науки отличалась от мировой (табл. 5). Наиболее значимая область науки России – это физика, на которую приходилось 28% от суммарного за 2001–2011 гг. числа научных публикаций. Вторая по значимости область наук – это химия (22.2%), а третья – технические науки (7.6%).

В мировой структуре науки самая значимая область – это клиническая медицина, на которую в 2001–2011 гг. приходилось 21.0% общего числа научных работ. Вторая по значимости область наук – химия (12.0%), а третья – физика (9.3%). В российской структуре науки работы по клинической медицине, компьютерным наукам и общественным наукам были представлены гораздо слабее, чем в общемировой структуре. Существенных сдвигов в мировой и российской структуре науки в исследуемый период не наблюдалось. Тем не менее следует отметить, что в российской структуре на-

Таблица 5. Структура публикаций по областям науки (%)

Область науки	Общемировая структура		Российская структура	
	2001–2005	2007–2011	2001–2005	2007–2011
Биология и биохимия	6.08	5.17	4.01	3.48
Иммунология	1.33	1.14	0.16	0.20
Клиническая медицина	20.79	21.24	4.70	5.09
Компьютерные науки	2.97	2.09	1.20	0.84
Математика	2.47	2.81	4.42	5.46
Материаловедение	4.60	4.70	6.25	6.01
Микробиология	1.66	1.69	1.27	1.20
Молекулярная биология и генетика	2.83	2.78	2.12	2.24
Мультидисциплинарные исследования	0.17	0.17	0.07	0.13
Науки о Земле	2.83	2.92	7.11	8.08
Науки о космосе	1.31	1.15	3.31	3.23
Науки о растениях и животных	5.56	5.42	2.29	2.60
Науки об охране окружающей среды и экология	2.57	2.88	0.90	1.50
Нейронауки и поведенческие науки	3.16	2.85	0.78	0.78
Общественные науки	4.06	5.12	1.08	0.95
Психиатрия и психология	2.38	2.49	0.50	0.44
Сельскохозяйственные науки	1.85	2.30	0.70	0.77
Технические науки	8.02	8.66	7.95	7.27
Фармакология и токсикология	1.79	1.96	0.19	0.46
Физика	9.71	8.98	28.29	27.34
Химия	12.31	11.62	22.58	21.76
Экономика и бизнес	1.54	1.84	0.10	0.18

Примечание. Распределение публикаций по областям науки рассчитывается как динамика удельных весов публикаций по заданным областям науки в общем числе публикаций.

Источник: расчеты авторов по материалам Essential Science Indicators (раздел «Citation Rankings», подраздел «Countries/territories» страна «Russia», опция «View table of graph data» для показателей по России; раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table» для общемировых показателей).

учных работ значительно вырос удельный вес публикаций по фармакологии и токсикологии, экономике и бизнесу, мультидисциплинарным исследованиям, а также по наукам об охране окружающей среды и экологии.

Сопоставляя структуру научных работ отдельной страны по областям науки с аналогичной мировой структурой, можно рас-

считать индекс научной специализации страны [1]. Этот показатель рассчитывается как отношение удельного веса публикаций в области наук i в общем числе публикаций страны j к аналогичному показателю для мировой структуры публикаций. Если он больше единицы для научных работ в какой-либо дисциплине, соответственно данная дисциплина относится

к сфере научной специализации страны.

Главные области специализации российской науки – это физика, науки о космосе и науки о Земле (рис. 1). К значимым областям специализации относятся математика, химия и материаловедение. Отечественные научные работы по фармакологии и токсикологии, экономике и бизнесу,

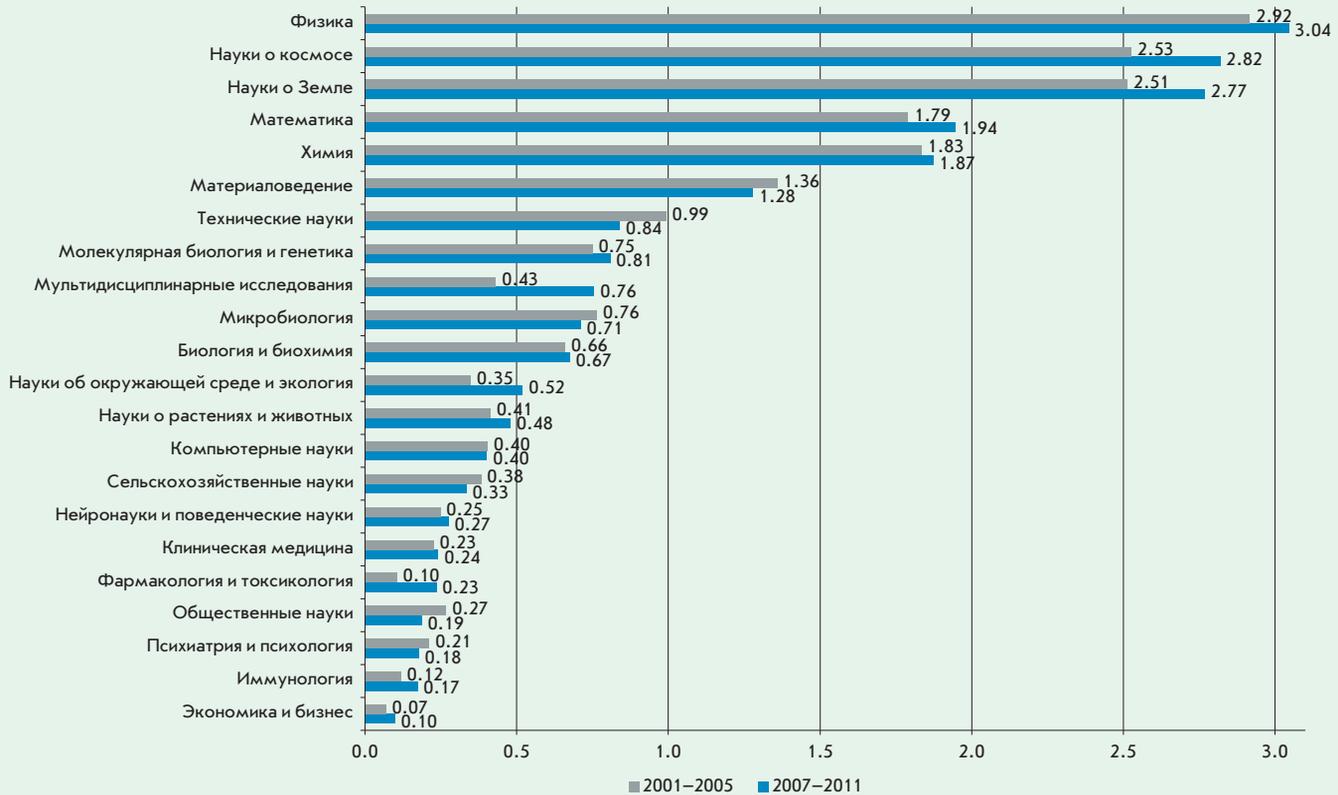


Рис. 1. Индексы специализации российских публикаций по областям науки. Источник: расчеты авторов по материалам Essential Science Indicators (раздел «Citation Rankings», подраздел «Countries /territories» страна «Russia», опция «View table of graph data» для показателей по России; раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table» для общемировых показателей).

а также мультидисциплинарным исследованиям показали наиболее существенный рост индексов специализации в 2007–2011 гг. по сравнению с 2001–2005 гг. В области общественных наук за указанный период, наоборот, наблюдалось самое значительное сокращение индекса специализации.

Российские авторы внесли значительный вклад в мировое количество научных работ (рис. 2) в области физики (7.9% от общемирового числа), наук о космосе (7.1%) и наук о Земле (6.7%). Российские публикации по химии, математике и материаловедению также довольно значимо представлены в мировой науке: от 3 до 5% их общемирового потока в 2001–2011 гг. Как указывалось

ранее, вклад отечественных научных публикаций в общемировой поток довольно значительно снизился за 2001–2011 гг. Проанализируем это сокращение в разрезе областей наук. Наиболее сильное сокращение вклада российских публикаций в общемировой поток в 2007–2011 гг. по сравнению с 2001–2005 гг. наблюдалось в области общественных наук, психиатрии и психологии, материаловедения, а также технических наук. Значительно сократился удельный вес страны и в остальных областях ее научной специализации. В то же время позиции России в области мультидисциплинарных исследований, а также фармакологии и токсикологии в исследуемый период усилились.

ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ЦИТИРОВАНИИ ПУБЛИКАЦИЙ

Для оценки научного влияния (impact) публикаций того или иного исследователя или страны в целом используют показатели цитируемости. Базовый показатель здесь – средняя цитируемость одной публикации, который рассчитывается как отношение числа ссылок, полученных публикациями данной страны, к числу этих публикаций в научных журналах, реферируемых базой научного цитирования, за определенный период времени. Этот показатель обычно оценивается для временного интервала (чаще всего 3–5 лет), а не для одного года. За этим стоит следующая логика: чтобы публикация, размещенная в базе данных международного цитиро-

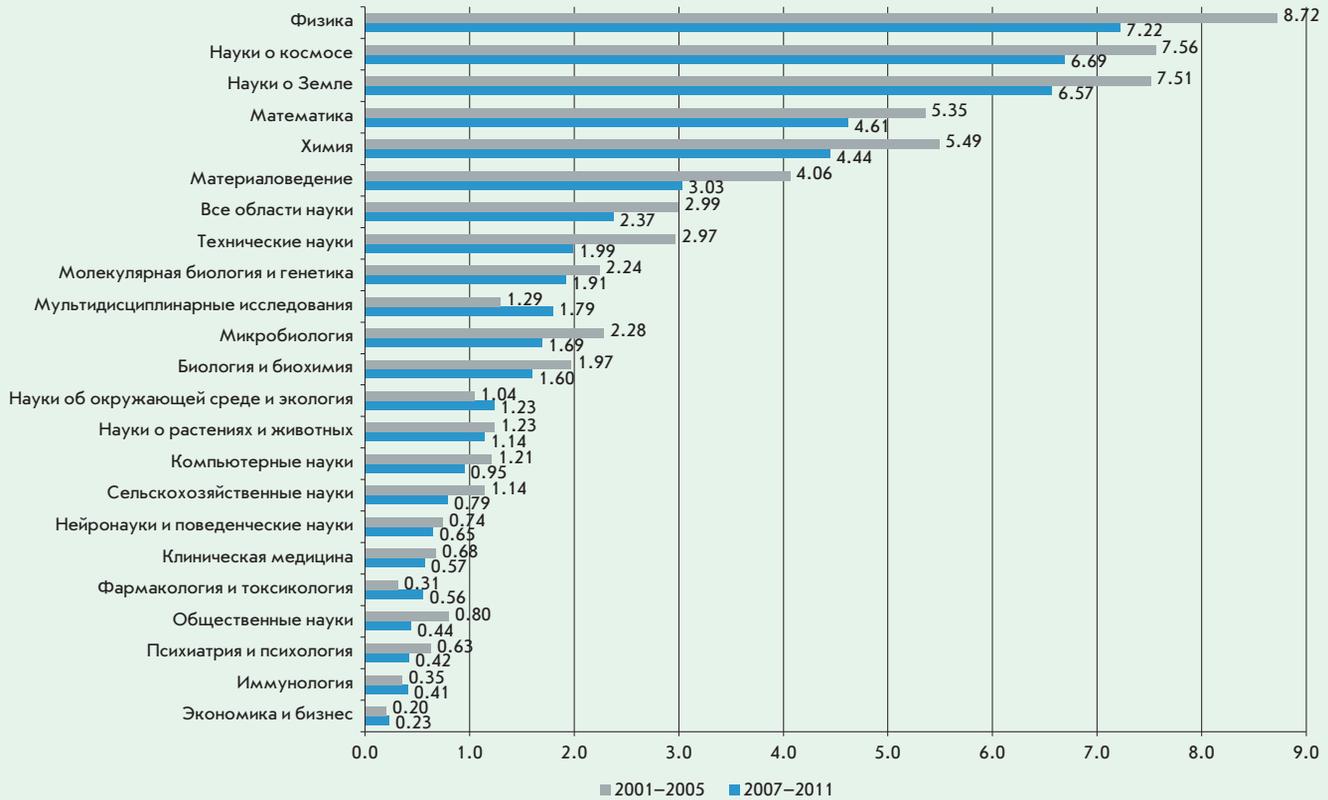


Рис. 2. Удельные веса российских публикаций в общемировом числе публикаций по областям науки (%). Источник: расчеты авторов по материалам Essential Science Indicators (раздел «Citation Rankings», подраздел «Countries /territories» страна «Russia», опция «View table of graph data» для показателей по России; раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table» для общемировых показателей).

вания, успела получить значимое число ссылок, необходим определенный промежуток времени. Отметим, что в настоящей работе рассматривается именно показатель «средняя цитируемость одной публикации», а не «средняя цитируемость одной статьи», поскольку в работе под «публикацией» подразумевается три типа документов: научная статья («article»), доклад на конференции («proceedings paper») и обзор («review»).

В Essential Science Indicators для расчета средней цитируемости одной публикации используется следующая методика: число ссылок, полученных публикациями рассматриваемой страны за определенный 5-летний промежуток времени, делится на общее число публикаций этой страны в указан-

ный 5-летний промежуток времени. Такая методика позволяет корректно оценить среднюю цитируемость публикаций страны, вышедших в разные годы.

При межстрановых сопоставлениях показатели цитируемости необходимо интерпретировать с осторожностью. Число цитирований не всегда адекватно отражает качество публикаций, поскольку шансы быть процитированными не равны у авторов из разных стран. Действие так называемого «эффекта Матфея», в силу которого авторы из менее «престижных» стран имеют показатели цитирования ниже ожидаемого уровня, многократно подтверждалось для различных областей науки [6–10]. Упоминание эффекта Матфея первый раз появляется в работе

американского социолога Роберта Мертона в журнале «Science» в 1968 г. [6, 7]. Исследователь анализировал психосоциальные факторы, влияющие на признание и оценку научных работ. Эффект Матфея – это потенциальное преимущество, которое имеют научные работы знаменитых исследователей перед публикациями их менее именитых коллег. Название эффекту Мертон дал по цитате из Евангелия от Матфея: «Всякому имеющему дастся и приумножится, а у неимеющего отнимется и то, что имеет» (Мф. 25, 29).

Страны с небольшим числом публикаций, охваченных международными базами данных научного цитирования, зачастую имеют чрезвычайно высокие значения средней цитируемости

Таблица 6. Средняя цитируемость одной публикации в ведущих странах: 2001–2011

№	Страна	Средняя цитируемость одной публикации страны	Число публикаций страны	Позиция страны в рейтинге по числу публикаций
1	Швейцария	16.61	194 618	16
2	США	15.83	3 219 337	1
3	Дания	15.83	104 212	23
4	Нидерланды	15.53	268 385	14
5	Швеция	14.82	189 413	18
6	Великобритания	14.79	912 495	2
7	Бельгия	13.69	147 261	21
8	Финляндия	13.59	94 209	25
9	Германия	13.20	836 694	4
10	Канада	13.15	479 354	7
11	Австрия	12.92	102 129	24
12	Израиль	12.72	117 251	22
13	Норвегия	12.56	77 118	29
14	Франция	12.32	598 138	6
15	Австралия	11.97	323 344	10
16	Италия	11.81	458 871	8
17	Ирландия	11.51	49 358	37
18	Новая Зеландия	10.84	61 205	34
19	Испания	10.42	364 197	9
20	Япония	10.35	815 789	5

Примечания. 1. В рассмотрение включены первые 20 стран исследуемой выборки по уровню средней цитируемости одной публикации страны.

2. Все показатели рассчитаны для суммарного за 2001–2011 гг. числа публикаций в научных журналах, индексируемых в Web of Science.

3. Средняя цитируемость одной публикации рассчитывается как отношение числа ссылок, полученных за 2001–2011 гг. публикациями страны, вышедшими в 2001–2011 гг., к числу публикаций страны, вышедших в 2001–2011 гг.

Источник: расчеты авторов по материалам Essential Science Indicators (раздел «Citation Rankings», подраздел «Countries/territories», опция «View table of graph data» для показателей по странам, представленным в таблице; раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table» для общемировых показателей).

одной публикации. Объясним это на следующем примере. Первые три позиции в рейтинге по уровню средней цитируемости одной публикации, построенном для суммарного за 2001–2011 гг. числа публикаций, занимали Бермудские острова, Панама и Гамбия соответственно. Средняя цитируемость одной публикации в этих странах была равна 23.7, 17.9 и 17.0 ссылок на публикацию соответственно. В первую 20-ку стран также попали Габон и Гвинея-Бисау. Од-

нако во всех этих странах, за исключением Панамы, суммарное за 2001–2011 гг. число публикаций в научных журналах, индексируемых Web of Science, было ниже 1 000 (в Панаме число публикаций составляло 2 098).

Согласно данным Essential Science Indicators, Россия в мировом рейтинге по средней цитируемости одной публикации занимала 123-е место из 144. Одна российская публикация в 2001–2011 гг. в среднем получала 4.87 ссылок.

В среднем по миру этот показатель составлял 10.57 ссылок на одну публикацию. Однако по абсолютному числу ссылок на публикации (т.е. по уровню цитируемости публикаций) Россия занимала относительно высокое 21-е место.

Первые 20 стран исследуемой выборки по уровню средней цитируемости одной публикации представлены в табл. 6. Первые 12 позиций в этом рейтинге занимали англоязычные страны и страны Северной Европы. Рос-

Таблица 7. Первые 25 стран мирового рейтинга по числу ссылок на публикации

№	2001–2005			2007–2011		
	Страна	Число ссылок на публикации страны	Удельный вес страны в общемировом числе ссылок на публикации, %	Страна	Число ссылок на публикации страны	Удельный вес страны в общемировом числе ссылок на публикации, %
1	США	8 736 259	47.5	США	11 542 290	42.2
2	Великобритания	2 231 223	12.1	Великобритания	3 330 285	12.2
3	Германия	1 900 402	10.3	Германия	2 788 268	10.2
4	Япония	1 576 262	8.6	Китай	2 219 953	8.1
5	Франция	1 244 048	6.8	Франция	1 852 765	6.8
6	Канада	971 332	5.3	Япония	1 840 922	6.7
7	Италия	870 611	4.7	Канада	1 641 349	6.0
8	Нидерланды	650 939	3.5	Италия	1 462 765	5.3
9	Австралия	572 221	3.1	Испания	1 111 348	4.1
10	Китай	569 874	3.1	Нидерланды	1 086 107	4.0
11	Испания	549 353	3.0	Австралия	1 071 029	3.9
12	Швейцария	529 890	2.9	Швейцария	857 170	3.1
13	Швеция	471 150	2.6	Южная Корея	677 451	2.5
14	Бельгия	308 583	1.7	Швеция	666 464	2.4
15	Южная Корея	288 106	1.6	Индия	587 965	2.1
16	Дания	265 646	1.4	Бельгия	551 464	2.0
17	Израиль	262 033	1.4	Бразилия	436 681	1.6
18	Россия	258 172	1.4	Дания	426 175	1.6
19	Индия	225 529	1.2	Тайвань	413 885	1.5
20	Финляндия	217 603	1.2	Австрия	347 819	1.3
21	Австрия	215 013	1.2	Израиль	338 029	1.2
22	Бразилия	185 243	1.0	Россия	317 770	1.2
23	Польша	178 917	1.0	Финляндия	309 117	1.1
24	Тайвань	173 626	0.9	Польша	302 810	1.1
25	Норвегия	140 394	0.8	Турция	267 440	1.0

Примечания. 1. Показатель «число ссылок на публикации страны» – это число ссылок, полученных за 2001–2005 (и 2007–2011) гг. публикациями страны, вышедшими в 2001–2005 (и 2007–2011) гг.

2. Общемировое число ссылок на публикации рассчитывается для фактического числа научных публикаций всех стран, представленных в Essential Science Indicators (раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table»).

Источник: расчеты авторов по материалам Essential Science Indicators (раздел «Citation Rankings», подраздел «Countries/territories», опция «View table of graph data» для показателей по странам, представленным в таблице; раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table» для общемировых показателей).

сия в этом рейтинге занимала 47 место из 57.

Все страны с быстрорастущей публикационной активностью имели среднюю цитируемость одной публикации ниже общемирового показателя. Максимальным

показателем средней цитируемости одной публикации среди этих стран отличался Таиланд – 7.57 ссылок на одну публикацию (72-е место в мире). Все остальные страны с быстрым ростом числа научных работ в ведущих мировых

журналах располагались за пределами первой сотни рейтинга по уровню средней цитируемости одной публикации. Иран, показавший наиболее динамичный рост абсолютного числа научных публикаций среди стран исследу-

емой выборки, имел один из самых низких в мире показателей средней цитируемости одной публикации – 4.19 ссылок на публикацию (133-е место в мировом рейтинге). Средняя цитируемость одной публикации в европейских странах была выше, чем в азиатских. Наивысшую среднюю цитируемость одной публикации среди стран Азии показала Япония (10.35 ссылок на публикацию), занимавшая в мировом рейтинге по этому показателю 35-е место.

В странах БРИК максимальное значение средней цитируемости одной публикации имела Бразилия – 6.37 ссылок на публикацию (100-е место в мире). В Китае и Индии средняя цитируемость одной публикации также была выше, чем в России: 102-е и 108-е места в мире соответственно. Эстония отличалась самым высоким уровнем средней цитируемости одной публикации среди стран бывшего СССР – 9.35 ссылок на публикацию (45-е место в мире). Во всех Прибалтийских странах средняя цитируемость одной публикации была выше, чем в России, а во всех странах Средней Азии, а также в Беларуси и Украине, наоборот, – ниже. Самое низкое значение средней цитируемости одной публикации в странах бывшего СССР наблюдалось в Азербайджане (2.55 ссылок на публикацию, 130-е место в мире). Последнее, 131-е место, в мировом рейтинге занимала Сербия, где каждая публикация, вышедшая в 1996–2010 гг., получала в среднем 2.66 ссылок.

Как уже упоминалось выше, аналитический ресурс Essential Science Indicators позволяет проводить сравнение средней цитируемости одной публикации, а также абсолютного числа ссылок, полученных публикациями в динамике. Среди стран исследуемой выборки наиболее существенный (более чем на 50%) рост средней цитируе-

мости одной публикации показали такие страны, как Сингапур, Тунис, Иран, Китай, Египет, Алжир, Греция, Турция, Таиланд, Индия.

Лидером по абсолютному числу ссылок, полученных публикациями, также были США. Доминирование США над остальными странами по этому показателю выражено еще сильнее, чем по числу самих публикаций (табл. 7). Публикации авторов из США в 2001–2011 гг. получили 45.3% общемирового потока ссылок. Однако за указанный период этот показатель несущественно сократился: с 47.5 до 42.2%. Доли Великобритании и Германии, занимавших в 2001–2011 гг. 2-е и 3-е места соответственно в рейтинге по числу ссылок на публикации, за указанный период остались неизменными. Россия в этом рейтинге занимала 22-е место. За указанный период Россия потеряла 4 позиции, переместившись с 18-го места на 22-е.

Китай, занимавший 2-е место в рейтинге по числу публикаций, в рейтинге по числу ссылок на публикации занимал 7-е место (5% их общемирового количества). За исследуемый период Китай «отыграл» 6 рейтинговых позиций, переместившись с 10-го места на 4-е. Помимо Китая, среди стран исследуемой выборки существенное продвижение вверх в этом рейтинге за указанный период показали Иран (10 позиций), Пакистан (8 позиций), Малайзия (7 позиций), Китай (6 позиций), а также Бразилия, Сингапур и Тайвань (по 5 позиций). В странах исследуемой выборки более чем трехкратное увеличение числа ссылок на публикации за 2001–2011 гг. наблюдалось в Иране (7.4 раз), Пакистане (5.9 раз), Малайзии (4.8 раз), Китае (3.9 раз), Алжире (3.7 раз), Таиланде (3.4 раз), Нигерии (3.2 раз) и Колумбии (3.1 раз). Однако бурный рост числа ссылок на научные работы не помог этим стра-

нам получить высокие показатели цитируемости.

Аналогично можно рассмотреть страны, которые, наоборот, теряли позиции в рейтинге по числу ссылок на публикации: 4 и более позиции в этом рейтинге потеряли (помимо России) Эстония, Израиль (по 4 позиции), Новая Зеландия, Словакия (по 5 позиций), Украина (6 позиций), Венгрия и Венесуэла (по 8 позиций). Так же как и в случае с числом самих научных работ, позиции стран Западной Европы и Северной Америки в рейтинге по числу ссылок на них за 2001–2011 гг. существенно не изменились. Несмотря на существенные потери позиций в рейтинге по числу публикаций, Венгрия, в отличие от Венесуэлы, располагалась на относительно высоком 38-м месте в рейтинге по уровню цитируемости научных работ (Венесуэла занимала 84-е место). Израиль, Новая Зеландия и Эстония также занимали сравнительно высокие позиции: 17-е, 28-е и 45-е.

Российское распределение ссылок на публикации по областям науки, аналогично структуре самих публикаций, сильно отличалось от мирового (табл. 8).

37.5% всех ссылок в 2001–2011 гг. получили российские публикации по физике. Доля всех остальных областей науки в общем числе ссылок на научные работы российских авторов была значительно меньше. Тем не менее в 2007–2001 гг. по сравнению с 2001–2005 гг. удельный вес ссылок, полученных отечественными работами по физике, снизился. В то же время доля ссылок, полученная публикациями по клинической медицине, значительно увеличилась: с 3.8 до 7.8%.

В мировой структуре ссылок доминировала область клинической медицины – 25.2% от их общего потока. Второй по числу полученных ссылок областью наук была химия (12.1% от общего числа

Таблица 8. Распределение ссылок на публикации по областям науки (%)

Область науки	Общемировое распределение		Российское распределение	
	2001–2005	2007–2011	2001–2005	2007–2011
Биология и биохимия	10.47	7.63	6.66	5.54
Иммунология	2.98	2.29	0.36	0.59
Клиническая медицина	25.56	25.09	3.79	7.81
Компьютерные науки	0.82	0.91	0.32	0.27
Математика	0.68	0.94	1.36	1.86
Материаловедение	2.46	3.75	3.26	3.78
Междисциплинарные науки	0.07	0.12	0.01	0.20
Микробиология	2.64	2.35	1.59	1.52
Молекулярная биология и генетика	7.82	6.20	3.60	3.33
Науки о Земле	2.19	2.58	4.93	6.48
Науки о космосе	2.02	1.81	5.18	5.61
Науки о растениях и животных	3.69	3.69	1.59	1.94
Науки об охране окружающей среды и экология	2.16	2.98	0.96	1.42
Нейронауки и поведенческие науки	5.68	4.79	1.33	1.17
Социальные науки	1.48	2.10	0.19	0.27
Психиатрия и психология	2.00	2.36	0.25	0.21
Сельскохозяйственные науки	1.04	1.46	0.20	0.39
Технические науки	2.92	4.37	4.90	4.39
Фармакология и токсикология	2.05	2.29	0.31	0.52
Физика	8.60	7.67	43.49	35.49
Химия	12.09	13.71	15.65	17.15
Экономика и бизнес	0.58	0.91	0.08	0.09

Примечание. Распределение ссылок на публикации по областям науки рассчитывается как динамика удельных весов ссылок на публикации по заданным областям в общем числе ссылок на публикации.

Источник: расчеты авторов по материалам Essential Science Indicators (раздел «Citation Rankings», подраздел «Countries/territories» страна «Russia», опция «View table of graph data» для показателей по России; раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table» для общемировых показателей).

ссылок), а третьей – физика (8%). В мировой структуре науки сильнее всего сократилась доля ссылок, полученных работами в области биологии и биохимии.

Удельные веса ссылок на отечественные работы в общемировом потоке в разрезе областей наук представлены на рис. 3. Российские публикации по физике и астрономии получили наибольшую (в сравнении с работами по остальным областям науки) долю мирового потока ссылок (6.1% в сумме за 2001 – 2011 гг.). От 2 до 4% мирового потока ссылок

получили отечественные работы по математике, наукам о Земле и наукам о космосе. Такие области науки, как физика и технические науки, показали серьезное сокращение соответствующих удельных весов за 2001–2011 гг. С другой стороны, в области мультидисциплинарных исследований указанный показатель, наоборот, существенно вырос за исследуемый период: с 0.3 до 1.9%.

В табл. 9 представлены показатели средней цитируемости российских публикаций в разрезе областей науки в 2001–2011 гг.

Наиболее высокий уровень средней цитируемости одной публикации имели работы российских ученых по иммунологии. Однако среднемировой уровень средней цитируемости одной публикации по иммунологии был выше российского показателя.

Наименьшее число ссылок в расчете на одну публикацию в 2001–2011 гг. получали российские работы по математике, общественным и компьютерным наукам. В 2001–2005 гг. уровень средней цитируемости одной публикации, сопоставимый с миро-

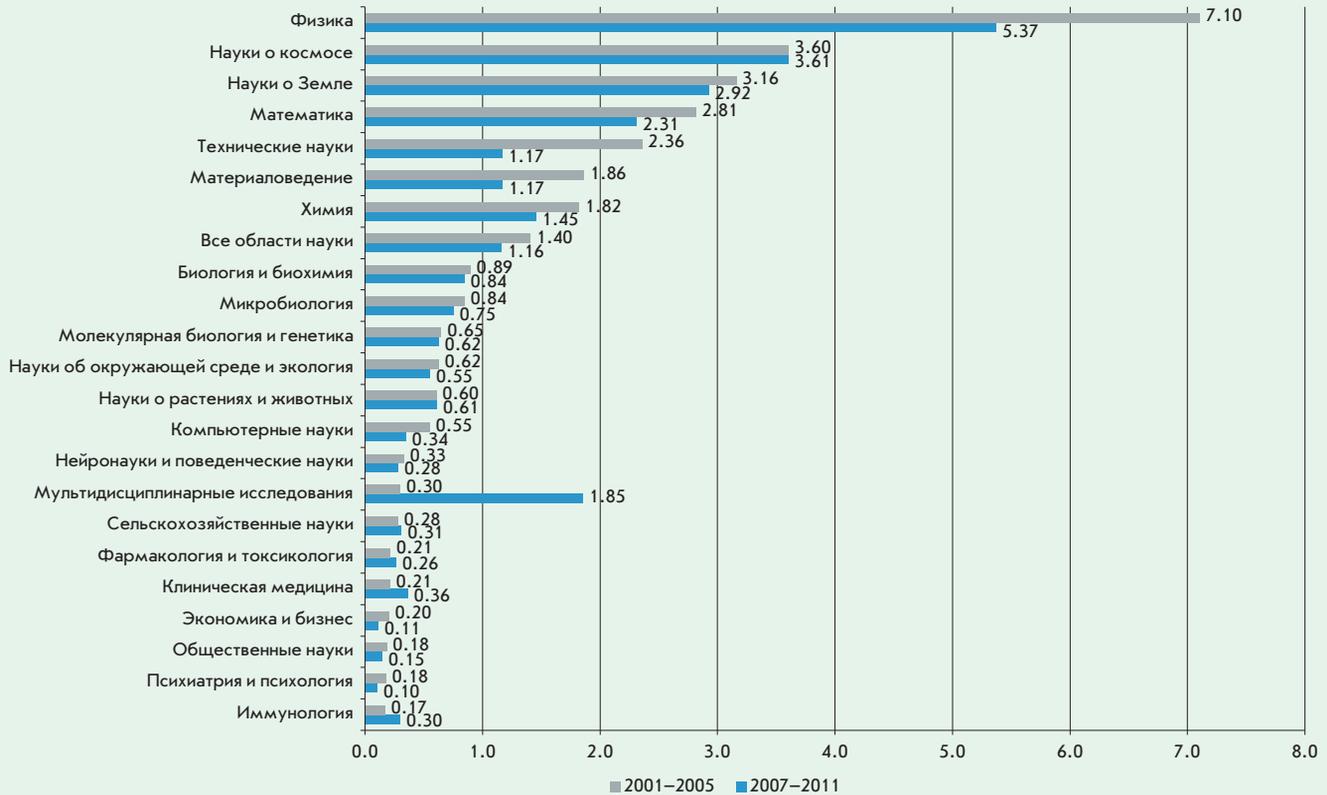


Рис. 3. Удельный вес ссылок на российские публикации в общемировом числе ссылок на публикации по областям науки (%).

Источник: расчеты авторов по материалам Essential Science Indicators (раздел «Citation Rankings», подраздел «Countries/territories» страна «Russia», опция «View table of graph data» для показателей по России; раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table» для общемировых показателей).

вым значением, имели российские публикации по экономике и бизнесу. Однако в 2007–2011 гг. средняя цитируемость этих российских работ, а также работ по фармакологии и токсикологии сократилась: на 28 и 19% соответственно.

Российские публикации в области мультидисциплинарных исследований показали невероятно высокий рост уровня средней цитируемости одной публикации: с 0.39 в 2001–2005 гг. до 3.65 в 2007–2011 гг. В 2007–2011 гг. только публикации в области мультидисциплинарных исследований имели среднюю цитируемость, сопоставимую со среднемировым значением. Относительно высокий (в 2.28 раза) рост уровня средней цитируемости одной публика-

ции наблюдался также для работ по клинической медицине. В общемировой структуре науки наивысшую среднюю цитируемость имели публикации по молекулярной биологии и генетике.

ДИНАМИКА ВЫСОКОЦИТИРУЕМЫХ ПУБЛИКАЦИЙ¹

Высокоцитируемые публикации (highly cited papers) – это сравнительно небольшая группа наиболее влиятельных научных публикаций. Публикация в определенной области наук является высокоцитируемой, если она попа-

¹ Автор благодарит О.И. Курчик за предоставление ценных информационно-аналитических материалов, использованных при написании данного раздела.

дает в 1% наиболее часто цитируемых публикаций в этой области науки. Так как тренды цитирования (частота и распределение ссылок во времени) существенно варьируют в разных областях науки, а статьи, вышедшие ранее, цитируются чаще, чем вновь появившиеся, при определении «высокоцитируемых публикаций» учитывается распределение цитирований по отдельным годам и по отдельным областям знания.

Зачастую высокоцитируемые публикации являются результатом международного сотрудничества, которое может объединять соавторов из разных стран мира. Многие из них формируют исследовательские фронты (research fronts) – наиболее актуальные

Таблица 9. Средняя цитируемость российских публикаций по областям науки: 2001–2011

Область науки	2001–2005		2007–2011	
	Средняя цитируемость одной публикации российских авторов	Отношение к общемировому показателю	Средняя цитируемость одной публикации российских авторов	Отношение к общемировому показателю
Иммунология	4.6	0.48	7.21	0.73
Науки о космосе	3.15	0.48	4.18	0.54
Биология и биохимия	3.35	0.45	3.83	0.53
Клиническая медицина	1.62	0.31	3.69	0.64
Мультидисциплинарные исследования	0.39	0.23	3.65	1.04
Нейронауки и науки о поведении	3.41	0.44	3.6	0.44
Молекулярная биология и генетика	3.42	0.29	3.58	0.33
Физика	3.1	0.81	3.12	0.74
Микробиология	2.52	0.37	3.03	0.44
Фармакология и токсикология	3.35	0.68	2.71	0.47
Науки об окружающей среде	2.16	0.60	2.28	0.45
Науки о Земле	1.39	0.42	1.93	0.44
Химия	1.39	0.33	1.9	0.33
Науки о растениях и животных	1.39	0.49	1.8	0.54
Материаловедение	1.05	0.46	1.51	0.39
Технические науки	1.24	0.79	1.45	0.58
Сельскохозяйственные науки	0.58	0.24	1.22	0.39
Экономика и бизнес	1.6	0.99	1.15	0.48
Психиатрия и психология	1.01	0.28	1.13	0.24
Математика	0.62	0.53	0.82	0.50
Компьютерные науки	0.53	0.45	0.78	0.36
Общественные науки	0.35	0.22	0.67	0.33
Публикации по всем областям науки	2.02	0.47	2.41	0.49

Примечание. Все показатели рассчитаны для суммарного за 2001–2011 гг. числа публикаций в научных журналах, индексируемых в Web of Science.

Источник: расчеты авторов по материалам Essential Science Indicators (раздел «Citation Rankings», подраздел «Countries/territories» страна «Russia», опция «View table of graph data» для показателей по России; раздел «Citation Analysis», подраздел «Baselines», опция «View field rankings table» для общемировых показателей).

и динамично развивающиеся области исследований и разработок в мире. Высокоцитируемые публикации – это в некоторой степени показатель качества научной системы страны [11, 12].

Индекс специализации по высокоцитируемым публикациям рассчитывается так же, как и для «обычных» публикаций.

Динамика числа российских высокоцитируемых публикаций представлена на рис. 4, а их рас-

пределение по областям науки в табл. 10. В 2010 г. после довольно сильного их сокращения произошло еще более существенное увеличение количества таких работ.

Если обратиться к распределению высокоцитируемых статей по областям науки, то в среднем в мире в данную категорию чаще всего попадают публикации по клинической медицине (22.0%), за которой следуют химия (11.8%), физика (8.7%) и технические науки

(8%) (табл. 10). В российском кластере высокоцитируемых статей со значительным перевесом лидирует физика, на которую приходится почти половина (48.6%) всех публикаций, пользующихся наибольшим мировым признанием. Клиническая медицина, технические науки, химия и науки о Земле дают еще 28.6% всех высокоцитируемых публикаций.

Физика лидирует по индексу специализации: ее удельный вес

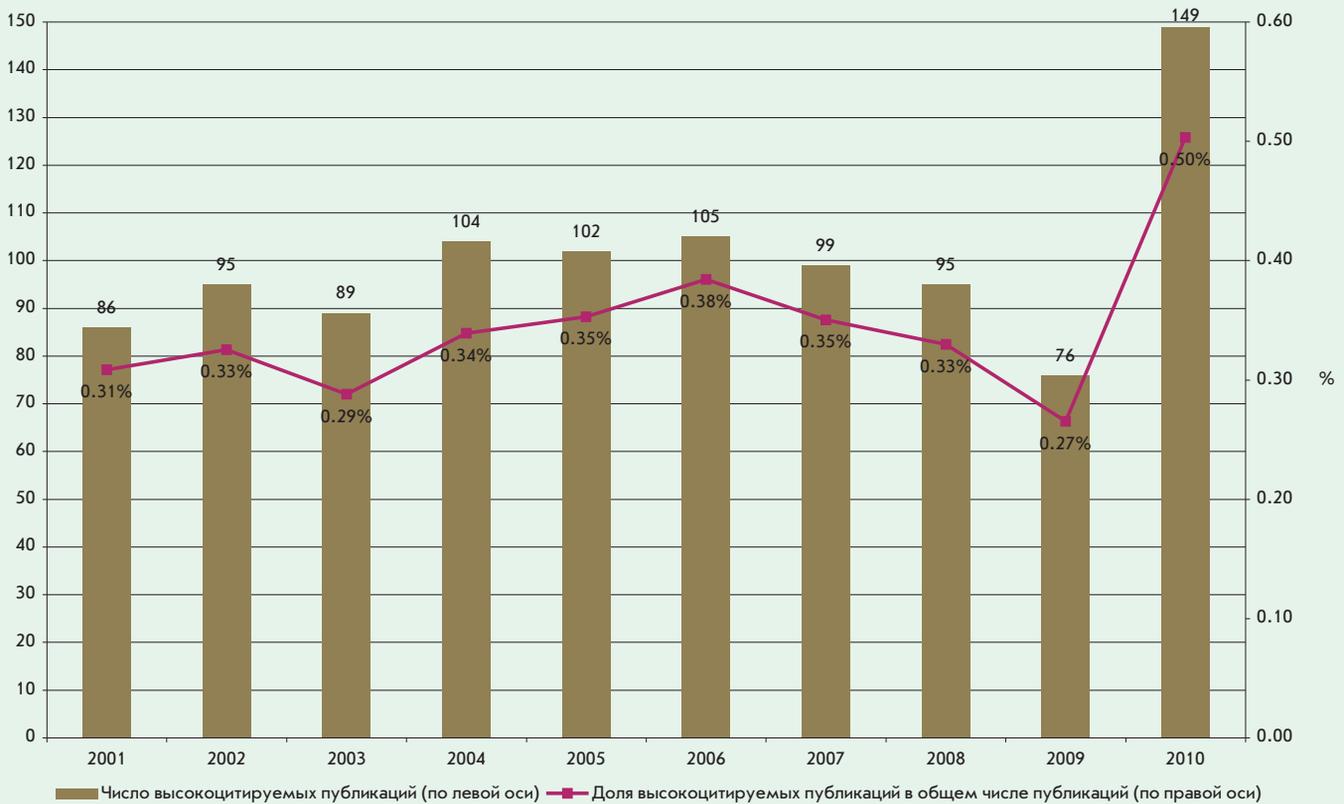


Рис. 4. Динамика числа российских высокоцитируемых публикаций: 2001–2010.

Источник: расчеты авторов по материалам аналитического ресурса Essential Science Indicators (раздел «Most cited papers», подраздел «Highly cited papers»).

в общем числе высокоцитируемых публикаций российских авторов превышает аналогичный среднемировой показатель более чем в пять раз. В России удельный вес высокоцитируемых публикаций по физике в общем числе высокоцитируемых $\sim 48\%$, в то время как для общемирового числа высокоцитируемых публикаций этот показатель равен $\sim 8.6\%$. Соответственно индекс специализации российских высокоцитируемых публикаций по физике равен $48\%/8.6\% = 5.6$. Следует отметить более значительное в сравнении с общемировым распределением присутствие высокоцитируемых статей в сфере наук о Земле, наук о космосе и математики. Именно эти области российской науки вносят наиболее значимый вклад

в мировой научный процесс. Напротив, наименьшие шансы попасть в число высокоцитируемых имеют российские публикации в области иммунологии, фармакологии и токсикологии, нейронауки и поведения, психиатрии и психологии, экономики и бизнеса, компьютерных и общественных наук.

Соответственно позиции России в мировой науке наиболее сильны в области физики. На эту область науки приходится половина российских высокоцитируемых публикаций и значительная часть общего числа российских публикаций в ведущих научных журналах.

Проанализируем позиции российских высокоцитируемых публикаций в мире (табл. 11). Как и в случае с общим числом публикаций, мировым лидером здесь

снова являются США: 34.1% общемирового потока высокоцитируемых публикаций за 2001–2011 гг. Второе место принадлежало Великобритании (8.9%), а третье – Германии. Китай, имевший наибольшее количество высокоцитируемых публикаций среди азиатских стран, занимал 6-е место в данном рейтинге. России принадлежала 21-я позиция.

Швейцария в 2001–2011 гг. имела наивысшую долю высокоцитируемых публикаций в общем числе своих публикаций среди стран, представленных в табл. 11. В России этот показатель был, наоборот, наименьшим среди стран, приведенных в табл. 11. Вклад отечественной науки в общемировой поток высокоцитируемых публикаций также был невысоким – 0.64% .

Таблица 10. Распределение высокоцитируемых публикаций по областям науки: 2001–2011

Область науки	Страны мира	Россия	Удельный вес российских высокоцитируемых публикаций в их общемировом числе, %	Индекс специализации российских высокоцитируемых публикаций
Биология и биохимия	5501	46	0.84	0.79
Иммунология	1252	2	0.16	0.15
Клиническая медицина	21783	104	0.48	0.45
Компьютерные науки	2544	3	0.12	0.11
Математика	2377	27	1.14	1.08
Материаловедение	4572	27	0.59	0.56
Микробиология	1646	6	0.36	0.35
Молекулярная биология и генетика	2806	18	0.64	0.61
Мультидисциплинарные исследования	180	4	2.22	2.11
Науки о растениях и животных	2872	55	1.92	0.23
Науки о Земле	1240	27	2.18	1.82
Науки о космосе	5789	14	0.24	2.07
Науки об окружающей среде и экология	2762	16	0.58	0.55
Нейронауки и поведенческие науки	3012	4	0.13	0.13
Общественные науки	4562	5	0.11	0.10
Психиатрия и психология	2477	3	0.12	0.11
Сельскохозяйственные науки	2041	3	0.15	0.14
Технические науки	7890	91	1.15	1.09
Фармакология и токсикология	1848	4	0.22	0.21
Физика	8600	508	5.91	5.61
Химия	11699	77	0.66	0.62
Экономика и бизнес	1722	1	0.06	0.06
Всего	99175	1045	1.05	

Примечания. 1. Все показатели рассчитаны для суммарного за 2001–2011 гг. числа высокоцитируемых публикаций в научных журналах, индексируемых в Web of Science.

2. Данные за 2011 г. представлены на начало декабря 2011 г.

Источник: расчеты авторов по материалам аналитического ресурса Essential Science Indicators (раздел «Most cited papers», подраздел «Highly cited papers»).

МЕЖДУНАРОДНОЕ СОВАВТОРСТВО¹

В последнем разделе настоящей работы приводится краткий обзор основных направлений международного сотрудничества российских авторов (методы оценивания международного соавторства рассматриваются, например, в работах [13–15]). Интенсивность

¹ Автор благодарит О.И. Курчик за предоставление ценных информационно-аналитических материалов, использованных при написании данного раздела.

и направления международного сотрудничества обычно измеряются при помощи анализа показателей соавторства ученых из разных стран (см., например, [1–5, 14, 16–18]). Международное соавторство предполагает принадлежность авторов на момент публикации к разным странам. Публикация считается написанной в международном соавторстве, если в списке ее авторов представлены авторы из двух и более стран. Авторство в таких публикациях засчитывается

всем соавторам в равной степени независимо от их роли в создании публикации. Высокий удельный вес публикаций в международном соавторстве в общем потоке публикаций страны может свидетельствовать как о ее центральном положении в международных исследовательских сетях, так и о несамодостаточности национальной науки.

В соответствии с изменениями в научном производстве на мировом уровне, предполагающими,

Таблица 11. Основные показатели высокоцитируемых публикаций ведущих стран: 2001–2011

Страна	Число высокоцитируемых публикаций	Позиция в рейтинге по числу высокоцитируемых публикаций	Удельный вес высокоцитируемых публикаций страны в общемировом числе высокоцитируемых публикаций, %	Удельный вес высокоцитируемых публикаций в общем числе публикаций страны, %
США	55953	1	34.10	1.83
Великобритания	14505	2	8.84	1.76
Германия	12649	3	7.72	1.61
Франция	7155	4	4.37	1.28
Канада	6717	5	4.09	1.49
Китай	5856	6	3.57	0.70
Япония	5659	7	3.45	0.73
Италия	5097	8	3.11	1.19
Нидерланды	4808	9	2.93	1.91
Австралия	4210	10	2.57	1.38
Швейцария	4171	11	2.55	2.30
Испания	3584	12	2.18	1.06
Швеция	2747	13	1.68	1.53
Бельгия	2310	14	1.41	1.68
Дания	1940	15	1.18	1.98
Южная Корея	1773	16	1.08	0.63
Израиль	1450	17	0.88	1.31
Австрия	1438	18	0.87	1.50
Индия	1238	19	0.76	0.42
Финляндия	1172	20	0.72	1.32
Россия	1045	21	0.63	0.39

Примечания. 1. Все показатели рассчитаны для суммарного за 2001–2011 г. числа высокоцитируемых публикаций в научных журналах, индексируемых в Web of Science.

2. В таблице приведены данные на начало декабря 2011 г.

Источник: расчеты авторов по материалам базы данных Essential Science Indicators (раздел «Most cited papers», подраздел «Highly cited papers»).

в частности, формирование все более крупных исследовательских групп, в некоторых областях знания наметилась тенденция к гиперавторству и мегаавторству, объединяющим десятки авторов из разных стран (методы и методология оценки «мультинациональности» публикаций в международном соавторстве рассматриваются в работах [10, 19, 20]).

Доля публикаций, написанных в международном соавторстве, в общем потоке публикаций рассматривается как относительный

показатель уровня интеграции исследователей страны в мировое научное сообщество.

Базовые показатели интеграции российских ученых в мировое научное сообщество приведены на рис. 5. Доля публикаций, подготовленных в международном соавторстве, в общем потоке работ российских авторов колебалась в пределах от 29 до 33% в 2001–2011 гг. В абсолютном выражении это составило порядка 9000 публикаций. Однако с 2008 г. наметилось сокращение количества

публикаций в международном соавторстве.

Исследователи из США и Германии были ведущими зарубежными партнерами российских ученых (табл. 12). На публикации в соавторстве с коллегами из этих стран приходилось 26–27% от их общего объема. Значимыми партнерами российских ученых были исследователи из Франции и Великобритании. Необходимо отметить заметное укрепление научных связей России со странами Азии. За 2001–2011 гг. число



Рис. 5. Основные показатели международного сотрудничества российских авторов: 2001–2011.

Число публикаций российских авторов, написанных в международном соавторстве, рассчитывается по материалам Web of Science следующим образом. Для каждого года исследуемого периода в опции «Analyze results» портала Web of Science для страны «Россия» по категории «Countries/territories» суммировали публикации по всем странам за исключением России. Для анализа отбирались следующие типы документов: научная статья («article»), доклад на конференции («proceedings paper») и обзор («review»).

Источник: расчеты авторов по материалам базы данных Web of Science.

публикаций российских авторов в соавторстве с коллегами из Индии выросло в 3.6 раза, с авторами из Китая и Тайваня – в 3.1 раза, а с авторами из Южной Кореи – в 4.6 раза. Научные связи России с европейскими странами развивались не столь интенсивно. Из стран бывшего СССР только Украина и Беларусь попали в когорту 25 наиболее значимых научных партнеров России.

С другой стороны, сама Россия была значимым научным партнером для стран Средней Азии и Кавказа, а также Монголии, Эквадора, Украины и Беларуси (табл. 13). В то же время

для США, Германии, Франции и Великобритании Россия была незначимым научным партнером. Удельный вес публикаций, написанных в соавторстве с Россией, в общем числе публикаций этих стран был меньше 3.5%.

В странах Северной Европы уровень интеграции исследователей страны в мировое научное сообщество был существенно выше, чем в России – порядка 50%. В Индонезии, на Кипре, Таджикистане, Туркменистане, Киргизии и Узбекистане этот показатель был еще выше: 60–65% в последние годы [21–23]. Высокий уровень данного показателя имеют также страны

с переходной экономикой (например, Латвия, Эстония и Беларусь). Он неизменно высок у таких крупных мировых научных держав, как Германия, Франция, Канада: почти половина всех публикаций каждой из этих стран являются продуктом международного сотрудничества. Напротив, наиболее низкие значения среди стран-лидеров по числу публикаций данный показатель имеет у Китая, Индии, Турции и Ирана. В целом в странах Европы уровень интеграции исследователей в мировое научное сообщество был выше, чем в странах Азии.

Библиометрические исследо-

Таблица 12. Основные научные партнеры России

№	2001			2011		
	Страна	Число публикаций в соавторстве	Удельный вес публикаций в общем числе российских публикаций в международном соавторстве, %	Страна	Число публикаций в соавторстве	Удельный вес публикаций в общем числе российских публикаций в международном соавторстве, %
1	Германия	2389	27.18	Германия	2564	28.95
2	США	2158	24.55	США	2366	26.71
3	Франция	1076	12.24	Франция	1499	16.92
4	Великобритания	902	10.26	Великобритания	1390	15.69
5	Япония	681	7.75	Италия	924	10.43
6	Италия	651	7.41	Испания	730	8.24
7	Швеция	493	5.61	Япония	665	7.51
8	Нидерланды	432	4.91	Китай	635	7.17
9	Польша	423	4.81	Польша	621	7.01
10	Швейцария	346	3.94	Швейцария	582	6.57
11	Канада	319	3.63	Украина	540	6.10
12	Украина	318	3.62	Канада	514	5.80
13	Испания	315	3.58	Швеция	508	5.73
14	Финляндия	260	2.96	Нидерланды	494	5.58
15	Бельгия	246	2.80	Финляндия	490	5.53
16	Южная Корея	220	2.50	Чехия	457	5.16
17	Чехия	216	2.46	Бельгия	425	4.80
18	Китай	202	2.30	Австрия	405	4.57
19	Израиль	185	2.10	Южная Корея	398	4.49
20	Австрия	151	1.72	Бразилия	361	4.08
21	Бразилия	150	1.71	Индия	331	3.74
22	Дания	150	1.71	Тайвань	310	3.50
23	Мексика	149	1.69	Беларусь	299	3.38
24	Норвегия	147	1.67	Австралия	299	3.38
25	Австралия	140	1.59	Греция	288	3.25

Примечания. 1. Сумма удельных весов по странам превышает 100%, так как некоторые статьи написаны в соавторстве с исследователями более чем из одной зарубежной страны.

2. Методика расчетов общего числа публикаций российских авторов, написанных в международном соавторстве, приведена в подписи к рис. 5.

Источник: расчеты авторов по материалам базы данных Web of Science.

вания паттернов академического соавторства на мировом уровне в последние двадцать-тридцать лет показывают существенный рост числа статей, подготовленных авторами из двух-трех и большего числа стран, что отражает углубляющуюся специ-

ализацию и глобализацию производства знания. В частности, наблюдается возрастающая роль в международном сотрудничестве стран БРИК, причем лидирует по данному показателю в четверке стран Россия. Число статей, опубликованных российскими

учеными в международном соавторстве, в период с 1980 по 2011 г. возросло с 3 до 31%, достигнув уровня США.

Их предметное распределение в целом соответствует областям научной специализации России: со значительным преимуществом

Таблица 13. Удельный вес публикаций в соавторстве с российскими исследователями в общем числе публикаций страны: 2001–2011 (%)

Страна	2001	Страна	2011
Туркменистан	40.00	Грузия	30.94
Таджикистан	24.00	Беларусь	27.66
Армения	19.83	Армения	26.29
Казахстан	17.87	Киргизия	23.44
Грузия	17.56	Казахстан	23.18
Эквадор	16.35	Монголия	19.29
Узбекистан	13.02	Азербайджан	18.04
Монголия	12.50	Узбекистан	15.45
Беларусь	8.48	Таджикистан	14.81
Украина	6.40	Эквадор	13.61
Азербайджан	5.44	Украина	10.34

Примечания. 1. Показатели, приведенные в таблице, рассчитываются следующим образом. Для каждой из рассматриваемых стран число публикаций в соавторстве с российскими исследователями – это значение показателя «Record count» в графе «Russia» при запуске функции «Search within results for Countries/territories» в опции «Analyze results» портала Web of Science. Для анализа отбирались следующие типы документов: научная статья («article»), доклад на конференции («proceedings paper») и обзор («review»).

2. Указаны страны, в которых удельный вес публикаций в соавторстве с российскими исследователями в общем числе публикаций страны превышал 10% в 2001 г. или в 2011 г.

Источник: расчеты авторов по материалам базы данных Web of Science.

лидируют физические науки, в особенности физика твердого тела и разделы физики, изучающие ядерные процессы, поля и частицы, оптика и спектроскопия, физика плазмы. За ними следуют астрономия и астрофизика, материаловедение, физическая химия, приборостроение, биохимия и молекулярная биология, науки о Земле, а также математика и электроника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе был проведен обзор публикационной активности российских ученых и научной результативности ведущих научных держав. В странах исследуемой выборки была проанализирована динамика числа публикаций в научных жур-

налах, индексируемых в Web of Science, и базовых показателей цитируемости публикаций. Также были выявлены области научной специализации России. Кроме того, проведенный анализ показывает, что позиции России в мировой науке за 2001–2001 гг. ослабились, и Россия пропустила вперед страны с быстрорастущей публикационной активностью. При этом наиболее существенное ослабление позиций России наблюдается как раз в традиционных для нашей страны областях специализации (физика, технические науки, материаловедение, химия, математика). К тому же средняя цитируемость одной публикации в России была одной из самых низких в мире.

Анализ распределения публи-

каций по областям науки позволяет сделать выводы о научной специализации России. Большая часть российских публикаций – это работы в области естественных и технических наук, в то время как в мировой структуре науки доминировали публикации по медицинским и биологическим наукам. Наиболее весомый вклад в позиционирование России в мировой науке внесли российские публикации по физике. Эти работы составляли практически 50% российских высокоцитируемых публикаций и 20% общего числа российских публикаций. Работы российских авторов по физике в общемировом числе публикаций были представлены намного шире в сравнении с работами по остальным областям науки. Кроме того, российские научные публикации по физике внесли и самый значимый вклад (в сравнении с публикациями по другим областям науки) в общее число российских публикаций в международном соавторстве.

Уровень интеграции российских исследователей в мировое научное сообщество был относительно высоким. Однако в европейских странах (и особенно в странах Северной Европы) этот показатель был выше, чем в России. Основными научными партнерами России были исследователи из США, Германии, Великобритании и Франции. Научные связи российских авторов с коллегами из стран Азии (в первую очередь из Китая, а также Индии и Южной Кореи) в 1996–2010 годах существенно укрепились.

Анализ публикационной активности в других странах позволяет сделать следующие выводы. В 2001–2011 гг. явным лидером мировой науки были США. В азиатских странах публикационная активность росла намного более быстрыми темпами, чем в странах Европы. Наивысшие темпы роста

показателей публикационной активности в странах исследуемой выборки демонстрировал Иран. Однако в европейских странах показатели цитируемости публикаций и уровень международно-го научного сотрудничества были выше, чем в азиатских странах. Соответственно в последние 10 лет произошла значительная перестановка сил в мировой науке.

Развивающиеся страны (в первую очередь Китай, а также Иран, Таиланд, Турция, Малайзия, Бразилия, Пакистан и Индия) стали теснить устоявшихся лидеров (страны Северной Америки, Западной Европы и Япония). Усиление такой тенденции приведет к тому, что отставание России проявится еще сильнее. Очевидно, что необходимо принимать меры

по стимулированию публикационной активности российских ученых в крупных международных изданиях, иначе Россия может потерять статус мировой научной державы. ●

Автор выражает огромную благодарность О.И. Кирчик за помощь в подготовке данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гохберг Л.М. Статистика науки. М.: ТЕИС, 2003. 478 с.
2. Гохберг Л.М., Сагиева Г.С. // Форсайт. 2007. Т. 1. № 1. С. 44–53.
3. Кирчик О.И. // Форсайт. 2011. Т. 5. № 3. С. 34–42.
4. Российский инновационный индекс / Под ред. Гохберга Л.М. М.: НИУ ВШЭ, 2011. 84 с.
5. Коцемир М.Н. // Форсайт. 2012. Т. 6. № 1. С. 38–59.
6. Merton R.K. // Science. 1968. V. 159. № 3810. P. 56–63.
7. Merton R.K. // ISIS. 1998. V. 79. № 4. P. 606–623.
8. Gokhberg L., Pisyakov V. // 10th Intern. Conf. on Science and Technology Indicators. Book of Abstracts. Vienna, 2008. P. 400–403.
9. Батыгин Г.С. // Ведомости. Тюменский нефтегазовый университет. НИИ прикладной этики. 2001. Вып. 18. С. 173–185.
10. Писляков В.В., Дьяченко Е.Л. // НТИ. Сер. 2. Информационные процессы и системы. 2009. № 3. С. 19–24.
11. Aksnes D.W., Sivertsen G. // Scientometrics. 2004. V. 59. № 2. P. 213–224.
12. Tijssen R.J.W., Visser M.S., van Leeuwen T.N. // Scientometrics. 2002. V. 54. P. 381–397.
13. Luukkonen T., Tijssen R.J.W., Persson O., Silvertsen G. // Scientometrics. 1993. V. 28. P. 15–36.
14. Glänzel W., Schubert A., Czerwon H.J. // Scientometrics. 1999. V. 45. P. 185–202.
15. Bookstein A., Moed H., Yitzhaki M. // Information Processing and Management. 2006. V. 42. P. 1422–1442.
16. Melin G., Persson O. // Scientometrics. 1996. V. 36. P. 363–377.
17. Arunachalam S., Doss M.J. // Current Science. 2000. V. 79. № 5. P. 621–628.
18. Wang Y., Wu Y., Pan Y., Ma Z., Rousseau R. // Scientometrics. 2005. V. 62. № 2. P. 183–198.
19. Lange C., Glänzel W. // Scientometrics. 1997. V. 49. № 3. P. 593–604.
20. Nederhof A.J., Moed H.F. // Scientometrics. 1993. V. 27. P. 39–52.
21. Индикаторы науки: 2010. Статистический сборник. М.: ГУ-ВШЭ, 2010. 368 с.
22. Индикаторы науки: 2011. Статистический сборник. М.: ГУ-ВШЭ, 2011. 368 с.
23. Индикаторы науки: 2012. Статистический сборник. М.: ГУ-ВШЭ, 2012. 392 с.

УДК 577.3

Физико-химическая биология: достигнутые рубежи и новые горизонты

Д. Г. КнорреИнститут химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск,
просп. Акад. Лаврентьева, 8

E-mail: knorre@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 04.11.2011 г.

РЕФЕРАТ Рассмотрены основные этапы становления физико-химической биологии в XX веке, развитие которой было обусловлено установлением Уотсоном и Криком пространственной структуры ДНК и успехами рентгеноструктурного анализа биополимеров. Высказаны соображения о новых приоритетных задачах и методах физико-химической биологии в XXI веке, в число которых входят динамика биохимических процессов, функции неструктурированных белков, а также ферментативные процессы и формирование пространственной структуры биополимеров на уровне единичных молекул.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА структура ДНК, активные центры ферментов, неструктурированные белки, динамика биохимических процессов, наблюдение отдельных молекул.

Вторая половина XX века ознаменовалась фантастическим прорывом технических возможностей человечества. Освоение ядерной энергии привело к появлению сети атомных электростанций, покрывшей всю планету. Создание сверхмощных ракет-носителей открыло человечеству дорогу в космос, которая началась с полета Юрия Гагарина, привела к высадке первых астронавтов на Луну и к созданию международной космической станции, а сегодня позволяет планировать полет людей на Марс. Успехи электроники и материаловедения позволили создать вычислительные машины, способные осуществлять триллионы операций в секунду, запоминающие устройства меньше спичечного коробка, но с очень большой емкостью, разработать системы сверхскоростной передачи информации и создать одно из наиболее выдающихся чудес техники – Интернет.

Не столь впечатляющие, но не менее значимые для человечества события произошли в результате проникновения методов и представлений физики, химии и биологии в объяснение механизмов функционирования живых организмов. Хотя, конечно, углубление наших пониманий этих механизмов было постепенным, многоступенчатым процессом; можно указать критическую точку, которая в наибольшей мере стимулировала бурный рост наших познаний в этой области. Этой точкой стала опубликованная в 1953 году в журнале «Nature» эпохальная работа

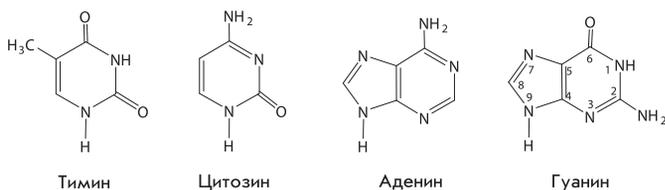
Джеймса Уотсона и Френсиса Крика, построивших пространственную модель дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [1].

Среди всего многообразия вопросов, задаваемых ученым живой природой, наиболее интригующим несомненно был вопрос, каким образом все огромное богатство информации, содержащееся в одной клетке, передается с высокой степенью точности последующим поколениям. Для ответа прежде всего требовалось понять, что служит материальным носителем этой информации. Нуклеиновые кислоты были открыты Мишером в 1869 году, однако до середины 20-х годов XX века ответственными за генетические функции живых организмов считались белки. И только в 1944 году Эвери и его сотрудники показали, что носителем генетической информации является ДНК [2].

Было очевидно, что такой носитель должен обладать тремя главными функциями. Во-первых, он должен иметь огромную информационную емкость, чтобы хранить информацию обо всем разнообразии свойств живого организма со всей его структурой и всеми функциями, присущими данному виду или даже индивиду. Во-вторых, этот носитель должен обладать механизмом, позволяющим реализовать эту информацию в виде конкретных структур живого организма и всех его многочисленных функций (осуществить экспрессию этой информации). В-третьих, что и было наиболее серьезным камнем

преткновения, должен существовать механизм передачи этой информации последующим поколениям.

Принципиальная возможность того, что носителем огромных массивов информации могла быть ДНК, вытекала из ее химической структуры. ДНК представляет собой линейный полимер, построенный из четырех различных мономеров – нуклеотидов, каждый из которых состоит из трех фрагментов – остатка углевода (дезоксирибозы), связанного с ним остатка ортофосфорной кислоты и одного из четырех гетероциклических остатков (оснований) – аденина, гуанина, тимина и цитозина.



Нуклеотиды связаны между собой фосфодиэфирными связями между остатками дезоксирибозы и фосфорной кислоты (рис. 1).

Такой принцип построения делает возможным существование невообразимо большого числа разных полимерных структур, отличающихся набором и последовательностями нуклеотидов. У полимера длиной в n звеньев число вариантов составляет $4^n = 10^{0.6n}$. Даже у очень короткого полимера длиной 200 мономерных звеньев это число (10^{120}) на много порядков превышает число атомов во всей доступной наблюдению части Вселенной (10^{80}). А ДНК даже у простейших организмов построена из сотен тысяч и даже миллионов нуклеотидов.

Приведенные расчеты означают, что подавляющее большинство мыслимых последовательностей нуклеотидов в принципе не могло появиться за время существования Вселенной и, следовательно, соответствующие им живые организмы не могли появиться и быть предметом естественного отбора. Значит, не исключено появление или создание организмов более совершенных, чем существующие в настоящее время.

Однако ни сам факт установления роли ДНК как носителя информации, ни огромная потенциальная информационная емкость молекул ДНК еще не давали ответа на наиболее интригующий вопрос – как эта необъятная информация передается из поколения в поколение. Оказалось, что эта способность заложена в пространственной структуре ДНК. Согласно модели, предложенной Уотсоном и Криком и нашедшей полное подтверждение в последующих бесчисленных экспериментальных работах, ДНК построена из двух полинуклеотидных цепей, основания

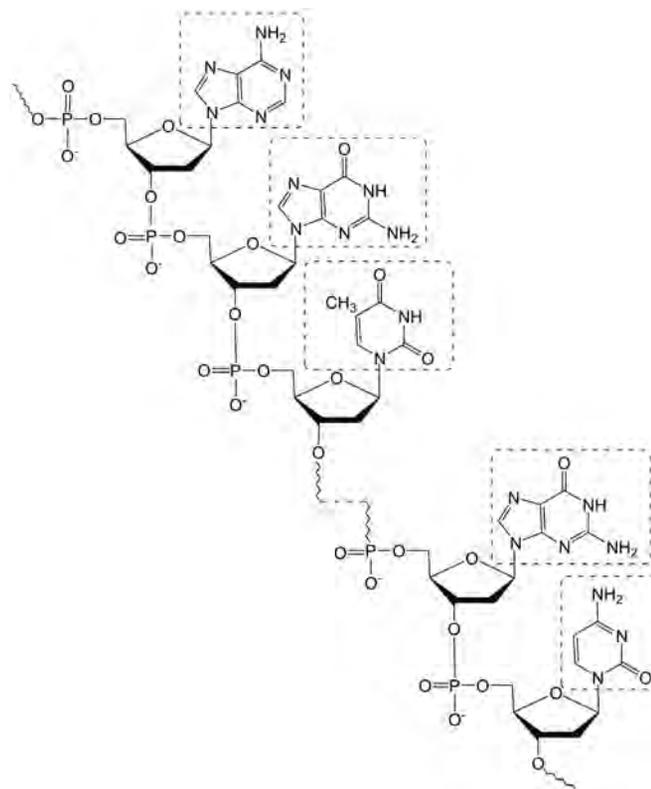


Рис. 1. Структура фрагмента молекулы ДНК.

которых попарно связаны между собой водородными связями. Причем в рамках предложенной структуры аденин может взаимодействовать только с тиминном, а гуанин – с цитозином. Такие последовательности в двух полинуклеотидных цепях получили название комплементарных. Наличие данного соответствия означает, что какой бы ни была последовательность нуклеотидов в одной из цепей, ей однозначно соответствует последовательность нуклеотидов во второй цепи. Отсюда следовал механизм передачи информации при клеточном делении от материнской клетки к двум образующимся дочерним. Согласно этому механизму, перед клеточным делением две полинуклеотидные цепи расходятся, и каждая из них управляет образованием (синтезом) новой комплементарной цепи, т.е. в каждой из двух дочерних клеток оказываются двухцепочечные структуры, идентичные структуре ДНК в материнской клетке. Существование этого процесса было подтверждено работой Мезельсона и Штала [3] вскоре после появления работы Уотсона и Крика. Мезельсон и Шталь растили клетки *Escherichia coli* на среде, содержащей $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ в качестве единственного источника азота. Затем клетки инкубировали на протяжении нескольких поколений в среде, содержащей обычный изотоп азота. Во всех последующих поколениях клеток в ДНК присутство-

вала ^{15}N -ДНК, т.е. тяжелая ДНК, которая образовалась на первой ступени эксперимента, оставалась интактной и просто передавалась при каждом делении одной из образующихся дочерних клеток.

Важнейшей особенностью работы Уотсона и Крика было установление структуры биологически значимой молекулы по известным к тому времени геометрическим параметрам отдельных химических связей. Они объяснили биологическое явление исходя из физико-химических характеристик молекул, обуславливающих это явление. Поэтому работу Уотсона и Крика можно считать днем рождения физико-химической биологии.

На сегодняшний день физико-химическая биология объединяет несколько крупных научных дисциплин – биологическую химию, биофизику, биоорганическую химию, молекулярную биологию. Конечно, исторически сложившееся разделение этих дисциплин не всегда полностью оправдано. Например, молекулярная биология в Википедии определяется как «наука о молекулярных основах биологической активности». Однако и биологическая химия уже достаточно давно опирается на молекулярные представления, описывая важнейшие биохимические процессы как превращения молекул определенной, как правило, известной химической структуры, а катализаторы этих процессов рассматривая как индивидуальные соединения, т.е. как молекулы. Поэтому вся современная биологическая химия является наукой молекулярной и могла бы претендовать на название «молекулярная биология». В связи с этим в настоящей статье автор будет избегать этого термина, и в дальнейшем речь будет идти о физико-химической биологии как науке, рассматривающей биологические явления на основе физико-химических свойств отдельных атомов и химических связей.

Работа Уотсона и Крика стимулировала бурное развитие исследований, что, в конечном итоге, позволило установить основные биохимические механизмы, обеспечивающие передачу и экспрессию генетической информации. Важным элементом этих механизмов было представление о матричном биосинтезе биополимеров, согласно которому каждый шаг удлинения создаваемой новой молекулы биополимера не только катализируется специальным ферментом, но и контролируется специальной матричной нуклеиновой кислотой, указывающей, какой именно мономер следует присоединять к растущей полимерной цепи на данном шаге. Описание этих механизмов содержится во всех современных зарубежных и отечественных учебниках и пособиях по биологической химии, например [4, 5].

Открытие ферментов, катализирующих синтез комплементарных молекул ДНК, привело к созданию

полимеразной цепной реакции (ПЦР) [6], нашедшей применение в медицинской диагностике, криминалистике и археологии.

Установление механизмов экспрессии ДНК и достижения химиков в синтезе олигонуклеотидов заданной последовательности привели к появлению генетической инженерии [7]. Стало возможным вырезать из ДНК определенный ген, внести в него желаемые изменения и вернуть его в соответствующий геном, т.е. осуществить сайт-направленный мутагенез [8].

Крупнейшей научной программой физико-химической биологии стала провозглашенная в 1990 году международная программа «Геном человека» – программа определения полной последовательности нуклеотидов (секвенирования) ДНК человека [9]. Уже в 2001 году Вентер (Venter) и 272 его соавт. опубликовали первую черновую версию полной последовательности нуклеотидов генома человека [10]. Созданные в рамках этой программы и продолжающие совершенствоваться методы открыли дорогу, с одной стороны, к созданию генетических карт каждого человека, а с другой, к определению структуры геномов всех животных, растений и микроорганизмов, существующих на земле. В этом отношении, даже несмотря на замечательные успехи в создании высокоэффективных скоростных методов секвенирования, молекулярные биологи обеспечены работой не на один десяток лет.

Весь путь, проделанный физико-химической биологией от работы Уотсона и Крика до установления структуры генома человека, можно рассматривать как поступательное движение, при котором поставленные задачи были ясны, речь шла лишь о создании методов их решения и проведении исследований. Но, наряду с этим открывались и новые, неожиданные факты. К числу их можно отнести открытие рибозимов Томасом Цехом [11] и Сидни Альтманом [12] и установление регуляторной роли малых интерферирующих РНК [13].

Естественно, что нельзя *a priori* исключить выявление в будущем новых, не вытекающих из всего предыдущего, физико-химических особенностей живой материи. Так, нельзя считать окончательно установленным полное информационное содержание генома человека. Всего 1.5% генома приходится на 23000 генов, кодирующих белки. Значительная часть генома определяет синтез различных некодирующих РНК – транспортных, рибосомных, интронов. Но это отнюдь не все оставшиеся 98.5% генома, огромная часть которого пока что квалифицируется как «мусорная» ДНК (junk DNA). Установление функции этой ДНК – одна из интригующих проблем физико-химической биологии. До сих пор неясным

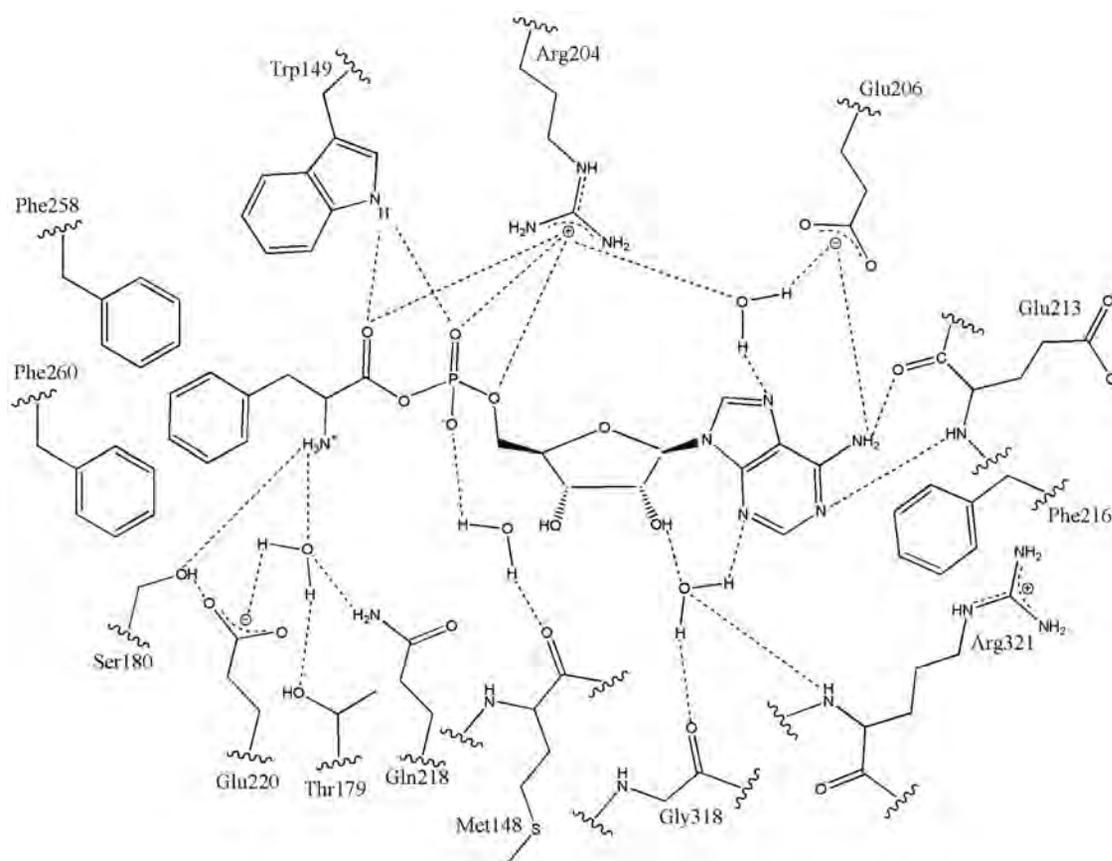


Рис. 2. Структура активного центра фенилаланил-тРНК-синтетазы в комплексе с промежуточным фенилаланиладенилатом. Пунктирными линиями отмечены водородные связи между атомами интермедиата и фермента со связанными с ним молекулами H_2O .

остаётся функциональное значение внеклеточных нуклеиновых кислот, присутствующих в ощутимых количествах, например в плазме крови [14].

Среди успехов физико-химической биологии в прошедшем веке следует отметить существенный прогресс в понимании механизмов биологического катализа, достигнутый при помощи рентгеноструктурного анализа белков и изучения их структуры методом ЯМР-спектроскопии. К настоящему времени накоплен огромный материал по атомной структуре активных центров ферментов и их комплексов со специфическими лигандами, что позволило сформулировать разумные гипотезы о механизме узнавания и каталитических превращений. Чтобы получить представление об уровне получаемой информации о природе активных центров ферментов, на рис. 2 приведена схема расположения в активном центре фермента фенилаланил-тРНК-синтетазы промежуточного продукта реакции – фенилаланиладенилата, и связей, образуемых группами активного центра фермента с интермедиатом, включая участвующие во взаимодействии молекулы воды [15].

Однако в XXI веке, по мнению автора, основные акценты физико-химической биологии должны смещаться. Можно выделить несколько аспектов, кото-

рые требуют приоритетного развития как теоретического, так и экспериментального. Прежде всего, существенно большего внимания требует вопрос о роли молекулярной динамики в биологических процессах.

Динамический характер поведения биополимеров в ходе их функционирования естественно не был откровением. Однако органическая химия, в том числе биоорганическая, в основном оперировала со структурой, по сути своей статической. Динамические события рассматривались, в основном, как переход от статических структур реагентов к статическим структурам продуктов реакции. В лучшем случае рассматривались промежуточные соединения, но они тоже представлялись как некие статические структуры. Конечно, любой образованный химик прекрасно понимал, что молекулы, в том числе и молекулы биополимеров, подвержены внутренним движениям, таким, как атомные колебания, происходящие в субпикосекундной шкале времени, флуктуациям боковых радикалов в пико-наносекундной временной шкале, конформационным перегруппировкам в миллисекундном диапазоне и ещё более медленным внутримолекулярным движениям. Встающий перед молекулярной динамикой биополимеров вопрос со-

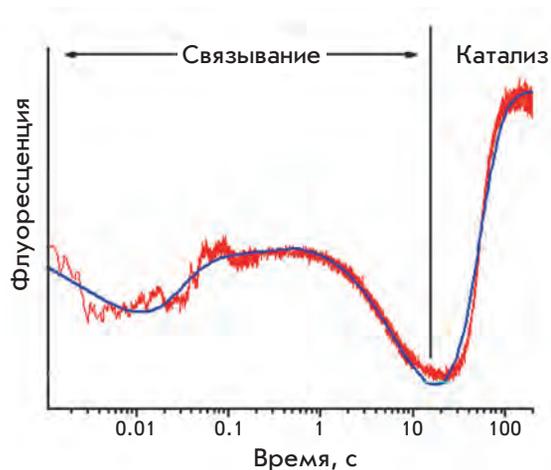


Рис. 3. Кинетическая кривая изменения флуоресценции (произвольные единицы) в начальной фазе реакции выщепления 8-оксогуанина из олигонуклеотида, содержащего окисленный остаток гуанина.

стоит не в констатации и описании таких движений, а в установлении роли такого рода динамических событий в процессах узнавания, в каталитических превращениях, во внутри- и межклеточной сигнализации. На сегодняшний день наиболее широко обсуждается роль динамических факторов в ферментативном катализе [16].

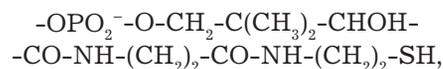
Применительно к ферментативному катализу вопрос о роли динамики впервые четко прозвучал в гипотезе вынужденного соответствия (*induced fit*), сформулированной Кошландом [17]. Согласно его предположению, в структуре активного центра фермента и субстрата изначально не существует идеального соответствия, позволяющего сразу же после образования комплекса фермент–субстрат приступить к осуществлению химического превращения. Этому процессу должна предшествовать конформационная подстройка комплекса, т.е. определенные перемещения атомов, которые обеспечивают необходимое соответствие претерпевающих превращение химических связей субстратов и участков активного центра фермента, осуществляющих каталитический процесс.

Эта концепция получила экспериментальное подтверждение в данных по предстационарной кинетике. Наблюдать подобные изменения в настоящее время удастся с использованием методов быстрой кинетики, таких, как метод остановленной струи (*stopped flow*) для миллисекундного диапазона и релаксационные методы (*T-jump*, температурный скачок) для микросекундного диапазона [18]. В качестве примера на *рис. 3* приведены полученные методом

остановленной струи кривые для реакции выщепления основания (8-оксогуанина), катализируемого 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой. За превращением наблюдали по флуоресценции остатков триптофана. На первом этапе отчетливо видны изменения конформации, причем регистрируется несколько стадий и лишь на заключительной происходит отчетливо регистрируемое освобождение продукта реакции – 8-оксогуанина [19].

Временной диапазон применимости релаксационных методов значительно расширило применение современных лазеров, позволяющих облучать системы фемтосекундными импульсами, создавая за такое короткое время скачок температуры [20, 21]. Более того, если в растворе присутствуют соединения, у которых pK_a электронно-возбужденного состояния достаточно сильно отличается от pK_a основного состояния, то лазерным импульсом можно осуществить скачок pH [22, 23].

Важную динамическую проблему представляет механизм переключения функционирующей системы с одного режима на другой, достаточно сильно отличающийся от предыдущего. Этот вопрос возникает уже применительно к катализу теми ферментами или ферментативными комплексами, которые обладают несколькими каталитическими функциями, проявляющимися в определенном порядке. Это касается всех мультифункциональных ферментов, в которых последовательное включение разных функций обеспечивается «качающейся ножкой», достающей разные активные центры. Таких примеров довольно много, одним из них может служить синтаза жирных кислот – комплекс белков, катализирующий последовательное наращивание двууглеродными фрагментами углеродного скелета жирной кислоты [24]. Растущая цепь углеродного остатка на протяжении всего процесса связана тиоэфирной связью с SH-группой остатка фосфоантетеина,



который ковалентно присоединен фосфоэфирной связью к остатку серина ацилпереносящего белка (ACP – *acyl-carrier protein*). Ножка содержит большое число σ -связей и поэтому обладает высокой гибкостью. Это позволяет ацильному остатку попеременно перемещаться между активными центрами, катализирующими последовательные стадии биосинтеза жирных кислот из ацетильных остатков. Первичным источником ацетильных групп является ацетилованный кофермент А, $\text{CoAS}-\text{COCH}_3$ – основной продукт катаболизма сахаров, жиров и ряда аминокислот. Ацетильный остаток карбоксилируется, а образовавшийся-

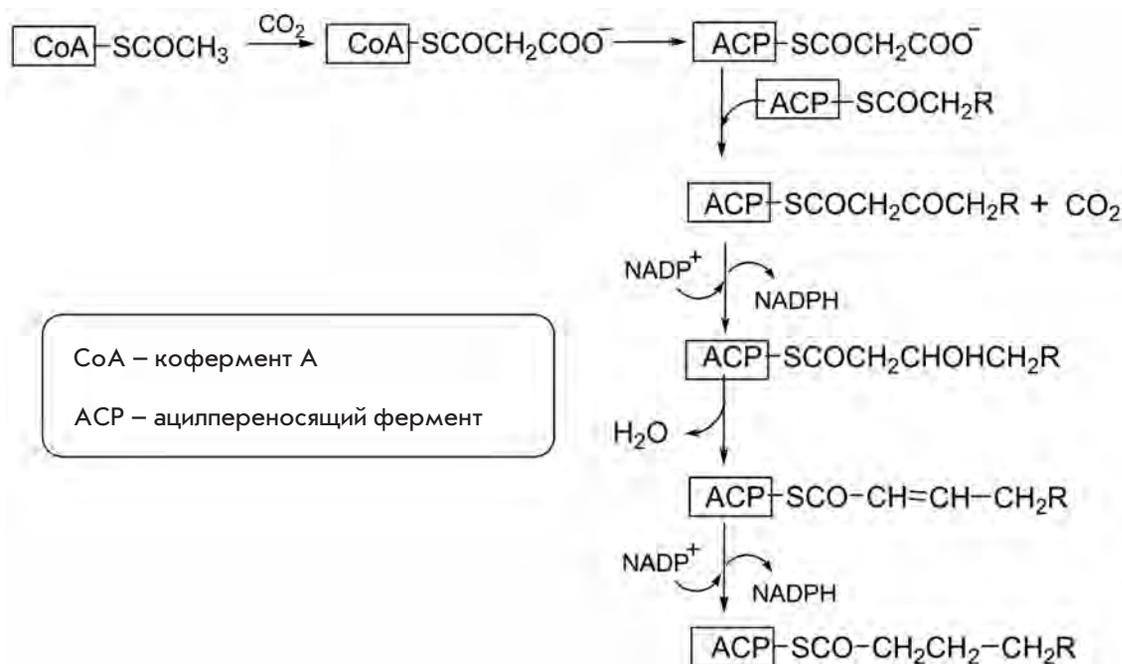


Рис. 4. Схема наращивания двууглеродного фрагмента, катализируемого синтазой жирных кислот.

ся малонильный остаток переносится от кофермента А на АСР в соответствии с реакцией:



На рис. 4 представлена схема процессов, происходящих с каждым введенным в процесс двууглеродным фрагментом. Непосредственным донором этих фрагментов является малонил-АСР, который присоединяется к растущей цепи с отщеплением CO_2 и разрывом связи фрагмента с белком, восстановлении фрагмента до $-\text{СНОНСН}_3$, его дегидратации до $-\text{СН}=\text{СНСН}_3$ и восстановлении до $-\text{СН}_2\text{СН}_3$.

Каждая из этих реакций протекает, естественно, с участием своего активного центра. Активные центры могут располагаться либо на разных полипептидных цепях (у эубактерий), либо на одном полифункциональном белке (эукариоты, в том числе человек). Качающаяся ножка АСР должна в определенном порядке доставить фрагмент $\text{СОСН}_2\text{R}$ в четыре активных центра для прохождения всех последовательных превращений.

Новую важную проблему, требующую рассмотрения с позиций молекулярной динамики, представляет изучение внутренне неупорядоченных белков (intrinsically unordered proteins) [25–27]. В настоящее время обнаружено большое число таких белков, которые, вопреки установившейся точке зрения, функционируют в отсутствие определенной третичной

структуры. Едва ли такие белки представляют собой просто статистический клубок полипептидной цепи. Скорее всего, в растворе они представляют собой целый ансамбль быстро переходящих друг в друга конформаций. Преобладание белков с неупорядоченной конформацией характерно для многих нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Гентингтона и спинозомозжечковая атаксия (нарушение походки и других видов координации движений). Однако многие белки с неупорядоченной пространственной структурой или, по крайней мере, содержащие достаточно протяженные (свыше 50 аминокислотных остатков) неупорядоченные участки, встречаются в норме, причем у эукариот их существенно больше, чем у одноклеточных организмов. Среди таких белков особенно часто встречаются факторы транскрипции, белки, участвующие в ремоделировании хроматина и во внутриклеточной сигнализации. Речь, конечно, не идет о полной неупорядоченности. Это видно хотя бы по тому, что многие неупорядоченные белки становятся структурированными при связывании со своими мишенями. Неупорядоченность, точнее неполная структурная упорядоченность многих белков, создает серьезную проблему на пути установления пространственной структуры, так как такие белки не дают рефлексов при рентгеноструктурном анализе. В то же время накапливается все больше данных о том, что такие неупорядоченные участки наиболее характерны для полифункциональных белков. По-видимому, среди конформаций подобных

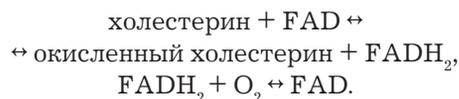
псевдонеупорядоченных белков есть и конформации, в которых белок проявляет сродство к разным партнерам. Для подобных белков характерно небольшое содержание аминокислотных остатков с объемными гидрофобными радикалами, повышенным содержанием полярных и заряженных остатков.

Теоретическое изучение молекулярной динамики биополимеров в значительной мере ограничено возможностями существующей к настоящему времени вычислительной техники. Расчет молекулярной динамики естественно предполагает пошаговую процедуру. При этом размер шага должен составлять фемтосекунды. С таким шагом в случае молекул биополимеров, состоящих из тысяч атомов, даже для современных суперкомпьютеров и программ возможно продвижение лишь на десятки наносекунд. Между тем наиболее интересные конформационные события протекают в диапазоне микро- и даже миллисекунд.

Преобладающая часть работ в области физико-химических основ процессов жизнедеятельности, особенно в случае количественных характеристик этих процессов, выполнена *in vitro*. По-видимому, полученные в большинстве исследований величины можно в значительной мере отнести и к внутриклеточным процессам, особенно к процессам в клетках эукариот. Каждая обычная эукариотическая клетка может нести большое число молекул биополимеров, и ее цитозоль не столь сильно отличается от условий в пробирке. Это можно продемонстрировать простым расчетом клетки сферической формы с линейным размером 20 мкм, типичным для клеток эукариот. Расчет более наглядно вести в единицах массы в дальтонах (Да) и длины в ангстремах (Å) (условно их можно называть «клеточными»). Поскольку $1 \text{ г} = 6 \times 10^{23} \text{ Да}$, а $1 \text{ см} = 10^8 \text{ Å}$, то плотность в этих единицах будет измеряться в $1 \text{ г/см}^3 = 0.6 \text{ Да/Å}^3$. Объем клетки составит примерно 4×10^{15} , а объем достаточно крупной белковой молекулы (примерно 100 кДа) в этих единицах будет равен примерно 10^5 Å^3 , т.е., если принять, что белки занимают 10% объема цитозоля, даже таких молекул в клетке может разместиться около 4 млрд штук. Таким образом, можно считать, что условия в цитозоле (с поправкой на повышенную вязкость 10%-ного раствора белка) принципиально отличаются от условий в пробирках. Таким же образом можно оценить размещение белков на поверхности клетки. Полагая, что 10% поверхности плазматической мембраны занято «вмонтированными» в нее белками, легко подсчитать, что на ней может разместиться (в качестве рецепторов, транспортных белков, каналобразователей *etc.*) порядка 4×10^5 белков с молекулярной массой 100 кДа.

Исследования как *in vitro*, так и на уровне целых клеток дают информацию о физико-химических характеристиках биохимических процессов, усредненных по всему ансамблю вовлеченных в них молекул. В связи с этим новым важным направлением являются открывающиеся в результате развития техники исследований возможности работать с отдельными молекулами. Эти исследования направлены, с одной стороны, на создание методов установления нуклеотидной последовательности единичной молекулы ДНК, в настоящее время такие работы достаточно далеко продвинулись [28]. Второе направление – функционирование отдельных молекул. Работа в этом направлении нуждается в высокочувствительных методах, поэтому такие исследования проводятся с использованием флуоресцирующих компонентов.

Наибольшее внимание в настоящее время уделяется изучению реакций, катализируемых одной молекулой фермента. В этом случае реакция должна сопровождаться изменением флуоресценции. В качестве примера можно привести холестериноксидазу [КФ 1.1.3.6] [29], катализирующую окисление холестерина молекулярным кислородом. Реакция протекает в две стадии:



Холестерин окисляется связанным с белковой частью фермента флуоресцирующим кофактором флавинадениндиклеотидом (FAD). При окислении холестерина FAD переходит в нефлуоресцирующую восстановленную форму FADH₂. На второй стадии реакции FADH₂ окисляется молекулярным кислородом до исходного FAD. Каждый отдельный каталитический акт характеризуется затуханием и возгоранием флуоресценции, что позволяет следить за каждым актом функционирования фермента. На *рис. 5* приведены результаты регистрации флуоресценции при каталитическом окислении холестерина.

Второе важное применение спектроскопии единичных молекул – исследование свертывания макромолекул. Так, с помощью флуоресценции единичных молекул можно наблюдать динамику формирования пространственной структуры РНК, которую можно регистрировать с помощью метода FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции) [30]. Интенсивность переноса энергии флуоресценции между связанными с определенными точками флуорофорами облучаемого донора флуоресценции и ее акцептора обратно пропорциональна шестой степени расстояния между ними. Если в ходе формирования пространственной структуры расстояние между флуорофорами меня-

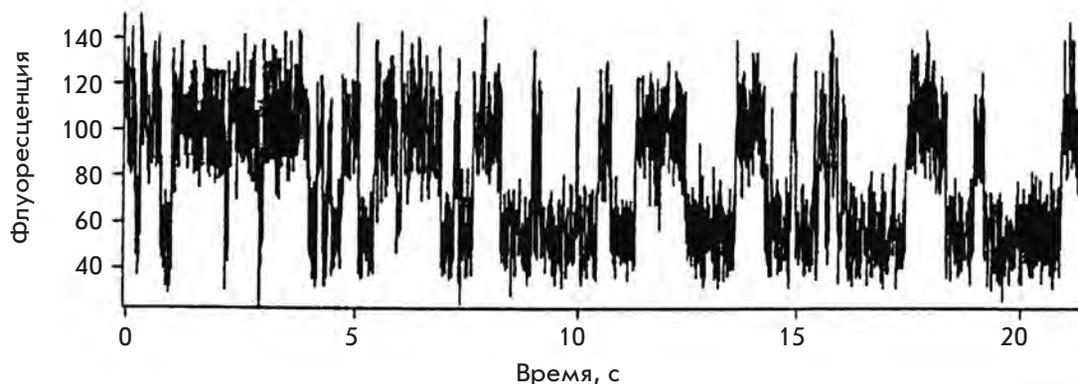


Рис. 5. Регистрация флуоресценции кофактора в ходе окисления холестерина.

ется, это будет сказываться на флуоресценции акцептора между ними. При изменении пространственной структуры интенсивность флуоресценции акцептора энергии будет изменяться.

Рассмотренные выше задачи, встающие перед физико-химической биологией, касаются белков и нуклеиновых кислот, исследованию которых в XX веке уделялось приоритетное внимание. Говоря о новых горизонтах физико-химической биологии, следует отметить необходимость усиления внимания и к другим группам соединений. В первую очередь,

это относится к углеводам нерегулярного строения, которые играют важную роль в обеспечении ряда высокоселективных процессов, таких, как распределение биохимических процессов по клеточным органеллам. Помимо важного познавательного значения, указанные направления несомненно будут вносить большой вклад в конструирование новых лекарственных препаратов, в изучение их взаимодействий с живыми организмами, их трансформации и побочных эффектов и тем самым станут важнейшим звеном медицины XXI века. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watson G.D., Crick F.H. // *Nature*. 1953. V. 172. P. 737–738.
2. Avery O.T., MacLeod C., McCarty M. // *J. Exp. Med.* 1944. V. 79. P. 137–158.
3. Meselson M., Stahl F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1958. V. 44. P. 671–682.
4. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. *Principles of Biochemistry*. N.Y.: Worth Publ., 2008. 1013 p.
5. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. *Биологическая химия*. М.: Высшая школа, 1998. 479 с.
6. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. // *Science*. 1985. V. 230. P. 1350–1354.
7. Шелкунов С.Н. *Генетическая инженерия*. Новосибирск: Сибирское Университетское издательство, 2004. 496 с.
8. Hutchison C.A. 3rd, Phillips S., Edgell M.H., Gillam S., Jahnke P., Smith M. // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. P. 6551–6560.
9. Watson J.D. // *Science*. 1990. V. 248. P. 44–49.
10. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans Ch.A., Holt R.A., et al. // *Science*. 2001. V. 291. P. 1304–1351.
11. Kruger K., Grabowski P.J., Zaug A.J., Sands J., Gottschling D.E., Cech T.R. // *Cell*. 1982. V. 31. P. 147–157.
12. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S. // *Cell*. 1983. V. 35. P. 849–857.
13. Hamilton A., Baulcomb D. // *Science*. 1999. V. 286. P. 950–952.
14. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. // *BioEssays*. 2007. V. 29. P. 654–667.
15. Safro M., Moor N., Lavrik O. *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*. Texas. Georgetown: Landes Biosciences, 2005. P. 250–270.
16. Callender R., Dyer R.B. // *Chem. Rev.* 2008. V. 106. P. 3031–3042.
17. Koshland D.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1958. V. 44. P. 98–104.
18. Хеммис Г. *Методы исследования быстрых реакций*. М.: Мир, 1977. 716 с.
19. Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Koval V.V., Buckle M., Fedorova O.S. // *Biochemistry*. 2009. V. 48. P. 11335–11343.
20. Anfinsen P.A., Han C., Hochstrasser R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 8387–8391.
21. Richard L., Genberg L., Deak J., Chiu H.-L., Miller R.J.D. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 10703–10715.
22. Gutman M., Huppert D., Pines E. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1981. V. 103. P. 3709–3713.
23. Iu K.K., Kuczynski J., Fuernis S.J., Thomas J.K. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 4871–4878.
24. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. *Principles of Biochemistry*. N.Y.: Worth Publ., 2008. P. 805–814.
25. Wright P.E., Dyson H.J. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 293. P. 321–331.
26. Dunker A.K., Silman I., Uversky V.N., Sussman J.L. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. V. 18. P. 756–764.
27. Uverski V.N. // *Intern. J. Biochem. Cell. Biol.* 2011. V. 43. P. 1090–1103.
28. Pushkarev D., Neff N., Quake S. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 847–850.
29. Xie X.S., Lu H.P. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 15967–15970.
30. Bokinsky G., Zhuang X. // *Acc. Chem. Res.* 2005. V. 38. P. 566–573.

УДК 577.57.017.6

Функции теломеразы: удлинение теломер и не только

М. П. Рубцова^{1,2*}, Д. П. Василькова¹, А. Н. Малякко¹, Ю. В. Нарайкина³, М. Э. Зверева^{1,2},
О. А. Донцова^{1,2}

¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

³Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

*E-mail: mprubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 08.02.2012 г.

РЕФЕРАТ На концах хромосом находятся специальные структуры – теломеры, от длины которых зависит пролиферативный потенциал клетки, или число делений, которые клетка может совершить до своей гибели. Длину теломер поддерживает фермент теломераза. К примеру, в эмбриональных клеточных линиях теломераза активна, и длина теломер в них остается постоянной, т.е. эти клетки обладают неограниченным потенциалом деления. В стволовых клетках активность теломеразы ниже, что позволяет лишь частично компенсировать укорачивание теломер. В соматических клетках активность теломеразы обычно отсутствует. Укорачивание теломер продолжается до тех пор, пока теломера не теряет способность защищать концы хромосомы, тогда клетка достигает предела Хейфлика и переходит в состояние старения, а после этого наступает кризис, сопровождающийся массовой гибелью клеток. Уцелевшие клетки превращаются в иммортальные или в злокачественные (раковые), способные к неограниченному делению и поддержанию длины теломер (как правило, с помощью теломеразы). Теломераза является обратной транскриптазой. Она состоит из двух основных компонентов – теломеразной РНК (TER) и обратной транскриптазы (TERT). TERT относится к некодирующим РНК, она содержит участок, служащий матрицей для синтеза теломер. В последнее время появляется все больше работ об альтернативных функциях компонентов теломеразы. В настоящем обзоре суммированы данные о структуре, биогенезе и функциях теломеразы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА теломераза, обратная транскриптаза, теломеры, митохондрия, повреждения ДНК, экспрессия генов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TER – теломеразная РНК; TERT – теломеразная обратная транскриптаза.

ВВЕДЕНИЕ

В клетках эукариот генетическая информация хранится в линейных молекулах ДНК – хромосомах [1]. Еще в 1930-х гг. обнаружили, что целые хромосомы и их обломки по-разному ведут себя в клетках. Разорванные хромосомы сливаются друг с другом, рестраиваются и характеризуются нестабильностью [2, 3]. Тогда же предположили, что подобные различия обусловлены присутствием на концах хромосом специальных нуклеотидных последовательностей, которые называли теломерами [3–5]. Теломеры состоят из повторяющихся последовательностей и набора специальных белков, которые взаимодействуют с такими повторами и организуют их в пространстве особым образом, образуя нуклеопротеидный комплекс – теломерный гетерохроматин [6, 7]. В ходе

репликации генома, происходящей при делении клеток, в результате удаления концевой РНК-затравки и, как следствие, неполной репликации линейных молекул ДНК наблюдается укорачивание 5'-конца дочерней цепи. Эту «проблему концевой недорепликации» в 1970-х гг. независимо сформулировали А.М. Оловников и Дж. Уотсон [8, 9]. Оловников предположил, что существует специальный фермент – теломераза, который может компенсировать «проблему концевой недорепликации». Этот фермент был открыт в 1987 г. Э. Грейдер и К. Блэкберн [10].

В состав теломеразы входят два основных компонента – обратная транскриптаза (TERT) и теломеразная РНК (TER), содержащая матричный участок для синтеза теломерных повторов [9]. Кроме того, в теломеразный комплекс входят многочисленные

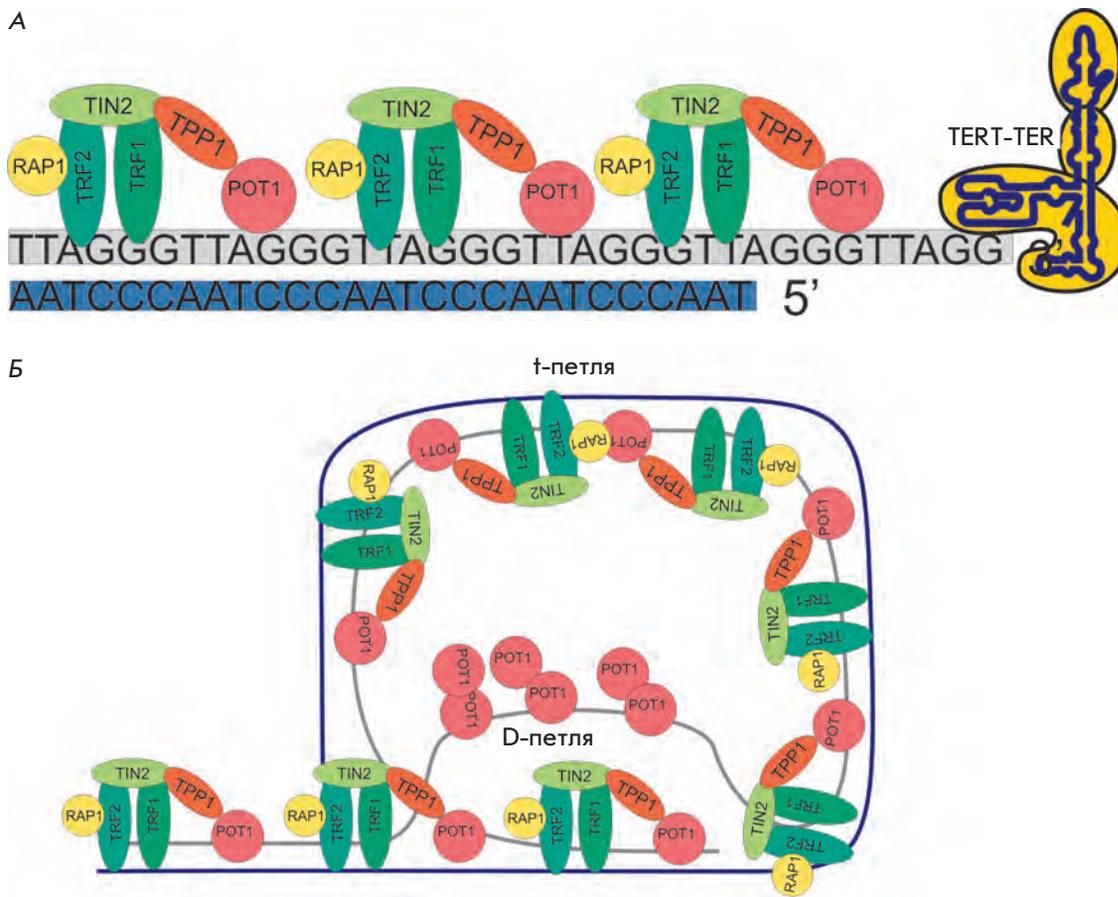


Рис. 1. Структура теломер. А – Схематическое изображение комплекса теломерной ДНК, белков шелтеринового комплекса и теломеразы. Б – Схематическое изображение шелтеринового комплекса, связанного с теломерной ДНК, в конфигурации t-петли.

дополнительные компоненты, обеспечивающие активность фермента *in vivo*. Дополнительные белки участвуют в разных процессах. Часть из них необходима для посадки теломеразы на теломеру в определенный момент клеточного цикла [10], другие белки регулируют активность фермента [11]. Известно, что теломераза работает не во всех клетках высших эукариот, однако, ее компоненты присутствуют в клетке практически всегда. В последнее время стали появляться данные о функциях компонентов теломеразы, не связанных с теломерами.

СТРУКТУРА ТЕЛОМЕР

Теломеры представляют собой повторяющиеся нуклеотидные последовательности, с которыми связаны специальные белки, защищающие концы хромосом от деградации и систем репарации двухцепочечных разрывов [12, 13]. По мере накопления данных была высказана гипотеза о том, что теломеры состоят из трех частей. Они содержат, во-первых, так называемый кеп – концевую структуру, которая защищает концы хромосом от деградации и системы репарации двухцепочечных разрывов (DDR – DNA damage response), а также контролирует удлинение теломер. Основная часть теломеры представлена двухцепочечной ДНК (дцДНК), состоящей из повторяющихся

и транскрибируемых последовательностей. Третью часть теломеры также занимают повторяющиеся последовательности, так называемые субтеломерные области [14, 15]. Нуклеотидная последовательность теломер обогащена остатками тимидина и гуанозина и достаточно консервативна. Теломеры млекопитающих представляют собой двухцепочечный участок, который состоит из повторов ТТАGGG и 3'-выступающего участка G-цепи длиной 150–200 нуклеотидов. Согласно одной из гипотез, выступающий участок G-цепи переплетается с двухцепочечным участком теломеры, образуя t-петлю. В месте взаимодействия выступающего 3'-конца с двухцепочечным участком образуется так называемая D-петля (рис. 1). t-Петли были обнаружены методом электронной микроскопии после выделения и специальной обработки ДНК. Однако существование таких структур в клетках однозначно не доказано, поэтому D-петли рассматриваются как предполагаемые структуры.

Функции теломер зависят от минимальной длины теломерных повторов и активности ассоциированного с ними белкового комплекса. Этот комплекс называется шелтерином и состоит из шести белков: TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 и RAP1. Белки TRF1, TRF2

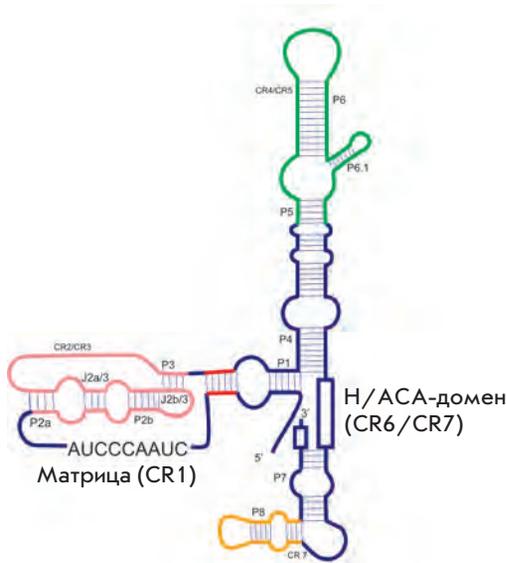
(telomeric repeat binding factor 1 и 2) и POT1 (protection of telomere protein 1) связаны с теломерной ДНК. TRF1 и TRF2 связываются с двухцепочечными участками теломер, а POT1 – с 3'-выступающим одноцепочечным участком G-цепи [16]. TRF1 и TRF2 связывают теломеры независимо, между собой они не взаимодействуют. Оба белка в виде гомодимера и олигомера специфично связывают ДНК-дуплекс с теломерной последовательностью 5'-YTAGGGTTR-3' [16–20]. POT1 высокоспецифично связывается с теломерной одноцепочечной ДНК (оцДНК) 3'-TAGGGTTRAG-3', указывая на возможность взаимодействия как с выступающей G-цепью, так и с вытесняемой ею последовательностью D-петли [13, 21–23]. POT1 взаимодействует с TRF1. Считается, что таким образом TRF1 способствует связыванию POT1 с одноцепочечным участком теломеры. Своими независимыми доменами TIN2 (TRF1-interacting protein 2) взаимодействует одновременно с TRF1 и TRF2, а также с комплексом TPP1–POT1, образуя мостик между компонентами шелтеринового комплекса [24, 25]. C-Концевой домен TPP1 связывается с TIN2, а центральный с POT1 [26–29], привлекая таким образом POT1 на теломеры [30, 31]. Кроме того, на N-конце TPP1 находится домен, взаимодействующий с теломеразой. Этот факт подтверждает предположение о том, что TPP1 привлекает теломеразу на конец хромосомы [32]. Белок RAP1 образует комплекс с TRF2 и с теломерой [33, 34]. В работах нескольких групп показано, что RAP1 не важен для кепирования теломер, но он препятствует рекомбинации на теломерных участках и повышает их стабильность [35, 36]. Таким образом, RAP1, в отличие от TRF1, TRF2, POT1 и TPP1, не защищает теломеры [32, 35, 36].

Существует гипотеза о формировании в теломерных областях хромосом G-квадруплексных структур. Четыре теломерных повтора способны образовывать G-квадруплекс, который ингибирует теломеразную активность [37–41]. С помощью антител, специфичных к G-квадруплексным структурам, прямо показано образование таких структур в клетках ресничных [42, 43]. Косвенно способность теломерных областей высших эукариот к формированию G-квадруплексных структур подтверждается экспериментальными данными. Согласно [44], длинные 3'-выступающие теломерные концы образуют G-квадруплекс *in vitro*. Известно, что лиганды, связывающие G-квадруплексные структуры, вызывают укорачивание теломер в клетках. При этом активность теломеразы не изменяется, но нарушается взаимодействие шелтеринового комплекса с теломерной ДНК. Теломеры становятся при этом нестабильными, связывание POT1 с ними нарушается, и в клетках активируется система ответа на повреждения ДНК.

Это может свидетельствовать о вредных для клетки последствиях стабилизации G-квадруплексов в теломерных областях. Образование таких структур, по-видимому, возможно в переходных состояниях, но теломеры не способны постоянно поддерживать структуру G-квадруплексов [45].

Известно, что хромосомы в клетках эукариот упакованы специальными белками в хроматин. Считается, что в конденсированном состоянии хроматин не транскрибируется, а с эухроматином ассоциирован аппарат транскрипции клетки [46]. Теломерные участки хромосом образуют также так называемый теломерный хроматин [47]. Предполагается, что удлинение теломер может зависеть от эпигенетического статуса теломерного хроматина [48]. Известно, что как теломерные, так и субтеломерные участки обогащены гистонами, обычно связанными с репрессированными участками гетерохроматина, такими, как гистоны H3 (H3K9m3) и H4 (H4K20), триметилированные по остаткам лизина 9 и лизина 20 соответственно. С этими участками связаны и гетерохроматинсвязывающие белки 1 α , 1 β и 1 γ (известные как CBX5, CBX1 и CBX3 соответственно) [49–51]. Кроме того, установлено, что теломерная ДНК сильно метилирована. Хромосомы в клетках, в которых отсутствуют N-метилтрансферазы (SUV420H1 и SUV39H1), модифицирующие остатки лизина в гистонах, содержат слишком длинные теломеры [49, 50]. Такой же эффект наблюдается и в клетках со сниженным за счет дефицита DICER1 или ДНК-(цитозин-5) метилтрансфераз 1, 3A и 3B (DNMT1, 3A и 3B) статусом метилирования субтеломерных областей [52]. Не так давно обнаружили РНК, содержащую теломерные повторы – TERRA (Telomeric Repeat containing RNA), или теломерную РНК – TelRNA, которая образуется в результате транскрипции теломер. Эта РНК может взаимодействовать с теломерным хроматином и подавлять удлинение теломер *in vitro*, действуя как потенциальный ингибитор теломеразы [48, 53, 54]. Можно предположить, что в случае онкотрансформации клеток синтез TERRA должен репрессироваться, чтобы она не могла подавлять активность теломеразы.

Теломерный хроматин динамичен и его состояние может изменяться. В результате ядерного перепрограммирования дифференцированные соматические клетки могут стать индуцированными плюрипотентными клетками (iPS – induced pluripotent cell) [55]. Переход клеток в плюрипотентное состояние сопровождается изменениями в эпигенетическом статусе теломер. Теломерный хроматин становится менее конденсированным, в нем снижается содержание гистонов, что приводит к образованию большего количества TERRA, учащению рекомбинации теломер, длина теломер при этом увеличивается и становится



Теломеразная РНК человека

- Псевдоузел
- Элемент, связывающий матрицу
- Трансактивирующий домен
- Стабилизирующая шпилька

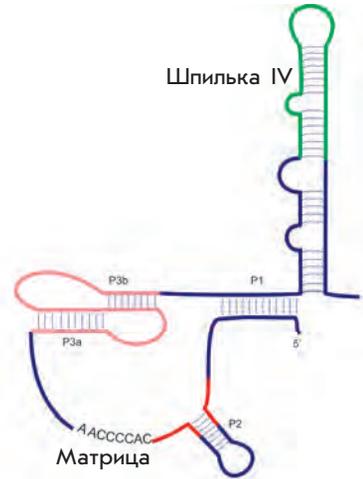
такой же, как и в эмбриональных стволовых клетках [56]. Хотя прямых доказательств регуляции длины теломер за счет изменения состояния хроматина еще не получено, приведенные наблюдения позволяют предположить такую возможность.

СТРУКТУРА ТЕЛОМЕРАЗЫ

Сборка теломеразы, ее существование в клетке и посадка на теломеры – процессы, в чем-то сходные, а в чем-то отличные у эволюционно далеких организмов [57–59]. Общие свойства обнаружены у всех компонентов теломеразы: обратной транскриптазы (TERT – telomerase reverse transcriptase), теломеразной РНК (TER – telomerase RNA) и TER-связывающих белков, которые стабилизируют РНК и способствуют сборке активного фермента. Необходимо отметить, что только TERT является высококонсервативным компонентом теломеразы. Результаты изучения компонентов, входящих в состав теломеразы, весьма противоречивы [60–64]. По-видимому, в процессе жизнедеятельности теломеразы, взаимодействуя с различными компонентами, может находиться в разных комплексах.

Структура TER

Теломеразная РНК – один из основных компонентов теломеразы, она содержит участок, который



Теломеразная РНК *T. thermophila*

Рис. 2. Структура теломеразной РНК. Схематическое изображение вторичных структур теломеразной РНК человека и *T. thermophila*. Консервативные элементы выделены цветом.

служит матрицей для синтеза теломер [65, 66]. Несмотря на различия в длине и нуклеотидной последовательности теломеразных РНК из разных организмов, вторичные структуры TER демонстрируют высокое сходство и содержат одинаковые структурные элементы [65, 67]. Консервативными в структуре TER являются матричный участок, псевдоузел, *транс*-активируемый домен и домены, необходимые для стабильности *in vivo* (рис. 2). Таким образом, в состав TER входят элементы, необходимые для теломеразной активности, а также для сборки, локализации и стабильности РНК, но не требуемые для ферментативной активности. Матричный участок TER взаимодействует с 3'-выступающей частью G-цепи теломер и направляет синтез ДНК. Этот участок должен быть одноцепочечным, хотя анализ вторичной структуры полученного *in vitro* транскрипта и TER в экспериментах *in vivo* выявляет различия в структуре, что свидетельствует о его взаимодействии с другими компонентами клетки [68–70]. Не так давно методом ЯМР получены данные об образовании триплексной структуры между элементами псевдоузла и матричным участком. Возможно, именно образованием этой структуры и объясняются различия в структуре матричного участка TER [71]. Предполагается также, что в отсутствие TERT и других необходимых компонентов TER не образует правильную струк-

туру. Матричный участок фланкируют два элемента: 5'-матричный ограничивающий и 3'-матричный узнающий [72–75]. 5'-Элемент представляет собой двухцепочечный участок, расположенный непосредственно перед матричным участком, он регулирует добавление нуклеотидов в ходе обратной транскрипции и, по-видимому, является участком связывания с TERT. С помощью мутагенеза показали, что для эффективного функционирования теломеразы важна не нуклеотидная последовательность, а именно вторичная структура этого участка. 3'-Узнающий элемент – это одноцепочечная структура, расположенная после матричного участка, которая позволяет 3'-концу матрицы занять активный центр, стимулирует теломеразную активность и процессивность при добавлении повторов, а также содержит участок связывания N-конца TERT [76, 77].

Из элементов вторичной структуры теломеразной РНК наиболее интенсивно изучается псевдоузел. Изменения стабильности псевдоузла приводят к снижению активности теломеразы, что указывает на важную биологическую роль этого структурного элемента [78, 79]. Полученные за последнее время результаты изучения олигонуклеотидов, имитирующих элементы структуры псевдоузла TERC, методом ЯМР и молекулярного моделирования подтвердили, что именно динамика третичной структуры псевдоузла играет важную роль в функционировании теломеразы [80–85]. Псевдоузел формируется благодаря образованию эволюционно консервативного Хугстеновского триплета U^{*}A^{*}U между U-богатой петлей 1 (J2b/3) и основной шпилькой в стебле (P3), которая помогает поддерживать структурную целостность и требуется для активности теломеразы. В то же время A-богатая петля 2 (часть J2a/3) вступает еще в два неканонических триплетных взаимодействия, которые способствуют стабилизации псевдоузла [86, 87]. Между этими двумя структурными элементами, состоящими из триплетов, находится еще одна Хугстеновская пара A^{*}U, которая создает стэкинговое взаимодействие двух основных стеблей, что приводит к формированию окончательной структуры тройной спирали [85]. Мутации нуклеотидов внутри псевдоузла приводят к разрушению третичной структуры и значительно снижают активность теломеразы, а компенсаторные мутации восстанавливают теломеразную активность. Эти данные свидетельствуют о том, что третичная структура более существенно влияет на каталитическую активность фермента, чем последовательность нуклеотидов [71, 87, 88]. Предполагается, что псевдоузел позволяет правильно ориентировать дуплекс, состоящий из матрицы и праймера, в активном центре теломеразы [71]. Возможно, что способность этой структуры существовать в двух

конформациях – псевдоузла и шпильки – важна для функционирования теломеразы [83].

В отличие от псевдоузла, структура *транс*-активирующего домена TERC изучена менее подробно. Первичные структуры этого домена из разных организмов характеризуются высоким уровнем гомологии [7, 9, 87]. *Транс*-активирующий домен представляет собой длинную шпильку из нескольких очень стабильных спиралей, разделенных асимметричными петлями и одонуклеотидными выпетливаниями. Этот домен необходим для правильного формирования псевдоузла, добавления нуклеотидов и процессивности теломеразы при добавлении повторов [88–90]. Наиболее хорошо изучена спираль P6.1 *транс*-активирующего домена TERC человека. Этот элемент крайне важен для работы фермента [90–93]. Роль P6.1 у позвоночных понятна не до конца, но известно, что правильная структура этой спирали необходима для сборки теломеразы, а специфичные последовательности в петлях играют важную роль в катализе [93]. Считается, что в результате взаимодействия петли P6.1 с матричным участком формируется третичная структура TERC, чем и объясняется роль этих элементов в активности и процессивности теломеразы [94].

На самом 3'-конце TERC позвоночных находится домен H/ACA, который встречается в малых ядрышковых РНК (мякРНК, small nucleolar RNA) и в малых РНК, специфичных для телец Кахала (мккаРНК, small Cajal body specific RNA). H/ACA-домен представляет собой одноцепочечный участок, содержащий H-бокс (ANANNA, где N – любой нуклеотид), следующую за ним шпильку, в которой находится САВ-бокс, и одноцепочечный 3'-конец, содержащий АСА-бокс [94, 95]. H/ACA-домен необходим для стабильности теломеразной РНК *in vivo* [96]. Внутри этого домена находится САВ-бокс, служащий сигналом локализации в тельцах Кахала. САВ-бокс не участвует в 3'-концевом процессинге теломеразной РНК [97].

В последнее время стали появляться данные о том, что первые 17 нуклеотидов TERC человека очень важны для активности теломеразы, отсутствие этого участка или мутации в нем существенно снижают активность фермента. Показано, что рибоолигонуклеотид с такой последовательностью образует G-квадруплекс. Можно предположить, что структура этого элемента должна влиять на структуру спирали P1 и позиционирование матричного участка теломеразной РНК [98–100].

Структура теломеразной обратной транскриптазы
Каталитическая субъединица теломеразы, TERC, намного более консервативна, чем TERT. Она имеет много мотивов, общих с другими обратными транскриптазами. В структуре всех известных TERC можно вы-

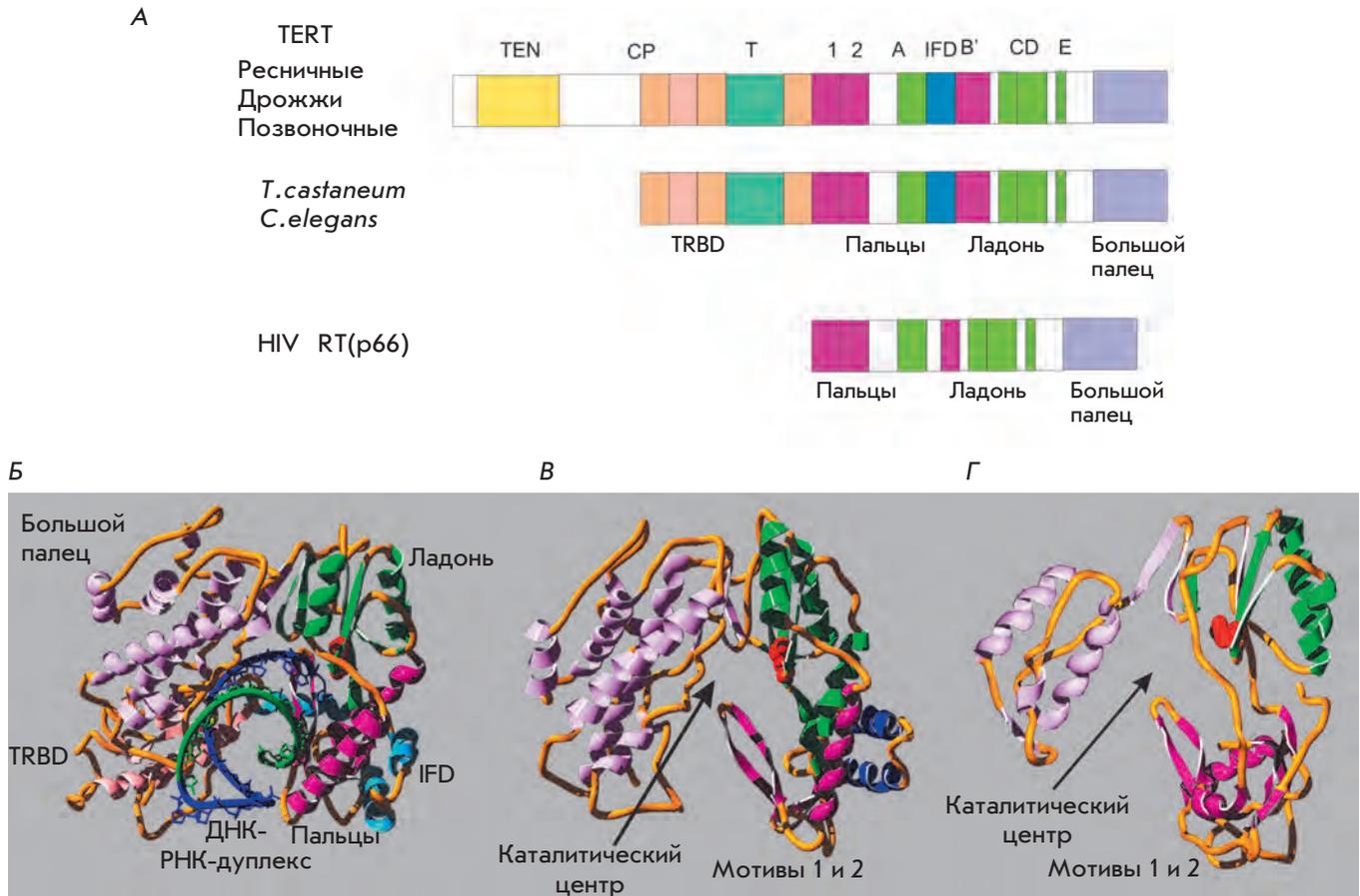


Рис. 3. Структура теломеразной обратной транскриптазы. **А** – Схематическое изображение доменной организации TERT разных организмов и обратной транскриптазы HIV. Гомологичные домены выделены цветом. **Б** – Пространственная структура комплекса TERT *T. castaneum* и РНК-ДНК-дуплекса. Рисунок получен с использованием PDB-файла 3KY. **В** – Пространственная структура TERT *T. castaneum*. Рисунок получен с использованием PDB-файла 3DU5. **Г** – Пространственная структура HIV RT. Рисунок получен с использованием PDB-файла 1N6Q. Красным выделены остатки Asn каталитических центров ферментов.

делить три домена: РНК-связывающий (этот домен, названный TRBD, подразделяют на RID1 и RID2), обратнотранскриптазный и малоконсервативный С-концевой [57, 95, 101]. Некоторые TERT содержат дополнительный N-концевой домен TEN, который вовлечен в связывание праймера, а также способствует процессивному добавлению теломерных повторов [57, 102]. Первичная структура обратнотранскриптазного домена сходна со структурами других полимераз и содержит семь консервативных мотивов (1, 2, А, В, С, D и Е). Предполагается, что TERT произошла от ретротранспозонов [103]. Наибольшее сходство TERT имеет с интронсодержащими, так называемыми Ренелоре-подобными элементами.

Недавно были получены структуры высокого разрешения доменов TEN и TRBD TERT простейшего *Tetrahymena thermophila* [102, 103] и полноразмерной TERT *Tribolium castaneum* [104], открывающие

новые особенности структуры и функций теломеразы. Как следует из анализа структуры TERT *T. castaneum*, между TERT и другими полимеразми, включая субъединицу р66 обратной транскриптазы HIV, существует высокая структурная гомология [105]. Пространственное расположение основных доменов, а также ключевых аминокислотных остатков в них остается постоянным и соответствует структуре «правой руки», впервые описанной для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*. В таких структурах принято выделять так называемые субдомены «ладонь», «пальцы» и «большой палец» [106]. Обнаружено, что петля, отвечающая за связывание и позиционирование матрицы и нуклеотида, расположена между β-листами мотивов 1 и 2 и направлена в сторону активного центра [107, 108]. В то же время в структуре TERT и других полимераз (рис. 3) существуют и различия. Например,

TERT содержит дополнительный домен, который называется IFD (insertion in fingers domain). Этот домен находится вне центрального кольца между «пальцами» и «ладонью». Из структуры TERT *T. castaneum* видно, что три полностью консервативных домена образуют кольцеобразную структуру. Консервативный обратнотранскриптазный домен формирует «пальцы» и «ладонь», как и другие полимеразы, и занимает одну сторону кольца, а С-домен образует «большой палец» и находится в непосредственной близости от N-концевого РНК-связывающего домена, замыкая кольцо. Внутренний диаметр этой структуры равен 26 Å, а ее глубина составляет 21 Å, что примерно соответствует размерам А-спирали, состоящей из 8 п.н. Именно такую структуру имеет ДНК-РНК-дуплекс, находящийся в активном сайте полимеразы [109]. Поверхность отверстия представляет собой спиральную структуру из положительно заряженных аминокислотных остатков. Такая структура позволяет белку образовать плотный контакт с РНК-ДНК-гетеродуплексом [110]. Спираль 10 и 19 взаимодействуют с большой и малой бороздкой ДНК-РНК-дуплекса, находящегося в активном центре [111–115]. Нуклеотидсвязывающий участок располагается на границе «пальцев» и «ладони», что подтверждает высокое сходство с другими полимеразы. Определены несколько консервативных аминокислотных остатков, формирующих нуклеотидсвязывающий карман [115]. В активный центр фермента входят несколько неизменяемых остатков аспарагиновой кислоты и остаток лизина, который активирует уходящую пирофосфатную группу.

TRBD-домен TERT из *T. thermophila* и *T. castaneum*, как следует из анализа его структуры, обогащен спиральными структурами и разделен на две части. Эти два структурных элемента соединяются при помощи СР- и Т-мотивов. СР-мотив содержит положительно заряженный карман, а Т-мотив представляет собой узкую гидрофобную щель, которая содержит положительно заряженные остатки вблизи СР-мотива. Вместе они формируют протяженную борозду на поверхности TRBD, с которой и связывается TER [100, 103, 116–119]. Т-мотив содержит β-шпильку, вытянутую в направлении С-концевого домена, который образует «большой палец», и соединяет его с пальцами обратнотранскриптазного домена. Такое расположение TRBD-домена позволяет остаткам, находящимся на внутренней стороне кольца, располагаться непосредственно вблизи от активного центра. Кроме того, расщелина между TRBD и обратнотранскриптазными доменами дает возможность TER попадать в активный центр. Можно предположить, что теломеразная РНК проходит через эту щель и таким образом приносит матрицу в активный центр фермента [120].

БИОГЕНЕЗ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Как уже отмечалось, теломераза состоит из двух основных компонентов, но синтез, процессинг каждого из них, а также формирование активного фермента требуют участия большого числа дополнительных факторов. Регуляция экспрессии TERT на стадии транскрипции подробно рассмотрена в обзоре Скворцова и соавт. [121]. В результате альтернативного сплайсинга первичного транскрипта гена *hTERT* образуются 13 разных вариантов мРНК [122–125]. Наиболее распространены и хорошо изучены два из них, так называемые α- и β-формы. При образовании α-формы из шестого экзона удаляются 36 нуклеотидов, что приводит к изменению последовательности обратнотранскриптазного мотива А. Открытая рамка считывания при этом не нарушается [126, 127]. Делеция 182 нуклеотидов из экзона 7 и 8 и вставка из 38 нуклеотидов вызывают преждевременную остановку трансляции, что приводит к образованию β-формы *hTERT*, в которой нет трех важных обратнотранскриптазных мотивов [128, 129]. Сплайсинг может проходить в разных сайтах независимо друг от друга, поэтому в клетках часто сосуществуют разные формы мРНК *hTERT*. Комбинация разных форм мРНК, а также их количество зависят от типа клеток. Так один из вариантов мРНК (α-/β+-форма) выполняет регуляторные функции, действуя как доминантно-негативный ингибитор теломеразы и в нормальных, и в опухолевых клетках.

До сих пор не понятно, влияет ли соотношение полноразмерной мРНК *hTERT* и ее сплайсированных форм на активность теломеразы. В одних работах показано, что общий уровень экспрессии *hTERT* соответствует уровню теломеразной активности [126–129], тогда как в других не выявлено закономерностей в изменении теломеразной активности при изменении содержания какой-либо формы мРНК *hTERT* [130]. Предполагается, что регуляторные функции, выполняемые продуктами альтернативного сплайсинга *hTERT*, зависят от типа клеток. В ходе развития плода человека изменяется набор транскриптов *hTERT*. На ранних стадиях все ткани содержат полноразмерную мРНК *hTERT* и активную теломеразу, а в дальнейшем набор форм мРНК меняется в зависимости от типа ткани [131]. Можно предположить, что изменение экспрессии TERT необходимо для дифференцировки клеток в процессе развития организма.

Важную роль в регуляции работы теломеразы играет обратимое фосфорилирование TERT [132]. Известны многочисленные киназы и фосфатазы, которые влияют на фосфорилирование остатков серина, треонина и тирозина, меняя таким образом структуру, локализацию и активность ферментов. В первич-

ной структуре hTERT обнаружены неспецифические участки фосфорилирования, однако только несколько из них действительно подвергаются модификации и их фосфорилирование влияет на активность теломеразы.

Теломеразная РНК относится к классу некодирующих РНК, т.е. она не служит матрицей для синтеза белка. Как уже было сказано, теломеразная РНК содержит структурные элементы, характерные и для малых ядрышковых РНК, и для РНК, специфичных для телец Кахаля. У человека все Н/АСА-РНК кодируются интронами, они синтезируются в виде пре-мРНК, а затем процессируются с образованием зрелых РНК, лишенных кеп-структуры на 5'-конце [133]. В отличие от них, TERC человека транскрибируется РНК-полимеразой II со своего собственного промотора. В результате процессинга первичного транскрипта образуется зрелая форма из 451 нуклеотида, содержащая триметилгуаниновый кеп на 5'-конце. Частично процессинг теломеразной РНК изучен в клетках дрожжей. Известно, что в клетках *Schizosaccharomyces pombe* 3'-концевой процессинг TERC осуществляется сплайсосоной. Для образования активной теломеразной РНК необходима только первая стадия сплайсинга, которая приводит к высвобождению 5'-концевого экзона [134]. Если произойдет лигирование экзонов, то образуется продукт, который подвергается быстрой деградации. Совершенно непонятно, каким образом сплайсинг останавливается на промежуточной стадии.

Триметилирование 5'-концевого гуанина TERC в клетках дрожжей осуществляется метилтрансферазой Tgs1. Предполагается, что и у позвоночных этот фермент (hTgs1p) участвует в гиперметилировании 5'-кепа TERC в тельцах Кахаля, в которых он и содержится [135].

Изучение процессинга теломеразной РНК человека затрудняется ее низким содержанием в клетках. Теломеразная РНК человека экспрессируется и подвергается процессингу в клетках дрожжей [136]. При экспрессии в клетках дрожжей образуются как полиаденилированные, так и неполиаденилированные, процессированные и непроцессированные формы hTERT. Процессинг hTERT в этой системе осуществляют дрожжевые белки Cbf5p (гомолог дискерина), Nhp2p и Nor10p, которые участвуют в процессинге малых ядрышковых РНК, содержащих Н/АСА-домен [137–139]. Н/АСА-белки связываются с Н/АСА-доменом теломеразной РНК, который определяет 3'-границу зрелой hTERT. Предполагается, что в ходе процессинга hTERT ее 3'-конец отщепляется экзонуклеазами, а связавшиеся Н/АСА-белки определяют границу зрелой формы hTERT [136]. Предложена также гипотеза об активации нуклеаз

в результате связывания Н/АСА-белков с теломеразной РНК [140].

В 2011 году установили, что в состав теломеразного комплекса входит белок DDX36, или RHAU, известный как РНК-хеликаза. Он участвует также в деградации мРНК, содержащих AU-богатые элементы, и является резолвазой как ДНК, так и РНК G-квадруплексов [141–145]. Оказалось, что этот белок взаимодействует с 5'-концевым участком hTERT, который образует G-квадруплекс, и стабилизирует hTERT. Это происходит до триметилирования 5'-концевого гуанозина теломеразной РНК и, по-видимому, необходимо для защиты hTERT от деградации. После кепирования hTERT формирование G-квадруплекса становится невозможным, и RHAU перестает связываться с hTERT [146]. Кроме того, RHAU стимулирует образование спирали P1, и за счет этого достигается правильное позиционирование матричного участка hTERT [147].

В состав теломеразного комплекса входят дополнительные белки, которые участвуют в процессах биогенеза фермента [148]. Теломеразный комплекс всегда содержит РНК-связывающий белок дискерин, который узнает Н/АСА-мотив как в теломеразной, так и в других некодирующих РНК (малых ядрышковых и ассоциированных с тельцами Кахаля) [149, 150]. Считается, что дискерин принимает участие в биогенезе теломеразного РНП (рибонуклеопротеида) и поддерживает стабильность теломеразной РНК [151, 152]. В состав теломеразного комплекса могут входить дискеринсвязывающие белки NOP10, NHP2 и GAR1 [153, 154]. ДНК-хеликазы понтин и рептин, обладающие АТФ-азной активностью, взаимодействуют с hTERT, hTERT и дискерином [155]. Содержание комплекса hTERT с этими белками максимально в S-фазе клеточного цикла. Именно в этот момент происходит удлинение теломера у дрожжей [156], а в клетках человека теломераза ассоциирована с теломерами [157, 158]. Можно предположить, что понтин и рептин влияют на регуляцию содержания hTERT на разных стадиях клеточного цикла или на сборку активной теломеразы в S-фазе. Дискерин постоянно связан с hTERT, а понтин и рептин взаимодействуют с hTERT. В S-фазе понтин и рептин взаимодействуют с дискерином, участвуя в образовании теломеразного РНП *de novo*.

Выявлению еще одного белка, участвующего в сборке и влияющего на активность теломеразы, посвящена одна из последних работ [159]. Оказалось, что этим белком является АТФ-аза NVL2. При помощи двухгибридной системы показано, что hTERT взаимодействует с белком NVL2. Ген NVL кодирует две изоформы АТФ-азы NVL – NVL1 и NVL2, ко-

торые относятся к AAA (ATPase associated with a variety of cellular activities) семейству АТФ-аз [160, 161]. hTERT взаимодействует с обеими изоформами, но комплекс с NVL2 оказался более прочным. В клетках hTERT колокализована с NVL2, который содержит два АТФ-азных домена. Мутация Lys311 в первом домене нарушает связывание этого белка с hTERT, а нокдаун NVL2 снижает активность теломеразы в клетках [159].

В состав теломеразного холофермента входит белок WDR79/TCAB1 (telomerase Cajal body protein 1) [58]. Тельца Кахаля обогащены этим белком, ассоциированным с TERT, TER и дискерином. При этом TCAB1 не взаимодействует с факторами сборки теломеразы NAF1, понтином и рептином. Предполагается, что на первом этапе созревания теломеразы NAF1 понтин и рептин способствуют сборке минимально активного фермента, состоящего из TERT, TERC и дискерина. После этого TCAB1 взаимодействует с активной теломеразой и определяет ее локализацию в тельцах Кахаля, способствуя связыванию с теломерами.

Данные об архитектуре теломеразного холофермента весьма противоречивы. Так показано, что теломераза обладает каталитической активностью только в виде димера, однако утверждается также, что в физиологических условиях димеризация не обязательна [162–164]. При помощи метода иммунопреципитации изучен состав белков, которые выделяются вместе с теломеразой [165]. Оказалось, что теломераза образует несколько комплексов, отличающихся по набору входящих в них белков. Предполагается, что состав теломеразного комплекса изменяется в процессе созревания. На первом этапе H/ACA-белки связываются с 3'-концевой шпилькой hTER, после чего второй комплекс H/ACA-белков с белком GAR1 взаимодействуют со стеблем шпильки CR4/CR5. На второй стадии GAR1 вытесняется белком TCAB1 из теломеразного РНП и связывается с hTERT. При этом в комплексе TERT и TCAB1 представлены в субстехиометрическом соотношении. Это может свидетельствовать о существовании как одного комплекса, содержащего сразу оба компонента, так и двух разных комплексов, каждый из которых содержит один из компонентов. Предполагается, что в клетках оба комплекса присутствуют одновременно, но при этом между ними происходит постоянный обмен компонентами.

Взаимодействие теломеразы с другими белками (La, Staufen, L22, гЯРНП C1/C2, TERP1, p23 и Hsp90) необходимо для формирования правильной структуры и ее стабилизации [132, 166, 167]. Однако влияют ли эти белки на теломеразную активность, неизвестно.

УДЛИНЕНИЕ ТЕЛОМЕР

Основная активность теломеразы обеспечивает РНК-зависимое удлинение теломер [168]. Каталитический цикл теломеразы состоит из нескольких последовательных стадий. После связывания субстрата происходит добавление одного теломерного повтора. Образовавшийся продукт может диссоциировать из активного центра фермента, а может транслоцироваться с дальнейшим удлинением. Способность теломеразы перемещать синтезируемую ДНК в начало матрицы позволяет описывать ее работу двумя типами процессивности. Добавление нуклеотида – процессивность типа I – присуща всем полимеразам, тогда как добавление повтора – процессивность типа II – уникальна для теломеразы и определяет способность фермента копировать матричный участок РНК много раз, удлиняя при этом одну молекулу субстрата [169, 170].

Связывание праймера на первой стадии реакционного цикла теломеразы обусловлено его комплементарным взаимодействием с матричным участком TER. При использовании праймеров с различной последовательностью эффективность образования комплекса с ферментом не коррелирует с длиной образуемого ДНК-РНК-дуплекса [171], так как теломераза связывается с субстратом при непосредственном участии не только матричного участка теломеразной РНК. Структурные элементы активного центра TERT контролируют эффективность формирования дуплекса, а также процесс транслокации новосинтезированного продукта в ходе процессивного синтеза теломерных повторов. Якорные участки в TERT и TER также принимают участие в первичном связывании праймера.

На второй стадии реакционного цикла теломеразы нуклеотиды присоединяются к праймеру [168, 172].

Основная особенность теломеразы – способность к процессивному добавлению повторов [170]. Механизм транслокации теломеразы после синтеза повтора остается неизвестным, не ясно также, нужна ли процессивность фермента этого типа для эффективного удлинения теломер или нет. Недавно обнаружили, что критически короткие теломеры удлинняются процессивно [173]. В ходе работы теломеразы образуется набор продуктов, отличающихся друг от друга числом теломерных повторов. После добавления одного теломерного повтора реакция останавливается или замедляется, т.е. транслокация и отжиг матрицы являются скоростными лимитирующими стадиями. Показано, что белки POT1 и TRP1 эффективно стимулируют процессивность теломеразы [174]. Предполагается, что процессивность теломеразы регулируется комплексом POT1–TRP1. Когда этот комплекс связан с 3'-концом праймера, теломеразная актив-

ность ингибируется, если же он связан с 5'-концом, то теломераза работает процессивно.

Известно, что теломераза активна не во всех клетках, тем не менее, теломеразная РНК представлена во всех клетках, а обратная транскриптаза – в большинстве клеток. Локализация компонентов теломеразы не всегда совпадает с местом ее «работы». Теломеразную РНК часто обнаруживают в цитоплазме, а обратную транскриптазу в митохондриях и других органеллах. Эти данные позволили предположить, что теломераза может не только поддерживать длину теломер, но и выполнять дополнительные функции в клетке.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ФУНКЦИИ КОМПОНЕНТОВ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Первые данные об альтернативных функциях теломеразы появились уже на ранних этапах изучения этого фермента. При изучении активности, субстратной специфичности и других свойств теломеразы были обнаружены продукты других ферментативных активностей. Оказалось, что теломераза способна катализировать и другие реакции (рис. 4).

Нуклеазная активность теломеразы

Изучение каталитической активности и субстратной специфичности теломеразы из *Thermus thermophila* показало, что длина получаемого продукта зависит от степени комплементарности праймера и матричного участка теломеразной РНК [175]. Если 3'-конец праймера некомплементарен матричному участку, то происходит разрыв на границе спаренной и неспаренной областей субстрата. Кроме того, разрыв возможен и в полностью комплементарном праймере. Место и вероятность разрыва в этом случае будут зависеть от длины и места предпочтительного отжига праймера на матричном участке. Таким образом, теломераза *Th. thermophila* обладает нуклеазной активностью. Позже обнаружили, что теломеразы дрожжей и человека также обладают такой активностью [176–181]. Детальное изучение механизма эндонуклеазной активности показало, что субстрат может расщепляться и в случае его полной комплементарности матрице с целью более предпочтительного позиционирования в каталитическом центре теломеразы. Эндонуклеазная активность теломеразы не является сиквенс-специфичной. Праймеры, имеющие в предпочтительных местах разрезания негидролизующие межнуклеотидные связи, подвергаются расщеплению в других местах [179, 182].

Трансферазная активность

Теломераза дрожжей и человека может обладать и трансферазной активностью. В присутствии ионов

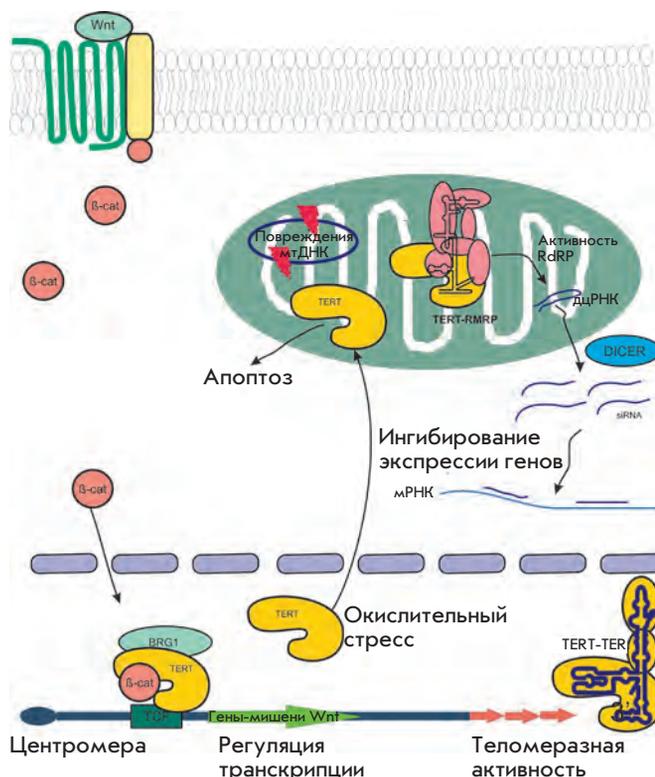


Рис. 4. Теломераза – фермент с множеством функций. Схематическое изображение механизмов функционирования теломеразы в клетке.

Mn^{2+} теломераза способна присоединять нуклеотиды независимо от матрицы. При этом предпочтение отдается GT-богатым на 5'-конце теломероподобным праймерам. Не известно, бывают ли ситуации *in vivo*, когда внутриклеточная концентрация Mn^{2+} достигает таких значений, при которых трансферазная активность выявлена *in vitro*. Тем не менее предполагается, что какие-то небольшие молекулы могут стимулировать эту способность теломеразы [183, 184].

Теломераза и митохондрии

На ранних этапах изучения теломеразы обнаружили, что hTERT экспрессируется и в клетках, в которых не выявляется теломеразная активность [185, 186]. Недавно показали, что белок hTERT присутствует в каждой соматической клетке, преимущественно в S-фазе [187], причем не только в ядре, но и в цитоплазме, и в митохондриях [188–194]. В иммортализованных фибробластах человека при обработке H_2O_2 и в условиях окислительного стресса hTERT экспортируется из ядра и перемещается в митохондрии [194]. Известно, что фибробласты эмбрионов мыши стареют быстрее, если их культивировать при повышенном содержании кислорода [195]. Недостаток

кислорода, как показано в сходных опытах на клетках человека, приводит к увеличению продолжительности жизни [196, 197]. Окислительный стресс может активировать опухолевые белки-супрессоры p53 и Rb [198, 199]. Существует несколько причин, приводящих к старению клеток при окислительном стрессе. Во-первых, повреждения ДНК, которые возникают при окислительном стрессе и индуцируют активность регуляторов клеточного цикла p21 и p16, способствующих старению клеток и задержке клеточного цикла [200, 201]. В результате снижения пролиферации теломеры становятся критически короткими, а клетки находятся в состоянии кризиса. На этой стадии клетки либо гибнут, либо в них активируется теломераза и они становятся бессмертными. Во-вторых, окислительный стресс может приводить к повреждению теломер. ДНК, входящая в состав теломер, обогащена остатками гуанина, чувствительными к окислению. Окисление этих остатков приводит к тому, что теломеры становятся более чувствительными к повреждению, а степень их укорачивания возрастает [202, 203]. Показано, что обработка клеток MitoQ-антиоксидантом, специфичным для митохондрий, снижает уровень повреждения теломер и увеличивает продолжительность жизни фибробластов, подвергнутых окислительному стрессу [204]. В-третьих, преждевременное старение, вызванное окислительным стрессом, может быть следствием прямой инактивации теломеразной активности.

Недавно предсказали, что на N-конце TERT находится сигнал локализации в митохондриях (MTS – mitochondria transport signal), состоящий из 20 аминокислотных остатков [205]. MTS высококонсервативен в TERT высших эукариот, таких, как растения, рыбы и млекопитающие, но этой сигнальной последовательности нет у дрожжей и ресничных [192]. Если MTS добавить к зеленому флуоресцентному белку (GFP), то можно наблюдать появление флуоресценции в митохондриях. А синтезированный *in vitro* белок A, содержащий на N-конце MTS из hTERT, поступает в очищенные митохондрии за счет мембранного потенциала [205]. Локализация hTERT в митохондриях установлена разными методами, в том числе при помощи иммуноблоттинга и коиммунопреципитации [191, 192, 194, 206–208]. Экстракты митохондрий из различных клеток человека обладают теломеразной активностью. hTERT находится в матриксе митохондрий и соосаждается вместе с белками TOM20, TOM40 и TIM23 [191]. Показано также, что hTERT выделяется вместе с мтДНК-связывающим белком TFAM, с HSP60 и TIM23, но не с TOM20 [205]. Повышение содержания hTERT в митохондриях, подвергнутых окислительному стрессу, приводит к стабилизации мтДНК и стимулирует функцио-

нирование митохондрий. При этом снижается образование активных форм кислорода и повышается мембранный потенциал митохондрий [194]. hTERT взаимодействует с участками мтДНК, кодирующими субъединицы 1 и 2 NADH-убихинооксидоредуктазы (ND1 и ND2). В клетках сердца, но не печени мышей, экспрессирующих hTERT, наблюдаются изменения в дыхательной цепи [191]. Тем не менее позднее обнаружили, что hTERT неспецифически взаимодействует с мтДНК [205]. С помощью метода иммунопреципитации хроматина, модифицированного для митохондрий, показано, что обратная транскриптаза теломеразы взаимодействует как с участками, кодирующими ND1, ND2, так и 12S и 16S рРНК, ND4 и ND5, COXI и COXIII, тРНК и субъединицы 6 и 8 АТФ-синтазы [205]. Известно, что повышенная экспрессия hTERT в фибробластах человека не предотвращает их индуцированное стрессом старение, но защищает от апоптоза и некроза [209]. Продемонстрирован и противоположный эффект повышенной экспрессии hTERT в условиях окислительного стресса, т.е. увеличение степени повреждения ДНК [192, 206]. В таких клетках возрастает содержание биодоступного железа, которое может стимулировать образование гидроксил-радикалов, повреждающих ДНК [192].

Факторы, отвечающие за внутриклеточную локализацию hTERT, до сих пор не известны. hTERT содержит сигнал локализации в митохондриях и сигнал экспорта из ядра (NES). Предсказано, что hTERT содержит несколько сигналов ядерной локализации (NLS) [210, 211]. Однако остается непонятным, как регулируется локализация этого белка внутри клетки. Известно, что при окислительном стрессе внутриклеточное распределение hTERT изменяется в результате посттрансляционных модификаций [189, 194, 208, 210, 212–216]. Показано, что Src-киназа контролирует экспорт hTERT из ядра в цитоплазму при окислительном стрессе [189, 194], а дефосфорилирование hTERT фосфатазой Shp-2 приводит к импорту hTERT из цитоплазмы в ядро [212]. Во время окислительного стресса киназа Src фосфорилирует Tyr707 TERT. Модифицированная hTERT взаимодействует с белком Ran, компонентом ядерной поры, после чего экспортируется из ядра при участии кариеферина CRM1. При обработке клеток перекисью водорода уровень hTERT дикого типа в митохондриях снижается, а уровень hTERT, в которой Tyr707 заменен на Phe и не может быть фосфорилирован Src-киназой, не изменяется. Экспрессируемая в клетках мутантная hTERTY707P накапливается в ядре во время окислительного стресса, а уровень апоптоза этих клеток ниже, чем клеток, содержащих hTERT дикого типа [189]. Показано также, что при обработ-

ке клеток H_2O_2 уровень hTERT дикого типа в митохондриях увеличивается за несколько часов, тогда как в условиях гипероксии для развития подобного эффекта требуется несколько дней. В клетках, которые вернули «к нормальной жизни» после культивирования в условиях гипероксии, hTERT возвращается в ядро [194].

Несколько лет назад обнаружили, что hTERT может образовывать комплекс не только с hTER, но и с РНК-компонентом эндорибонуклеазы, участвующей в процессинге митохондриальной РНК (mitochondrial RNA processing endoribonuclease) RMRP. Оказалось, что комплекс hTERT с RMRP обладает активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы и синтезирует двухцепочечные РНК, используя в качестве матрицы РНК-компонент RMRP. Эти РНК процессируются ферментативным комплексом DICER с образованием малых интерферирующих РНК (siRNA), которые в дальнейшем снижают уровень RMRP в клетке, т.е. работа RMRP регулируется по принципу отрицательной обратной связи [217].

Достоверно установлено, что функционирование hTERT в митохондриях не зависит от hTER, и hTER не импортируется в митохондрии [205]. Оказалось, что вместе с hTERT из митохондрий выделяются митохондриальные тРНК, которые служат праймерами в реакции обратной транскрипции, катализируемой hTERT. При этом добавление hTER и мутация в одном из обратнотранскриптазных доменов hTERT ингибируют эту реакцию. Отсутствие hTERT в митохондриях приводит к митохондриальной дисфункции. Предполагается, что hTERT может участвовать в репликации и репарации мтДНК [205].

Из всего сказанного следует, что данные о функциях hTERT и о компонентах, взаимодействующих с ней в митохондриях, весьма противоречивы. По-видимому, это можно объяснить ограниченным количеством фермента в клетке. Все работы, посвященные функциям теломеразы в митохондриях, выполнены в условиях сверхэкспрессии белка. Дополнительные домены, которые используют для выделения и детекции белка, могут быть причиной недостоверных результатов. Следует отметить, что к настоящему времени в научном сообществе не сформировано определенного мнения о функциях теломеразы в митохондриях.

Теломераза и повреждения ДНК

Известно, что нефункциональные теломеры взаимодействуют с набором белков, вовлеченных в ответ клеток на повреждения ДНК [218–220]. Эти белки участвуют в передаче сигнала в ответ на различные воздействия. ATR и ATM входят в семейство про-

теинкиназ, родственных фосфоинозитид-3-киназам (PIKK) [221]. ATM – основной белок, который активируется на двухцепочечных разрывах ДНК (DSB) [222], а ATR – при появлении одноцепочечных концов ДНК, возникающих при образовании аддуктов ДНК, во время процессинга DSB или при остановке репликативной вилки [223, 224]. Отсутствие ATM приводит к декепированию и укорочению теломер, кроме того, TRF2 связывается с ATM-киназой и ингибирует ее активацию [225]. В условиях повышенной экспрессии hTER наблюдается подавление активности ATR-киназы, а снижение количества теломеразной РНК в клетках, напротив, способствует повышению активности ATR. Эти процессы не зависят от уровня активности теломеразы и длины теломер. При снижении уровня экспрессии hTER в клетках увеличивается количество белка p53, супрессора опухолевого роста и основного игрока в пути передачи сигнала при онкогенных стрессах. При этом в клетках возрастает содержание белка CHK1 – регулятора клеточного цикла. p53 и CHK1 являются основными субстратами ATR-киназы. hTER ингибирует ATR-киназу *in vivo* и нарушает регуляцию прохождения контрольных точек при повреждении ДНК [226].

Мутации в матричном участке теломеразной РНК вызывают снижение уровня белка TRF2, что стимулирует вступление клеток в апоптоз. Этот эффект зависит от ATM. В результате активации ATM наблюдается фосфорилирование p53, который, в свою очередь, активирует транскрипцию гена *GADD45γ*, а повышение уровня *GADD45γ* приводит к вступлению клеток в апоптоз. Таким образом, мутации в матричном участке теломеразной РНК вызывают появление в ДНК повреждений, которые клеточные системы распознают как двухцепочечные разрывы [227].

В клетках эукариот в ответ на повреждения ДНК гистон H_2AX фосфорилируется ATM-киназой. Фосфорилированный γH_2AX связывается с ДНК в местах двухцепочечных разрывов. В клетках без hTERT, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения, система DDR не функционирует. Фибробласты, в которых экспрессия hTERT стабильно подавлена при помощи РНК-интерференции, количество ATM и γH_2AX снижено, тогда как длина теломер в них изменяется незначительно, но изменяются структура хроматина и посттрансляционные модификации гистонов [187]. Известно, что при сверхэкспрессии hTERT в фибробластах крайней плоти человека в 20 раз снижается частота спонтанных разрывов хромосом в фазе G1, а также повышается уровень АТР [228], возможно, вследствие защитного действия hTERT на митохондрии. АТР необходим для работы факторов ремоделирования хроматина [229] и акти-

вазии АТМ-киназы [230]. По-видимому, защищая митохондрии, hTERT опосредованно влияет на синтез АТФ в клетке и на все процессы, для которых необходим его гидролиз.

Теломераза и регуляция экспрессии генов

Развитие методов изучения функционирования клетки и экспрессии генов позволило исследовать, как активность одних генов влияет на экспрессию других. При помощи анализа на кДНК-микрочипах установлено, что в клетках надпочечников быка, сверхэкспрессирующих TERT, изменяется уровень экспрессии 284 генов [231].

В настоящий момент известно, что теломераза, регулируя экспрессию различных генов, может влиять на клеточный цикл. Повышение уровня TERT приводит к увеличению пролиферативного потенциала стромальных клеток костного мозга человека [232], гиперплазии и гипертрофии кардиомиоцитов мышцы [233]. Повышение уровня экспрессии *hTERT* в эпителиальных клетках молочной железы человека, в которых делегирован ген *p16*, придает им устойчивость к антипролиферативному действию трансформирующего фактора β (TGF- β) [234]. При этом не обнаружено зависимости между длиной теломер и чувствительностью клеток к TGF- β . Известно также, что активация теломеразы в клетках эпителия молочной железы человека стимулирует их переход к митозу [235].

Получены доказательства того, что теломераза влияет на сигнальный путь pRB/E2F. При стимуляции митоза циклины D образуют комплекс с CDK4 и CDK6 и фосфорилируют белок ретинобластомы pRB, при этом инактивируя его. В результате взаимодействие pRB с фактором транскрипции E2F нарушается. E2F при этом активируется, и начинают экспрессироваться гены, необходимые для перехода клетки из G1- в S-фазу. Сверхэкспрессия hTERT в клетках хрусталика глаза человека приводит к усилению их роста. При этом наблюдается гиперфосфорилирование pRB и ингибирование экспрессии p53, p21 и GCIР [236]. p21 и GCIР являются ингибиторами комплексов циклинов с циклин-зависимыми киназами [237, 238], а p53 активирует транскрипцию p21 [239]. Таким образом hTERT активирует pRB/E2F-зависимый путь прохождения по клеточному циклу. С другой стороны, укорачивая фазу G1 клеточного цикла, hTERT стимулирует пролиферацию эмбриональных стволовых клеток человека [240]. Этот процесс ассоциирован с повышением экспрессии циклина D1 и гиперфосфорилированием pRB. Можно предположить, что транскрипционная активность E2F возрастает, поскольку увеличен уровень одного из его активаторов – CDC6. Кроме того, pRB ги-

перфосфорилирован в hTERT-иммортиализованных фибробластах крайней плоти человека и в эпителиальных клетках аденоидов человека, которые преодолели кризис после сверхэкспрессии hTERT [241]. Интересно, что в этом случае экспрессия p21 и p53 не изменяется, а белок p16, который является ингибитором циклин-зависимой киназы CDK4/6 в комплексе с циклином D, в этих клетках отсутствует [242].

Таким образом, hTERT-зависимая стимуляция пролиферации клеток обусловлена ингибированием белка pRB и активацией фактора транскрипции E2F. В то же время, согласно [243, 244], этот же механизм обеспечивает индукцию апоптоза

Известно, что при сверхэкспрессии hTERT в клетках повышается содержание рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), трансмембранной рецепторной тирозинкиназы, которая принимает участие в процессах роста, выживания, пролиферации и дифференцировки клеток млекопитающих [235, 245]. После связывания лиганда EGFR приобретает способность активировать разные сигнальные пути. Два из них (Ras/Raf/MEK/ERK и PI3K/Akt-киназы) участвуют в развитии опухолей. Эти киназные каскады совместно стимулируют входление клеток в S-фазу клеточного цикла, влияя на экспрессию, стабильность и внутриклеточную локализацию циклинов D-типа [246–250]. Об этом свидетельствуют результаты опытов, в которых клетки, сверхэкспрессирующие ген *hTERT*, имеют такой же фенотип, как и клетки, в которых сверхэкспрессируется ген *EGFR* или активированы киназные каскады.

Показано, что сверхэкспрессия hTERT в эпителиальных клетках приводит к повышению количества фактора роста фибробластов (FGF), а также рецептора этого фактора (FGFR) [228, 235]. Кроме того, в hTERT-иммортиализованных фибробластах значительно повышено содержание эпирегулина, одного из лигандов рецептора фактора роста эпидермиса, который играет ключевую роль в поддержании статуса пролиферации этих клеток [251]. Известно, что в нормальных клетках человека эпирегулин репрессирован, но он активируется в опухолях с высоким пролиферативным потенциалом [252]. Возможно, что теломераза стимулирует его антиапоптотические, пропролиферативные и пронеопластические свойства.

Экспрессия двух изоформ фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) активирована в клетках рака молочной железы человека, а также в клетках HeLa и в нормальных клетках легкого эмбриона, трансфицированных hTERT [253]. Известно также, что VEGF стимулирует экспрессию hTERT и активирует теломеразу при помощи сигнальных каскадов Ras- и Akt-

киназ. Таким образом, hTERT и факторы роста взаимодействуют по механизму положительной обратной связи в процессах регуляции клеточного цикла, образования опухолей и ангиогенеза.

В 2003 году обнаружили, что активация теломеразы может приводить к эпигенетическому сайленсингу генов-супрессоров в раковых клетках [254]. При экспрессии hTERT в нормальных фибробластах человека активируется промотор гена ДНК-метилтрансферазы I (*DNMT1*). Механизм этого воздействия до сих пор не установлен, но можно предположить, что одним из основных участников активации транскрипции может быть фактор транскрипции STAT3. Известно, что именно этот белок индуцирует экспрессию *DNMT1* в злокачественных T-клеточных опухолях [255]. Передавать сигнал от hTERT к STAT3 в этом случае может уже упомянутый EGFR, который фосфорилирует и таким образом активирует STAT3 [256]. *DNMT1*, метилируя промоторные участки генов, участвует в регуляции их экспрессии.

Недавно было обнаружено, что теломераза взаимодействует и с сигнальным путем Wnt/APC/ β -катенин. Показано, что TERT взаимодействует с фактором BRG1, ремодулирующим хроматин. BRG1 является кофактором β -катенина в процессах регуляции транскрипции генов, относящихся к Wnt-сигнальному пути. Оказалось, что TERT может взаимодействовать непосредственно с промоторами, которые регулируются Wnt и β -катенином. Известно, что сигнальный путь Wnt играет важную роль в процессах дифференцировки и пролиферации клеток, а влиянием компонентов теломеразы на этот

регуляторный каскад, по-видимому, можно объяснить эффекты, наблюдаемые при экспрессии TERT в стволовых клетках [257].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последнее время появляются данные, указывающие на разнообразие функций, выполняемых основными компонентами теломеразы в клетках. Некоторые из них, такие, как нуклеазная и трансферазная активность, ассоциированы с основной ролью теломеразы и ее полимеразной активностью. Другие, например, регуляция экспрессии генов, защита от апоптоза и участие в ответе на повреждение ДНК, не связаны непосредственно с полимеразной активностью. Необходимо отметить, что клетки высших эукариот содержат очень мало теломеразы, поэтому практически все данные получены в условиях искусственной экспрессии ее компонентов. В таких условиях можно сделать выводы о наличии взаимодействий, которые на самом деле не существуют. Часто ученые из разных лабораторий получают противоречащие друг другу данные, которые сложно интерпретировать. Скорее всего, такие противоречия обусловлены использованием разных систем и моделей. Тем не менее все новые появляющиеся данные позволяют предполагать, что теломераза выполняет более разнообразные функции, и ее влияние на клетку не ограничивается регуляцией длины теломер. ●

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 02.740.11.0706, Программы развития МГУ ПНР 5.13 и при поддержке РФФИ (№ 11-04-01233-а и 11-04-12051-офи-м-2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morgan T.H. // *Science*. 1911. V. 34. P. 636–638.
- McClintock B. // *Mo. Agric. Exp. Res. Stn. Res. Bull.* 1931. V. 163. P. 4–30.
- Muller H.J. // *Collecting Net*. 1938. V. 8. P. 182–195.
- Blackburn E.H., Gall J.G. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 120. P. 33–53.
- Blackburn E.H., Budarf M.L., Challoner P.B., Cherry J.M., Howard E.A., Katzen A.L., Pan W.C., Ryan T. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1983. V. 47. Pt. 2. P. 1195–1207.
- De Lange T., Lundblad V., Blackburn E.H. *Telomeres*. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- Hsu T.C., Arrighi F.E., Saunders G.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1972. V. 69. P. 1464–1466.
- Olovnikov A.M. // *J. Theor. Biol.* 1973. V. 41. P. 181–190.
- Watson J. // *Nat. New Biol.* 1972. V. 239. P. 197–201.
- Greider C.W., Blackburn E.H. // *Cell*. 1987. V. 51. P. 887–898.
- Gallardo F., Laterreur N., Cusanelli E., Ouenzar F., Querido E., Wellinger R.J., Chartrand P. // *Mol. Cell*. 2011. V. 44. P. 819–827.
- de Lange T. // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 532–540.
- Chan S.R., Blackburn E.H. // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2004. V. 359. P. 109–121.
- Palm W., de Lange T. // *Annu. Rev. Genet.* 2008. V. 42. P. 301–334.
- Riethman H., Ambrosini A., Paul S. // *Chromosome Res.* 2005. V. 13. P. 505–515.
- Mattern K.A., Swiggers S.J., Nigg A.L., Lowenberg B., Houtsmuller A.B., Zijlmans J.M. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. P. 5587–5594.
- Oganesian L., Graham M.E., Robinson P.J., Bryan T.M. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 11279–11290.
- de Lange T. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 2100–2110.
- Palm W., de Lange T. // *Annu. Rev. Genet.* 2008. V. 42. P. 301–334.
- Broccoli D., Smogorzewska A., Chong L., de Lange T. // *Nat. Genet.* 1997. V. 17. P. 231–235.
- Court R., Chapman L., Fairall L., Rhodes D. // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. P. 39–45.
- Bianchi A., Stansel R.M., Fairall L., Griffith J.D., Rhodes D., de Lange T. // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 5735–5744.
- Lei M., Podell E.R., Cech T.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. V. 11. P. 1223–1229.
- Baumann P., Cech T.R. // *Science*. 2001. V. 11. P. 1171–1175.
- Loayza D., de Lange T. // *Nature*. 2003. V. 423. P. 1013–1018.

26. Kim S.H., Beausejour C., Davalos A.R., Kaminker P., Heo S.J., Campisi J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 15. P. 43799–43804.
27. Ye J.Z., Hockemeyer D., Krutchinsky A.N., Loayza D., Hooper S.M., Chait B.T., de Lange T. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1649–1654.
28. Ye J.Z., Donigian J.R., van Overbeek M., Loayza D., Luo Y., Krutchinsky A.N., Chait B.T., de Lange T. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 47264–47271.
29. Chen Y., Yang Y., van Overbeek M., Donigian J.R., Baciu P., de Lange T., Lei M. // *Science.* 2008. V. 319. P. 1092–1096.
30. Liu D., Safari A., O'Connor M.S., Chan D.W., Laegerle A., Qin J., Songyang Z. // *Nat. Cell Biol.* 2004. V. 6. P. 673–680.
31. Kibe T., Osawa G.A., Keegan C.E., de Lange T. // *Mol. Cell Biol.* 2010. V. 30. P. 1059–1066.
32. Chen L.Y., Liu D., Songyang Z. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 5898–5909.
33. Xin H., Liu D., Wan M., Safari A., Kim H., Sun W., O'Connor M.S., Songyang Z. // *Nature.* 2007. V. 445. P. 559–562.
34. Celli G.B., de Lange T. // *Nat. Cell Biol.* 2005. V. 7. P. 712–718.
35. Li B., de Lange T. // *Mol. Biol. Cell.* 2003. V. 12. P. 5060–5068.
36. Li B., Oestreich S., de Lange T. // *Cell.* 2000. V. 101. P. 471–483.
37. Oganessian L., Bryan T.M. // *BioEssays.* 2007. V. 29. P. 155–165.
38. Zahler A.M., Williamson J.R., Cech T.R., Prescott D.M. // *Nature.* 1991. V. 350. P. 718–720.
39. Wong H.M., Payet L., Huppert J.L. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2009. V. 11. P. 146–155.
40. Neidle S., Parkinson G.N. // *Biochimie.* 2008. V. 90. P. 1184–1196.
41. Oganessian L., Moon I.K., Bryan T.M. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 1148–1159.
42. Schaffitzel C., Berger I., Postberg J., Hanes J., Lipps H.J., Plückthun A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 8572–8577.
43. Paeschke K., Simonsson T., Postberg J., Rhodes D., Lipps H.J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. V. 10. P. 847–854.
44. Tang J., Kan Z.Y., Yao Y., Wang Q., Hao Y.H., Tan Z. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. 1200–1208.
45. Shinozuka K., Sekiguchi T., Ebara Y., Moriguchi T. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 2007. V. 51. P. 7–8.
46. Martínez P., Thanasoula M., Carlos A.R., Gómez-López G., Tejera A.M., Schoeftner S., Dominguez O., Pisano D.G., Tarsounas M., Blasco M.A. // *Nat. Cell Biol.* 2010. V. 12. P. 768–780.
47. Blasco M.A. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 299–309.
48. Sfeir A., Kabir S., van Overbeek M., Celli G.B., de Lange T. // *Science.* 2010. V. 327. P. 1657–1661.
49. Martínez P., Thanasoula M., Muñoz P., Liao C., Tejera A., McNeese C., Flores J.M., Fernández-Capetillo O., Tarsounas M., Blasco M.A. // *Genes Dev.* 2009. V. 23. P. 2060–2075.
50. Sfeir A., Kosiyatrakul S.T., Hockemeyer D., MacRae S.L., Karlseder J., Schildkraut C.L., de Lange T. // *Cell.* 2009. V. 138. P. 90–103.
51. Hsu T.C., Arrighi F.E., Saunders G.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. V. 69. P. 1464–1466.
52. Schoeftner S., Blasco M.A. // *EMBO J.* 2009. V. 28. P. 2323–2336.
53. Benetti R., Gonzalo S., Jaco I., Schotta G., Klatt P., Jenuwein T., Blasco M.A. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 178. P. 925–936.
54. García-Cao M., O'Sullivan R., Peters A.H., Jenuwein T., Blasco M.A. // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. P. 94–99.
55. Gonzalo S., Jaco I., Fraga M.F., Chen T., Li E., Esteller M., Blasco M.A. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 416–424.
56. Benetti R., Gonzalo S., Jaco I., Muñoz P., Gonzalez S., Schoeftner S., Murchison E., Andl T., Chen T., Klatt P., Li E., Serrano M., Millar S., Hannon G., Blasco M.A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. V. 15. P. 268–279.
57. Azzalin C.M., Reichenbach P., Khoraiuli L., Giulotto E., Lingner J. // *Science.* 2007. V. 318. P. 798–801.
58. Venteicher A.S., Abrew E.B., Meng Z., McCann K.E., Terns R.M., Veenstra T.D., Terns M.P., Artandi S.E. // *Science.* 2009. V. 323. P. 644–648.
59. Venteicher A.S., Meng Z., Mason P.J., Veenstra T.D., Artandi S.E. // *Cell.* 2008. V. 132. P. 945–952.
60. Fu D., Collins K. // *Mol. Cell.* 2007. V. 28. P. 773–785.
61. Cohen S.B., Graham M.E., Lovrecz G.O., Bache N., Robinson P.J., Reddel R.R. // *Science.* 2007. V. 315. P. 1850–1853.
62. Legassie J.D., Jarstfer M.B. // *Structure.* 2006. V. 14. P. 1603–1609.
63. Chen J.L., Greider C.W. // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 183–192.
64. Theimer C.A., Feigon J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006. V. 16. P. 307–318.
65. Sperger J.M., Cech T.R. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. P. 7005–7016.
66. Antal M., Boros E., Solymosy F., Kiss T. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 912–920.
67. Bhattacharyya A., Blackburn E.H. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 5721–5731.
68. Qiao F., Cech T.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. V. 15. P. 634–640.
69. Chen J.L., Greider C.W. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 2747–2752.
70. Box J.A., Bunch J.T., Zappulla D.C., Glynn E.F., Baumann P. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 24224–24233.
71. Tzfati Y., Fulton T.B., Roy J., Blackburn E.H. // *Science.* 2000. V. 288. P. 863–867.
72. Lai C.K., Miller M.C., Collins K. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. P. 415–420.
73. O'Connor C.M., Lai C.K., Collins K. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 17533–17539.
74. Miller M.C., Collins K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 6585–6590.
75. Greider C.W., Blackburn E.H. // *Cell.* 1985. V. 43. P. 405–413.
76. Blasco M.A. // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. P. 611–622.
77. Miller M.C., Collins K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 6585–6590.
78. Ulyanov N.B., Shefer K., James T.L., Tzfati Y. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 6150–6160.
79. Shefer K., Brown Y., Gorkovoi V., Nussbaum T., Ulyanov N.B., Tzfati Y. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 2130–2143.
80. Cao S., Chen S.J. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 367. P. 909–924.
81. Theimer C.A., Blois C.A., Feigon J. // *Mol. Cell.* 2005. V. 17. P. 671–682.
82. Kim N.K., Zhang Q., Zhou J., Theimer C.A., Peterson R.D., Feigon J. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 384. P. 1249–1261.
83. Theimer C.A., Finger L.D., Trantirek L., Feigon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 449–454.
84. Ly H., Blackburn E.H., Parslow T.G. // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. P. 6849–6856.
85. Chen J.L., Greider C.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 8080–8085.
86. Kim N.W., Piatyzek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. // *Science.* 1994. V. 266. P. 2011–2015.
87. Chen Y., Fender J., Legassie J.D., Jarstfer M.B., Bryan T.M., Varani G. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 3156–3166.
88. Richards R.J., Wu H., Trantirek L., O'Connor C.M., Collins K., Feigon J. // *RNA.* 2006. V. 12. P. 1475–1485.
89. Leeper T.C., Varani G. // *RNA.* 2005. V. 11. P. 394–405.
90. Chen J.L., Opperman K.K., Greider C.W. // *Nucl. Acids Res.*

2002. V. 10. P. 139–147.
91. Ueda C.T., Roberts R.W. // *RNA*. 2004. V. 10. P. 139–147.
92. Meier B., Clejan I., Liu Y., Lowden M., Gartner A., Hodgkin J., Ahmed S. // *PloS Genet*. 2006. V. 2. e. 18.
93. Gillis A.J., Schuller A.P., Skordalakes E. // *Nature*. 2008. V. 455. P. 633–636.
94. Balakin A.G., Smith L., Fournier M.J. // *Cell*. 1996. V. 86. P. 823–834.
95. Ganot P., Caizergues-Ferrer M., Kiss T. // *Genes Dev*. 1997. V. 11. P. 941–956.
96. Fu D., Collins K. // *Genes Dev*. 2006. V. 20. P. 531–536.
97. Theimer C.A., Jády B.E., Chim N., Richard P., Breece K.E., Kiss T., Feigon J. // *Mol. Cell*. 2007. V. 27. P. 869–881.
98. Gros J., Guédin A., Mergny J.L., Lacroix L. // *Chembiochem*. 2008. V. 9. P. 2075–2079.
99. Li X., Nishizuka H., Tsutsumi K., Imai Y., Kurihara Y., Uesugi S. // *J. Biochem*. 2007. V. 141. P. 755–765.
100. Xu Y., Ishizuka T., Kimura T., Komiyama M. // *J. Am. Chem. Soc*. 2010. V. 132. P. 7231–7233.
101. Jacobs S.A., Podell E.R., Cech T.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2006. V. 13. P. 218–225.
102. Arkhipova I.R., Pyatkov K.I., Meselson M., Evgen'ev M.B. // *Nat. Genet*. 2003. V. 33. P. 123–124.
103. Rouda S., Skordalakes E. // *Structure*. 2007. V. 15. P. 1403–1412.
104. Mitchell M., Gillis A., Futahashi M., Fujiwara H., Skordalakes E. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2010. V. 17. P. 513–518.
105. Sarafianos S.G., Clark Jr. A.D., Das K., Tuske S., Birktoft J.J., Ilankumaran P., Ramesha A.R., Sayer J.M., Jerina D.M., Boyer P.L., et al. // *EMBO J*. 2002. V. 21. P. 6614–6624.
106. Ollis D.L., Brick P., Hamlin R., Xuong N.G., Steitz T.A. // *Nature*. 1985. V. 313. P. 762–766.
107. Miller M.C., Liu J.K., Collins K. // *EMBO J*. 2000. V. 19. P. 4412–4422.
108. Harris D., Kaushik N., Pandey P.K., Yadav P.N., Pandey V.N. // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. P. 33624–33634.
109. Legassie J.D., Jarster M.B. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 14191–14201.
110. Bosoy D., Lue N.F. // *Nucl. Acids Res*. 2004. V. 32. P. 93–101.
111. Lue N.F., Lin Y.C., Mian I.S. // *Mol. Cell. Biol*. 2003. V. 23. P. 8440–8449.
112. Hossain S., Singh S., Lue N.F. // *J. Biol. Chem*. 2002. V. 277. P. 36174–36180.
113. Huard S., Moriarty T.J., Autexier C. // *Nucl. Acids Res*. 2003. V. 31. P. 4059–4070.
114. Banik S.S., Guo C., Smith A.C., Margolis S.S., Richardson D.A., Tirado C.A., Counter C.M. // *Mol. Cell. Biol*. 2001. V. 22. P. 6234–6246.
115. Bosoy D., Lue N.F. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 46305–46312.
116. Bryan T.M., Goodrich K.J., Cech T.R. // *Mol. Cell*. 2000. V. 6. P. 493–499.
117. Cunningham D.D., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2005. V. 25. P. 4442–4454.
118. Lai C.K., Mitchell J.R., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2001. V. 21. P. 990–1000.
119. Bosoy D., Peng Y., Mian I.S., Lue N.F. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. P. 3882–3890.
120. Sekarah V.G., Soares J., Jarstfer M.B. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1804. P. 1190–1201.
121. Скворцов Д.А., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. // *Acta Naturae*. 2009. T. 1. № 1. С. 51–68.
122. Wick M., Zubov D., Hagen G. // *Gene*. 1999. V. 232. P. 97–106.
123. Kilian A., Bowtell D.D., Abud H.E., Hime G.R., Venter D.J., Keese P.K., Duncan E.L., Reddel R.R., Jefferson R.A. // *Hum. Mol. Genet*. 1997. V. 6. P. 2011–2019.
124. Saeboe-Larssen S., Fossberg E., Gaudernack G. // *BMC Mol. Biol*. 2006. V. 7. P. 26.
125. Hisatomi H., Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Nagao K., Kanamaru T., Hirata H., Hibi N., Tsukada Y. // *Neoplasia*. 2003. V. 5. P. 193–197.
126. Colgin L.M., Wilkinson C., Englezou A., Kilian A., Robinson M.O., Reddel R.R. // *Neoplasia*. 2000. V. 2. P. 426–432.
127. Yi X., White D.M., Aisner D.L., Baur J.A., Wright W.E., Shay J.W. // *Neoplasia*. 2000. V. 2. P. 433–440.
128. Cerezo A., Kalthoff H., Schuermann M., Schafer B., Boukamp P. // *J. Cell Sci*. 2002. V. 115. P. 1305–1312.
129. Barclay J.Y., Morris A.G., Nwokolo C.U. // *Dig. Dis. Sci*. 2005. V. 50. P. 1299–1303.
130. Song M.S., Lee S.W. // *FEBS Lett*. 2006. V. 580. P. 5033–5043.
131. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Giudice L.C., Hoffman A.R. // *Cancer Res*. 1998. V. 58. P. 4168–4172.
132. Aisner D.L., Wright W.E., Shay J.W. // *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2002. V. 12. P. 80–85.
133. Jády B.E., Bertrand E., Kiss T. // *J. Cell. Biol*. 2004. V. 1. P. 647–652.
134. Box J.A., Bunch J.T., Tang W., Baumann P. // *Nature*. 2008. V. 456. P. 910–914.
135. Girard C., Verheggen C., Neel H., Cammas A., Vagner S., Soret J., Bertrand E., Bordonné R. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 25. P. 2060–2069.
136. Dez C., Henras A., Faucon B., Lafontaine D., Caizergues-Ferrer M., Henry Y. // *Nucl. Acids Res*. 2001. V. 29. P. 598–603.
137. Lafontaine D.L., Tollervey D. // *Trends Biochem. Sci*. 1998. V. 23. P. 383–388.
138. Watkins N.J., Gottschalk A., Neubauer G., Kastner B., Fabrizio P., Mann M., Lührmann R. // *RNA*. 1998. V. 4. P. 1549–1568.
139. Henras A., Henry Y., Bousquet-Antonelli C., Noaillac-Depeyre J., Gélugne J.P., Caizergues-Ferrer M. // *EMBO J*. 1998. V. 17. P. 7078–7090.
140. Kufel J., Allmang C., Chanfreau G., Petfalski E., Lafontaine D.L., Tollervey D. // *Mol. Cell. Biol*. 2000. V. 20. P. 5415–5424.
141. Tran H., Schilling M., Wirbelauer C., Hess D., Nagamine Y. // *Mol. Cell*. 2004. V. 13. P. 101–111.
142. Vaughn J.P., Creacy S.D., Routh E.D., Joyner-Butt C., Jenkins G.S., Pauli S., Nagamine Y., Akman S.A. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. P. 38117–38120.
143. Creacy S.D., Routh E.D., Iwamoto F., Nagamine Y., Akman S.A., Vaughn J.P. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. P. 34626–34634.
144. Iwamoto F., Stadler M., Chalupníková K., Oakeley E., Nagamine Y. // *Exp. Cell. Res*. 2008. V. 314. P. 1378–1391.
145. Lattmann S., Giri B., Vaughn J.P., Akman S.A., Nagamine Y. // *Nucl. Acids Res*. 2010. V. 38. P. 6219–6233.
146. Sexton A.N., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2011. V. 31. P. 736–743.
147. Booy E.P., Meier M., Okun N., Novakowski S.K., Xiong S., Stetefeld J., McKenna S.A. // *Nucl. Acids Res*. 2012. Jan 11.
148. McEachern M.J., Krauskopf A., Blackburn E.H. // *Annu. Rev. Genet*. 2000. V. 34. P. 331–358.
149. Meier U.T. // *Chromosoma*. 2005. V. 114. P. 1–14.
150. Matera A.G., Terns R.M., Terns M.P. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2007. V. 8. P. 209–220.
151. Wang C., Meier U.T. // *EMBO J*. 2004. V. 23. P. 1857–1867.
152. Mitchell J.R., Cheng J., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 1999. V. 19. P. 567–576.
153. Pogacíc V., Dragon F., Filipowicz W. // *Mol. Cell. Biol*. 2000. V. 20. P. 9028–9040.
154. Dragon F., Pogacíc V., Filipowicz W. // *Mol. Cell. Biol*. 2000.

- V. 20. P. 3037–3048.
155. Venteicher A.S., Meng Z., Mason P.J., Veenstra T.D., Artandi S.E. // *Cell*. 2008. V. 132. P. 945–957.
156. Marcand S., Brevet V., Mann C., Gilson E. // *Curr. Biol*. 2000. V. 10. P. 487–490.
157. Jády B.E., Richard P., Bertrand E., Kiss T. // *Mol. Biol. Cell*. 2006. V. 17. P. 944–954.
158. Tomlinson R.L., Ziegler T.D., Supakorndej T., Terns R.M., Terns M.P. // *Mol. Biol. Cell*. 2006. V. 17. P. 955–965.
159. Her J., Chung I.K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012. V. 417. P. 1086–1092.
160. Germain-Lee E.L., Obie C., Valle D. // *Genomics*. 1997. V. 44. P. 22–34.
161. Nagahama M., Hara Y., Seki A., Yamazoe T., Kawate Y., Shinohara T., Hatsuzawa K., Tani K., Tagaya M. // *Mol. Biol. Cell*. 2004. V. 15. P. 5712–5723.
162. Errington T.M., Fu D., Wong J.M., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2008. V. 28. P. 6510–6520.
163. Sekaran V.G., Soares J., Jarstfer M.B. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1804. P. 1190–1201.
164. ЩербакOVA Д.М., Соколов К.А., Зверева М.Э., Донцова О.А. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. С. 749–755.
165. Egan E.D., Collins K. // *Mol. Cell. Biol*. 2010. V. 30. P. 2775–2786.
166. Forsythe H.L., Jarvis J.L., Turner J.W., Elmore L.W., Holt S.E. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 15571–15574.
167. Hamma T., Ferré-D'Amaré A.R. // *J. Biol. Chem*. 2010. V. 285. P. 805–809.
168. Autexier C., Lue N.F. // *Annu. Rev. Biochem*. 2006. V. 75. P. 493–517.
169. Greider C.W. // *Mol. Cell. Biol*. 1991. V. 11. P. 4572–4580.
170. Lue N.F. // *BioEssays*. 2004. V. 26. P. 955–962.
171. Wallweber G., Gryaznov S., Pongracz K., Pruzan R. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 589–600.
172. Steitz T.A. // *J. Biol. Chem*. 1999. V. 274. P. 17395–17398.
173. Chang M., Arneric M., Lingner J. // *Genes Dev*. 2007. V. 21. P. 2485–2494.
174. Wang J., Yu L., Li J., Deng R., Wang X. // *Biotechnol. Appl. Biochem*. 2007. V. 48. P. 93–99.
175. Collins K., Greider C.W. // *Genes Dev*. 1993. V. 7. P. 1364–1376.
176. Cohn M., Blackburn E.H. // *Science*. 1995. V. 269. P. 396–400.
177. Lue N.F., Peng Y. // *Nucl. Acids Res*. 1997. V. 25. P. 4331–4337.
178. Lue N.F., Peng Y. // *Nucl. Acids Res*. 1998. V. 26. P. 1487–1494.
179. Oulton R., Harrington L. // *Mol. Biol. Cell*. 2004. V. 15. P. 3244–3256.
180. Huard S., Autexier C. // *Nucl. Acids Res*. 2004. V. 32. P. 2171–2180.
181. Petrov A.V., Dokudovskaya S.S., Sokolov K.A., Lavrik O.I., Favre A., Dontsova O.A., Bogdanov A.A. // *FEBS Lett*. 1998. V. 436. P. 35–40.
182. Niu H., Xia J., Lue N.F. // *Mol. Cell. Biol*. 2000. V. 20. P. 6806–6815.
183. Lue N.F., Bosoy D., Moriarty T.J., Autexier C., Altman B., Leng S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 9778–9783.
184. Смекалова Е.М., Петрова О.А., Зверева М.Э., Донцова О.А. // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 1. С. 72–75.
185. Kilian A., Bowtell D.D., Abud H.E., Hime G.R., Venter D.J., Keese P.K., Duncan E.L., Reddel R.R., Jefferson R.A. // *Hum. Mol. Genet*. 1997. V. 6. P. 2011–2019.
186. Ramakrishnan S., Eppenberger U., Mueller H., Shinkai Y., Narayanan R. // *Cancer Res*. 1998. V. 58. P. 622–625.
187. Masutomi K., Possemato R., Wong J.M., Currier J.L., Tothova Z., Manola J.B., Ganesan S., Lansdorp P.M., Collins K., Hahn W.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 8222–8227.
188. Armbruster B.N., Banik S.S., Guo C., Smith A.C., Counter C.M. // *Mol. Cell. Biol*. 2001. V. 21. P. 7775–7786.
189. Haendeler J., Hoffmann J., Brandes R.P., Zeiher A.M., Dimmeler S. // *Mol. Cell. Biol*. 2003. V. 23. P. 4598–4610.
190. Haendeler J., Hoffmann J., Diehl J.F., Vasa M., Spyridopoulos I., Zeiher A.M., Dimmeler S. // *Circ. Res*. 2004. V. 94. P. 768–775.
191. Haendeler J., Dröse S., Büchner N., Jakob S., Altschmied J., Goy C., Spyridopoulos I., Zeiher A.M., Brandt U., Dimmeler S. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009. V. 29. P. 929–935.
192. Santos J.H., Meyer J.N., Skovvaga M., Annab L.A., van Houten B. // *Aging Cell*. 2004. V. 3. P. 399–411.
193. Santos J.H., Meyer J.N., van Houten B. // *Hum. Mol. Genet*. 2006. V. 15. P. 1757–1768.
194. Ahmed S., Passos J.F., Birkett M.J., Beckmann T., Brings S., Peters H., Birch-Machin M.A., von Zglinicki T., Saretzki G. // *J. Cell Sci*. 2008. V. 121. P. 1046–1053.
195. Parrinello S., Samper E., Krtočila A., Goldstein J., Melov S., Campisi J. // *Nat. Cell. Biol*. 2003. V. 5. P. 741–747.
196. Packer L., Fuehr K. // *Nature*. 1977. V. 267. P. 423–425.
197. von Zglinicki T., Saretzki G., Döcke W., Lotze C. // *Exp. Cell Res*. 1995. V. 220. P. 186–193.
198. Shay J.W., Pereira-Smith O.M., Wright W.E. // *Exp. Cell Res*. 1991. V. 196. P. 33–39.
199. Wright W.E., Pereira-Smith O.M., Shay J.W. // *Mol. Cell. Biol*. 1989. V. 9. P. 3088–3092.
200. Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., et al. // *Nature*. 2005. V. 436. P. 725–730.
201. Kim K.S., Kang K.W., Seu Y.B., Baek S.H., Kim J.R. // *Mech. Ageing Dev*. 2009. V. 130. P. 179–188.
202. Henle E.S., Han Z., Tang N., Rai P., Luo Y., Linn S. // *J. Biol. Chem*. 1999. V. 274. P. 962–971.
203. Oikawa S., Kawanishi S. // *FEBS Lett*. 1999. V. 453. P. 365–368.
204. Saretzki G., Murphy M.P., von Zglinicki T. // *Aging Cell*. 2003. V. 2. P. 141–143.
205. Sharma N.K., Reyes A., Green P., Caron M.J., Bonini M.G., Gordon D.M., Holt I.J., Santos J.H. // *Nucl. Acids Res*. 2012. V. 40. P. 712–725.
206. Santos J.H., Meyer J.N., van Houten B. // *Hum. Mol. Genet*. 2006. V. 15. P. 1757–1768.
207. Del Bufalo D., Rizzo A., Trisciuoglio D., Cardinali G., Torrisi M.R., Zangemeister-Wittke U., Zupi G., Biroccio A. // *Cell Death Differ*. 2005. V. 12. P. 1429–1438.
208. Büchner N., Zschauer T.C., Lukosz M., Altschmied J., Haendeler J. // *Exp. Gerontol*. 2010. V. 45. P. 558–562.
209. Gorbunova V., Seluanov A., Pereira-Smith O.M. // *J. Biol. Chem*. 2002. V. 277. P. 38540–38549.
210. Seimiya H., Sawada H., Muramatsu Y., Shimizu M., Ohko K., Yamane K., Tsuruo T. // *EMBO J*. 2000. V. 19. P. 2652–2661.
211. Kovalenko O.A., Caron M.J., Ulema P., Medrano C., Thomas A.P., Kimura M., Bonini M.G., Herbig U., Santos J.H. // *Aging Cell*. 2010. V. 9. P. 203–219.
212. Jakob S., Schroeder P., Lukosz M., Büchner N., Spyridopoulos I., Altschmied J., Haendeler J. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. P. 33155–33161.
213. Akiyama M., Hideshima T., Hayashi T., Tai Y.T.,

- Mitsiades C.S., Mitsiades N., Chauhan D., Richardson P., Munshi N.C., Anderson K.C. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 18–21.
214. Liu K., Hodes R.J., Weng N. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 4826–4830.
215. Kimura A., Ohmichi M., Kawagoe J., Kyo S., Mabuchi S., Takahashi T., Ohshima C., Arimoto-Ishida E., Nishio Y., Inoue M., et al. // *Oncogene.* 2004. V. 23. P. 4505–4515.
216. Ram R., Uziel O., Eldan O., Fenig E., Beery E., Lichtenberg S., Nordenberg Y., Lahav M. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. P. 914–923.
217. Maida Y., Yasukawa M., Furuuchi M., Lassmann T., Possemato R., Okamoto N., Kasim V., Hayashizaki Y., Hahn W.C., Masutomi K. // *Nature.* 2009. V. 461. P. 230–235.
218. d'Adda di Fagagna F., Teo S.H., Jackson S.P. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1781–1799.
219. Takata H., Kanoh Y., Gunge N., Shirahige K., Matsuura A. // *Mol. Cell.* 2004. V. 14. P. 515–522.
220. Verdun R.E., Crabbe L., Haggblom C., Karlseder J. // *Mol. Cell.* 2005. V. 20. P. 551–561.
221. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kaçmaz K., Linn S. // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 39–85.
222. Shiloh Y. // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. P. 155–168.
223. Flynn R.L., Zou L. // *Trends Biochem. Sci.* 2011. V. 36. P. 133–140.
224. López-Contreras A.J., Fernandez-Capetillo O. // *DNA Repair (Amst.)* 2010. V. 9. P. 1249–1255.
225. Karlseder J., Hoke K., Mirzoeva O.K., Bakkenist C., Kastan M.B., Petrini J.H., de Lange T. // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. P. 1150–1156.
226. Kedde M., le Sage C., Duursma A., Zlotorynski E., van Leeuwen R., Nijkamp W., Beijersbergen R., Agami R. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 40503–40514.
227. Mahalingam D., Tay L.L., Tan W.H., Chai J.H., Wang X. // *FEBS J.* 2011. V. 278. P. 3724–3738.
228. Sharma G.G., Gupta A., Wang H., Scherthan H., Dhar S., Gandhi V., Iliakis G., Shay J.W., Young C.S., Pandita T.K. // *Oncogene.* 2003. V. 22. P. 131–146.
229. Osley M.A., Tsukuda T., Nickoloff J.A. // *Mutat. Res.* 2007. V. 618. P. 65–80.
230. Kruhlak M.J., Celeste A., Dellaire G., Fernandez-Capetillo O., Müller W.G., McNally J.G., Bazett-Jones D.P., Nussenzweig A. // *J. Cell. Biol.* 2006. V. 172. P. 823–834.
231. Perrault S.D., Hornsby P.T., Betts D.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 335. P. 925–936.
232. Simonsen J.L., Rosada C., Serakinci N., Justesen J., Stenderup K., Rattan S.I., Jensen T.G., Kassem M. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 592–596.
233. Oh H., Taffet G.E., Youker K.A., Entman M.L., Overbeek P.A., Michael L.H., Schneider M.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 10308–10313.
234. Stampfer M.R., Garbe J., Levine G., Lichtsteiner S., Vasserot A.P., Yaswen P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 4498–4503.
235. Smith L.L., Coller H.A., Roberts J.M. // *Nat. Cell. Biol.* 2003. V. 5. P. 474–479.
236. Xiang H., Wang J., Mao Y., Liu M., Reddy V.N., Li D.W. // *Oncogene.* 2002. V. 21. P. 3784–3791.
237. Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D. // *Nature.* 1993. V. 366. P. 701–704.
238. Xia C., Bao Z., Tabassam F., Ma W., Qiu M., Hua S., Liu M. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 20942–20948.
239. el-Deiry W.S., 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.
240. Yang C., Przyborski S., Cooke M.J., Zhang X., Stewart R., Anyfantis G., Atkinson S.P., Saretzki G., Armstrong L., Lako M. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 850–863.
241. Farwell D.G., Shera K.A., Koop J.I., Bonnet G.A., Matthews C.P., Reuther G.W., Coltrera M.D., McDougall J.K., Klingelutz A.J. // *Am. J. Pathol.* 2000. V. 156. P. 1537–1547.
242. Serrano M., Hannon G.J., Beach D. // *Nature.* 1993. V. 366. P. 704–707.
243. Ginsberg D. // *FEBS Lett.* 2002. V. 529. P. 122–125.
244. Lazzarini Denchi E., Helin K. // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. P. 661–668.
245. Oda K., Matsuoka Y., Funahashi A., Kitano H. // *Mol. Syst. Biol.* 2005. V. 1. P. 1–10.
246. Liu J.J., Chao J.R., Jiang M.C., Ng S.Y., Yen J.J., Yang-Yen H.F. // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 3654–3663.
247. Lavoie J.N., L'Allemain G., Brunet A., Müller R., Pouyssegur J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 20608–20616.
248. Muise-Helmericks R.C., Grimes H.L., Bellacosa A., Malstrom S.E., Tsichlis P.N., Rosen N. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 29864–29872.
249. Diehl J.A., Cheng M., Roussel M.F., Sherr C.J. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 3499–3511.
250. Huang W., Chang H.Y., Fei T., Wu H., Chen Y.G. // *Oncogene.* 2007. V. 26. P. 2471–2482.
251. Lindvall C., Hou M., Komurasaki T., Zheng C., Henriksson M., Sedivy J.M., Björkholm M., Teh B.T., Nordenskjöld M., Xu D. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 1743–1747.
252. Toyoda H., Komurasaki T., Uchida D., Morimoto S. // *Biochem. J.* 1997. V. 326. P. 69–75.
253. Zhou L., Zheng D., Wang M., Cong Y.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 386. P. 739–743.
254. Young J.I., Sedivy J.M., Smith J.R. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 19904–19908.
255. Zhang Q., Wang H.Y., Woetmann A., Raghunath P.N., Odum N., Wasik M.A. // *Blood.* 2006. V. 108. P. 1058–1064.
256. Park O.K., Schaefer T.S., Nathans D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 13704–13708.
257. Park J.I., Venteicher A.S., Hong J.Y., Choi J., Jun S., Shkreli M., Chang W., Meng Z., Cheung P., Ji H., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 66–72.

УДК 577.2

Фактор свертывания крови IX для терапии гемофилии В

Н. А. Орлова^{1,2}, С. В. Ковнир^{1,2}, И. И. Воробьев^{1*}, А. Г. Габиров¹¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Гематологический научный центр Минздравсоцразвития Российской Федерации, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4

*E-mail : ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 28.12.2011 г.

РЕФЕРАТ Фактор свертывания крови IX является проферментом протеазы, играющей центральную роль в каскаде свертывания крови. Врожденное отсутствие функционального фактора IX или его низкий уровень приводят к развитию гемофилии В, заболеванию, требующему проведения постоянной заместительной терапии препаратами фактора IX. В обзоре рассмотрены текущие достижения в области получения рекомбинантного фактора IX и его модифицированных вариантов, способы получения фактора IX в трансгенных организмах и возможности генотерапии гемофилии В.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА фактор свертывания крови IX, гемофилия В, гетерологичные системы экспрессии рекомбинантных белков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ FIX – фактор IX; FIXa – активированный FIX; ME – международная единица; ЭФР – эпидермальный фактор роста. Добавление буквы «а» к номеру соответствующего фактора свертывания – активированный фактор.

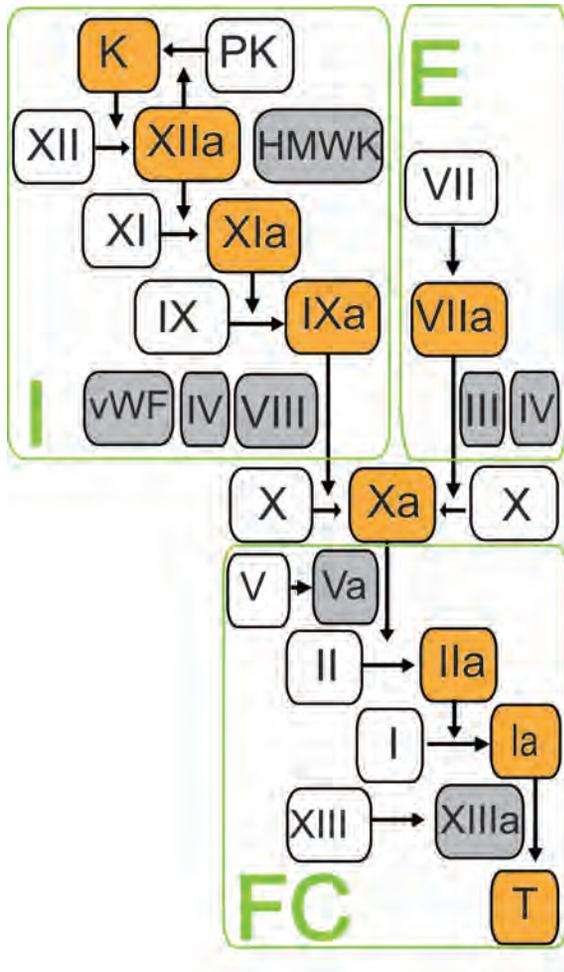
ВВЕДЕНИЕ

Фактор IX свертывания крови (FIX, фактор Кристмаса) является проферментом сериновой протеазы, которая в присутствии Ca²⁺ и мембранных фосфолипидов гидролизует связь аргинин–изолейцин в молекуле фактора X с образованием активированного фактора X (FXa) [1]. Каталитическая эффективность FIXa сильно возрастает при связывании кофактора – активированного фактора свертывания крови VIII (FVIIIa). Нековалентный комплекс FIXa, FVIIIa и FX, связанных с фосфолипидной мембраной, называется «X-аза» или «теназа» и представляет собой основной элемент петли положительной обратной связи в каскаде свертывания крови (рис. 1).

Фактор IX синтезируется в печени в виде неактивного белка–предшественника, который процессируется в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, где подвергается множественным посттрансляционным модификациям различных типов и секретруется в кровоток после протеолитического отщепления пропептида. Циркулирующий зрелый FIX имеет молекулярную массу 57 кДа и среднюю концентрацию в плазме крови около 90 нМ. В каскаде свертывания крови FIX активируется после протеолитического расщепления активированным фактором XI (внутренний путь) или активированным фактором VII (внешний путь) с образованием двух

полипептидных цепей, связанных дисульфидной связью. Активированный FIX постепенно инактивируется, в основном путем медленного связывания с антитромбином III, нексином-2, белок Z-зависимым ингибитором протеаз и рецепторами эндцитоза гепатоцитов, а также подвергается расщеплению эластазой нейтрофилов [3].

Ген фактора IX человека, расположенный на X-хромосоме, состоит из 33.5 т.п.н. и содержит восемь экзонов. Мутации единственной копии этого гена, приводящие к нарушению функции кодируемого белка, обуславливают нарушение системы свертывания крови – гемофилию В. Список мутаций гена FIX, выявленных у больных гемофилией В, приведен в специализированной базе данных [4]. Тяжелая форма гемофилии В, требующая регулярной заместительной терапии, встречается с частотой 1 случай на 30 тыс. мужчин, что составляет около 20% всех больных гемофилией. Недавно было установлено, что представители европейских королевских семей страдали именно гемофилией В, и последний предполагаемый носитель заболевания скончался в 1940 г. [5]. В данной группе семей заболевание было обусловлено точечной мутацией, которая привела к нарушению сплайсинга мРНК FIX и вызвала появление альтернативной укороченной формы белка. В некоторых случаях мутации в области промотора



#	Название	Свойства	Путь
I	Фибриноген		Е, I
II	Протромбин	ВКЗ, СП	Е, I
III	Тканевый фактор, тромбопластин	НЭК	Е
IV	Ca ⁺⁺	НЭК	Е, I
V	АС-глобулин, проакселерин	НЭК	Е, I
VII	Проконвертин	ВКЗ, СП	Е
VIII	Антигемофильный глобулин	НЭК	I
IX	Фактор Кристмаса	ВКЗ, СП	I
X	Фактор Стюарта-Прауэра	ВКЗ, СП	Е, I
XI	Предшественник тромбопластина	СП	I
XII	Фактор Хагеманна	СП	I
XIII	Фибринолигаза (а), фибринстабилизирующий фактор	ТГ	Е, I
vWF	Фактор Виллебранда	НЭК	I
PK	Фактор Флетчера, плазменный прекалликреин	СП	Е, I
HMWK	Фактор Фитцджеральда, высокомолекулярный кининоген плазмы	НЭК	I

Рис. 1. Схема системы свертывания крови и международная номенклатура факторов свертывания [2]. ВКЗ – витамин К-зависимый, СП – сериновая протеаза, ТГ – трансклутаминаза, НЭК – неэнзиматический кофактор; Е – внешний; I – внутренний, FC – конечный общий путь свертывания крови.

гена *FIX* приводят к менее тяжелой форме заболевания, гемофилии В «Лейден» [6], характеризующейся почти полным отсутствием *FIX* в детстве и устойчивым увеличением уровня *FIX* в период полового созревания до близких к норме значений.

Современная практика, применяемая при гемофилии В, сводится к заместительной белковой терапии, исключительно дорогостоящей для больных и системы здравоохранения. Всего лишь около 20% больных гемофилией В могут оплачивать такую терапию, и гемофилия В до сих пор смертельна для детей из слаборазвитых стран [7].

ЗАМЕСТИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ГЕМОФИЛИИ В

Первоначально терапия гемофилии В ограничивалась периодическими переливаниями плазмы крови, впоследствии замененными на более эффективные концентраты протромбинового комплекса – смеси ви-

тамин К-зависимых факторов свертывания крови IX, II, VII и X. Основным ограничением такой терапии был существенный риск развития тромботических эпизодов. Лекарственные препараты *FIX* с большей степенью чистоты были получены из фракций плазмы крови, разделяемой методом Кона, при помощи дополнительной очистки ионообменной хроматографией. Безопасность всех лекарственных препаратов *FIX*, получаемых из донорской плазмы, была существенно улучшена после внедрения процессов вирусинактивации, включающих прогревание, обработку тиоцианатом натрия или детергентом и растворителем для удаления оболочечных вирусов, а также процесса нанофильтрации для удаления безоболочечных вирусов [8].

Безопасность плазменных концентратов *FIX* также лимитируется существенным уровнем примеси активированного *FIX* (*FIXa*) и остаточных количеств

других факторов свертывания, достаточных для увеличения риска возникновения тромботических эпизодов. Дополнительная очистка FIX при помощи иммуноаффинной хроматографии позволяет полностью удалить эти примеси [9], однако, как и в случае других продуктов переработки плазмы крови, риск вирусного или прионного инфицирования больных не может быть полностью устранен [10].

РЕКОМБИНАНТНЫЙ FIX

В 1982 г. клонировали кДНК FIX [11], а вслед за этим в 1985 г. на основе клеток гепатомы крысы, фибробластов мыши и линии клеток почки хомячка (ВНК) получили клеточные линии, секретирующие биологически активный FIX в культуральную среду [12–14]. В 1986 г. была получена линия клеток СНО (яичник китайского хомячка), продуцирующая FIX и пригодная для промышленного культивирования [15].

В настоящий момент зарегистрирован один лекарственный препарат рекомбинантного FIX – нонаког альфа (торговое название Бенефикс), одобренный для применения в США и странах ЕС в 1997 г. Нонаког альфа получают в клетках СНО, культивируемых в питательной среде, не содержащей сыворотки или других продуктов животного происхождения. Выделение и очистку рекомбинантного FIX проводят при помощи четырех хроматографических стадий, не используя иммуноаффинную хроматографию, потенциально присутствующие вирусы удаляют при помощи нанофильтрации на фильтре с порогом отсека 70 кДа [16]. В готовой лекарственной форме нонакога альфа не используется альбумин человека. Таким образом, в процессе получения лекарственного препарата исключено использование веществ животного происхождения и компонентов донорской плазмы [17]. Исходные варианты готовой лекарственной формы рекомбинантного FIX были рассчитаны на изготовление флаконов, содержащих 250–1000 МЕ лиофилизованного белка. В дальнейшем был разработан вариант фармацевтической композиции, позволяющий увеличить содержание основного вещества до 2000 МЕ на флакон [18] и хранить препарат при комнатной температуре.

В ходе клинических испытаний рекомбинантного FIX было установлено, что безопасность и клиническая эффективность рекомбинантного и получаемого из плазмы крови вариантов FIX не имеют существенных различий. После проведения 1514 инфузий рекомбинантного FIX 56 больным не выявлено ни одного случая вирусной инфекции [19]. Уровень иммунного ответа на вводимый препарат также был сходным у рекомбинантного FIX и получаемого из плазмы крови [20].

Различия в структуре рекомбинантного и природного FIX, а также функциональная значимость таких различий подробно изучены в ряде работ. Первоначально было установлено, что структура рекомбинантного и природного FIX весьма сходна [21]. В то же время уровень восстановления активности FIX *in vivo* после инфузии рекомбинантного препарата был значительно ниже, чем при использовании природного FIX [22], что привело к увеличению рекомендуемой терапевтической дозы рекомбинантного FIX в 1.5–2 раза относительно природного [23]. Детальное сравнение паттернов посттрансляционных модификаций в партиях рекомбинантного FIX, полученных на двух различных производственных площадках, не выявило никаких структурных различий [24]. Таким образом, различия природного и рекомбинантного FIX не могут быть обусловлены особенностями производственных процессов.

СТРУКТУРА И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ FIX

FIX принадлежит к семейству витамин К-зависимых факторов свертывания крови, он состоит из четырех структурных доменов – Gla, двух ЭФР-подобных доменов и С-концевого домена сериновой протеазы (рис. 2). N-Концевой лидерный пептид FIX отделяется при транслокации полипептида в эндоплазматический ретикулум, пропептид, непосредственно предшествующий домену Gla, отделяется при секреции зрелого белка. Активационный пептид, расположенный между вторым ЭФР-подобным доменом и доменом сериновой протеазы, специфически отделяется факторами XIa или VIIa при активации FIX.

Наличие домена Gla, расположенного на N-конце молекулы зрелого FIX, является общим признаком для витамин К-зависимых белков. Этот домен обеспечивает связывание FIX и FIXa с поверхностью эндотелиальных клеток, причем такое взаимодействие полностью нарушается при блокировании γ -карбоксилирования остатков Asp в составе домена [25]. Первый ЭФР-подобный домен FIX содержит высокоаффинный сайт связывания иона кальция, а также обуславливает взаимодействие FIX с фактором VIIIa [26] и с тканевым фактором [1]. В состав первого ЭФР-подобного домена входит редко встречающийся модифицированный остаток β -гидроксиаспартата (Huа), возникающий при β -гидроксилировании Asp64. Уровень данной посттрансляционной модификации не влияет на прокоагуляционную активность FIX [25], но замена Asp64 на остаток основной или нейтральной аминокислоты приводит к понижению активности FIX [27]. Второй ЭФР-подобный домен FIX принимает

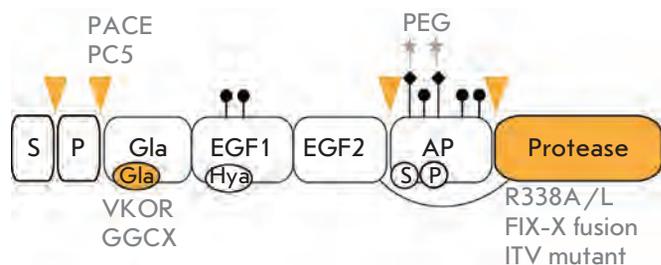


Рис. 2. Структура FIX. S – сигнальный пептид, P – про-пептид, Gla – домен Gla, EGF1 и EGF2 – ЭФР-подобные домены, AP – активационный пептид, Protease – домен сериновой протеазы. Сайты посттрансляционных модификаций: Gla – γ -карбоксилирование, Hyal – β -гидроксилирование; S – сульфатирование, P – фосфорилирование, \blacklozenge – N-связанное и \bullet – O-связанное гликозилирование; точки протеолитического расщепления обозначены треугольниками. Серым обозначены ферменты, участвующие в посттрансляционном процессе FIX, и варианты искусственной модификации FIX.

участие в образовании комплекса FIXa–FVIIIa–FX [28, 29]. Он соединяется с доменом сериновой протеазы при помощи активационного пептида и единственной дисульфидной связи.

Активационный пептид FIX содержит большую часть сайтов посттрансляционных модификаций, влияющих на свойства FIX (табл. 1). Домен сериновой протеазы составляет около половины общей массы FIX, содержащийся в нем активный сайт скрыт активационным пептидом и экспонируется после его отделения. Домен сериновой протеазы не содержит известных посттрансляционных модификаций, после активации FIX он остается ковалентно связанным с N-концевой частью молекулы FIX при помощи одной дисульфидной связи, расположенной с обратной стороны домена (относительно области активного сайта). С-Конец FIXa также пространственно удален от активного сайта протеазы, что позволяет создавать слитные белки FIX и С-концевых белков-партнеров.

Из всех посттрансляционных модификаций только γ -карбоксилирование в домене Gla непосредственно определяет прокоагуляционную активность FIX [30]. Влияние остальных модификаций на функции FIX выражено в меньшей степени, в ряде случаев оно отсутствует или остается неизвестным.

В работах исследовательской группы Genetics Institute, Inc. показано, что наблюдающееся уменьшение уровня восстановления FIX *in vivo* при инфузиях рекомбинантного белка вызвано отсутствием

фосфорилирования остатка Ser158 и очень низким уровнем сульфатирования Tyr155 [21]. Было установлено, что инфузии препарата рекомбинантного FIX, обогащенного сульфатированной формой, приводят к увеличению уровня восстановления FIX *in vivo*. Одновременно с этим при выделении FIX человека из плазмы крови собак с гемофилией В, получивших инъекцию рекомбинантного FIX, наблюдалось увеличение доли сульфатированного варианта белка. Необходимо отметить, что сульфатированный Tyr155 и фосфорилированный остаток Ser158 в составе активационного пептида расположены в непосредственной близости друг от друга и от олигосахаридной группы, связанной с остатком Asn157, что может привести к затруднениям при разделении фосфорилированной и сульфатированной форм FIX.

Природный FIX подвергается как O-, так и N-гликозилированию. Сайты прикрепления O-гликанов расположены в первом ЭФР-подобном домене [31] и активационном пептиде.

Два O-связанных олигосахарида в ЭФР-подобном домене природного и рекомбинантного FIX присутствуют полностью, четыре потенциальных сайта O-гликозилирования в активационном пептиде FIX замещены частично в обоих случаях [32, 33]. Активационный пептид FIX также содержит два сайта N-гликозилирования – Asn157 и Asn167 [11], в природном FIX оба сайта полностью заняты олигосахаридами с высоким содержанием сиаловой кислоты [34]. Энзиматическое удаление всех остатков сиаловой кислоты в составе O- и N-связанных олигосахаридных групп не влияет на скорость активации FIX и его способность активировать фактор X [35]. В то же время пониженный уровень сиалирования N-гликанов, выявляемый в вариантах рекомбинантного FIX, может быть причиной изменений в связывании FIX с поверхностью эндотелиальных клеток, скорости вывода из кровотока или чувствительности к протеолизу.

Уровень последней известной посттрансляционной модификации FIX – β -гидроксилирования остатка Asp64 в первом ЭФР-подобном домене, в рекомбинантном FIX несколько выше, чем в природном [25]. Неполная модификация Asp64 в природном FIX указывает на отсутствие биологической значимости данной посттрансляционной модификации для функционирования FIX [36].

Лекарственный препарат рекомбинантного FIX не превосходит препараты природного FIX, по крайней мере, по требуемой инфузионной дозе и времени жизни в кровотоке, поэтому дальнейшее изучение рекомбинантных вариантов FIX и его производных может иметь клинические перспективы.

Таблица 1. Посттрансляционные модификации FIX и его производных

Структурный элемент	Домен	Функция	Природный FIX	Рекомбинантный FIX (нонаког альфа)	Слитный белок с Fc-фрагментом	Конъюгат с PEG
γ-Карбоксилирование (Glu → Gla), общее число и доля остатков Gla	Gla	Взаимодействие с мембраной клеток, связывание Ca ²⁺	Всего 12 (12/12)	Всего 11.6 (60% 12/12; 35% 11/12; 5% 10/12)	Всего 11.2	Всего 11.6 (33% 11/12; 64% 12/12)
β-Гидроксилирование (Asp64 → Hyp)	EGF1	н/о	37%	46–49%	70%	Частично
N-Связанные олигосахариды	AP	н/о	3- и 4-антенные, сialiрированы Neu-5-Ac	Больше структур комплексного типа, выше уровень фукозилирования, больше поли-ацетилактазаминных структур	Обе группы присутствуют, ядро фукозилировано, 3- и 4-антенные комплексного типа	
Гетерогенность для Asn157	AP		Высокая	Низкая	Низкая	Сиалированы <i>in vitro</i>
Сиалирование для Asn167	AP		Полное	Снижено	Неполное	
O-Связанные олигосахариды						
Ser53	Gla	н/о	(Xu)1-2-Glc	(Xu)2-Glc	Отличаются от такового FIX из клеток CHO	Присутствует
Ser61	Gla	н/о	NeuAcGalGlcNAcFuc	NeuAcGalGlcNAcFuc		Присутствует
Thr159, Thr167, Thr172, Thr179 (?)	AP	Блокируют активный сайт протеазы	Частично	Частично	Частично	Частично
Сульфатирование Tyr155	AP	Уровень восстановления <i>in vivo</i>	>90%	5–15%	4%	н/о
Фосфорилирование Ser158	AP	Уровень восстановления <i>in vivo</i> ?	>90%	<10%	<10%	н/о
Активированный FIX	-	Нежелательная примесь	0.21 ± 0.01%	0.11 ± 0.0019%	<0.013%	0.03%

Примечания: н/о – не определено, домены FIX обозначены согласно рис. 2.

УЛУЧШЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО FIX

Уровень продукции рекомбинантного FIX, обеспечиваемый промышленной линией-производителем [37], относительно низок и составляет около 30 мг/л культуры. Секретия FIX может быть увеличена на 30–50% при добавлении к культуральной среде тестостерона до 1 нМ [38] или увеличена вдвое при добавлении активатора протеинкиназы C – 4-форбол-12-мирилата-13-ацетата и кальциевого ионофора [39]. Уровень нежелательной примеси активированного FIX в кондиционированной среде можно значительно уменьшить при понижении концентрации ионов кальция с 1.12 до 0.5 мМ [40]. В другой работе той же исследовательской группы сообщается о 30% повышении уровня секретиремого FIX при увеличении концентрации ионов кальция в среде до 1.3 мМ, при этом существенного роста содержания активированного FIX не наблюдалось [41].

В исходных работах, описывающих экспрессию FIX в клетках CHO, обнаружено, что секретиремый FIX содержит значительную долю неактивных молекул с непроцессированным пропептидом. Полное или почти полное отщепление пропептида достигается только при коэкспрессии субтилизин/кексин-подобной конвертазы PACE/фурин [42] или гомологичной ей конвертазы PC5 [43, 44].

Прокоагулянтная активность FIX зависит от уровня γ -карбоксилирования домена Gla – в полностью активном FIX первые 10 остатков Glu должны быть конвертированы в остатки Gla, при этом уровень конверсии двух последних остатков Glu не влияет на свойства FIX [45]. В молекуле природного FIX все 12 остатков Glu в домене Gla полностью γ -карбоксилированы, в то время как в рекомбинантном FIX, получаемом в клетках CHO, уровень модификации двух последних остатков Glu несколько снижен. Общее число остатков Gla в рекомбинантном FIX из клеток CHO достигает 11.5 на одну молекулу белка. Удельная прокоагулянтная активность такого FIX составляет не менее 200 МЕ/мг и не отличается от удельной активности природного FIX [37]. В случае экспрессии FIX в клетках линии ВНК наблюдалось снижение удельной прокоагулянтной активности продукта, синтезируемого высокопродуктивными линиями, что компенсировалось коэкспрессией витамин-К-2,3-эпоксид-редуктазы (VKOR), обеспечивающего восстановление эпокси-формы витамина К до активной формы, использующейся в качестве кофактора в реакции γ -карбоксилирования [46].

Стадия посттрансляционных модификаций, определяющая скорость секретии FIX культивируемыми клетками, к настоящему моменту не выявлена, поэ-

тому увеличение уровня секретии правильно процессированного FIX в клетках CHO возможно при сверхэкспрессии или нокдауне различных ферментов и шаперонов CHO. Известно, что по крайней мере одна посттрансляционная модификация FIX – процессинг пропептида, может производиться не на поверхности клеток, а в культуральной среде после секретии продукта при коэкспрессии укороченного растворимого варианта PACE/фурин [37]. При изучении стадии, определяющей скорость посттрансляционных модификаций гомологичного FIX витамин К-зависимого белка С человека, получаемого в клетках линии 293, установлено, что скорость секретии продукта лимитирована N-гликозилированием [47]. Скорость секретии другого гомолога FIX – фактора VII, получаемого в клетках CHO, определялась двумя стадиями – посттрансляционным гликозилированием и γ -карбоксилированием [48]. Интересно отметить, что типичный промышленный уровень продукции FVII приблизительно в 5 раз выше уровня продукции FIX, при этом единственное значимое различие в их посттрансляционных модификациях состоит в наличии четырех–шести сайтов O-гликозилирования в молекуле FIX и двух – в молекуле FVII.

В настоящий момент при промышленном получении рекомбинантного FIX используют клетки линии CHO, которые могут быть заменены более продуктивными культивируемыми клетками из других тканей и организмов. Природный FIX продуцируется клетками печени, поэтому использование культивируемых производных гепатоцитов может существенно увеличить продуктивность линии. Так, уровень экспрессии FIX, продуцируемого в линии клеток HepG2 (гепатома человека), был в 1.5 раза выше, чем в клетках 293 (эпителий почки эмбриона человека), инфицированных одним и тем же ретровирусным вектором [39]. Перспективными могут быть и культивируемые клетки беспозвоночных. Например, уровень секретии FIX при трансфекции линии клеток дрозофилы Sf2 в 12 раз превышал известный уровень экспрессии FIX в клетках CHO [49].

ТРАНСГЕННЫЕ ОРГАНИЗМЫ

В течение последних 20 лет молоко трансгенных животных рассматривается в качестве наилучшего источника терапевтических белков. Молоко трансгенных овец, несущих гибридный ген FIX с промоторной областью β -лактоглобулина, содержало небольшое количество биологически неактивного FIX [50]. Использование техники пересадки ядер соматических клеток, разработанной компанией PPL Therapeutics, Ltd., позволило несколько увеличить уровень FIX в молоке двух трансгенных овец – Молли и Полли [51]. Этот метод ранее использовали для получения

Таблица 2. Основные свойства трансгенных животных, способных секретировать FIX в молоко

Название	Беременность, мес.	Созревание, мес.	Объем молока, л ^{*#}	Период от введения трансгена до лактации, мес.	Оценка продуктивности, г ^{*#}	Продуктивность FIX, расчетная, г [*]	Уровни секреции FIX, с поправкой на долю биологически активной формы, опубликованные
Мышь	0.75	1	0.0015	3–6	0.01–0.02	0.000 045	30 мг/л [53]
Кролик	1	5–6	2–5	7–8	20	-	-
Овца	5	6–8	200–500	16–18	2500	5–12.5	25 мг/л, неактивен [50]
Коза	5	6–8	600–800	16–18	4000	0.008–0.011	0.0137 мг/л [52]
Свинья	4	6–8	200–400	15–16	1500	75–150	375 мг/л [55]
Корова	9	16	8000	30–33	4000–8000	-	-

*В год на одну самку.

#По данным [58, 59].

клонированной овцы Долли. Сходный уровень FIX зафиксирован в молоке трансгенных коз – до 13.7 мг/л при доле биологически активной «гамма-гликозилированной» формы более 90% [52] и трансгенных мышей – 60 мг/л, 50% биологически активной формы FIX.

Наилучшие уровни FIX получены с использованием трансгенных свиней [54–56]. Несмотря на теоретически предсказанные исключительно высокие уровни секреции целевых белков в свиное молоко, в случае фактора IX удалось добиться только среднего уровня продуктивности (табл. 2). Предполагается, что скорость секреции FIX клетками молочной железы свиньи определяется γ -карбоксилированием. Максимальная специфическая активность продукта (т.е. полное γ -карбоксилирование FIX) описана у животных, продуцирующих FIX на уровне 200 мг/л [54]; у животных с уровнем секреции 2–3 г/л удельная активность FIX составляла только 10–20% от нормы [55]. Несмотря на относительно низкую долю правильно γ -карбоксилированного FIX, молоко высокопродуктивных трансгенных свиней было использовано при разработке промышленного процесса очистки FIX, позволяющего получать конечный продукт с высоким содержанием полностью γ -карбоксилированной формы и нормальным паттерном гликозилирования [56]. Предполагается, что получаемый таким образом FIX может использоваться для начала клинических испытаний. Можно отметить, что использование молока трансгенных свиней вместо кондиционированной культуральной среды из биореактора позволяет иметь исходный материал для выделения и очистки FIX с увеличенным в 10 раз содержанием целевого

белка. В то же время в молоке во много раз больше посторонних примесей – белков свиньи и липидов, оно нестерильно и может содержать существенные количества бактерий и эндотоксинов.

Уровень продукции биологически активной формы другого фармацевтически значимого белка – антитромбина III, обладающего сходным с FIX набором посттрансляционных модификаций, в молоке трансгенных коз был доведен до 1–2 г/л, что позволило получить конечный продукт с общим выходом 53% [57] и развернуть единственное коммерческое производство рекомбинантного антитромбина III для медицинского применения.

Уровень потребления FIX в США можно оценить как 2 кг/год, в России – 700 г/год, в мире – 40 кг/год. При существующих уровнях продукции FIX в молоке трансгенных свиней и предположительном 50% выходе готового продукта при выделении и очистке, стадо из 40 свиноматок может обеспечить потребности США, а стадо из 800 свиноматок – все мировые потребности в FIX.

Помимо молока трансгенных животных, перспективным источником фармацевтических белков могут быть семена и ткани трансгенных растений. В настоящий момент получение биологически активных витамин K-зависимых белков в трансгенных растениях невозможно, поскольку в растениях нет γ -карбоксилаз [60]. Это ограничение можно преодолеть коэкспрессией в растениях генов γ -карбоксилаз млекопитающих и соответствующих коферментов, однако маловероятно, чтобы такую комплексную задачу удалось решить в ближайшем будущем.

К настоящему моменту биологически неактивный FIX получен в трансгенных растениях томата [61] и семенах сои [62]. Очень низкий уровень экспрессии FIX – 15.84 мкг/кг, зафиксирован в свежих плодах трансгенных томатов; в семенах сои уровень FIX составил 800 мг/кг. Обе системы экспрессии позволяют получать зрелый и гликозилированный целевой белок.

У небольшой части больных гемофилией В (1.5–3%) проведение заместительной терапии препаратами FIX приводит к образованию высоких титров антител, нейтрализующих FIX [63]. Такие антитела снижают эффективность профилактических инфузий FIX и требуют постоянного увеличения доз FIX или использования очень больших количеств FIX для индукции иммунологической толерантности. Формирование иммунологической толерантности требует от нескольких месяцев до года и может сопровождаться развитием синдрома острой почечной недостаточности и анафилактических реакций. По крайней мере часть побочных явлений, возникающих при формировании иммунологической толерантности, обусловлена избыточной прокоагулянтной активностью вводимого FIX, поэтому использование биологически неактивных вариантов FIX могло бы увеличить безопасность проведения процедуры формирования иммунологической толерантности. Гибридный белок, состоящий из FIX и субъединицы В холерного токсина (трансмукозального переносчика), экспрессировали в хлоропластах табака на уровне 400 мг/кг листьев. Порошок из замороженных листьев табака использовали для индукции иммунологической толерантности у мышей с нокаутом гена *FIX*, получающих инъекции FIX человека [64]. У контрольных животных, получавших порошок из замороженных листьев нетрансформированного табака, инъекции FIX человека приводили к появлению ингибиторных антител (2–90 единиц Бетесда/мл), в то время как у мышей из опытной группы концентрация ингибитора FIX не отличалась от базового уровня. Успешное развитие иммунологической толерантности у опытных мышей подтверждалось данными по смертности в группах – 10% мышей в опытной группе и 75% мышей в контрольной группе погибли после восьми последовательных еженедельных инъекций FIX человека.

ВАРИАНТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО FIX

Поскольку традиционная терапия гемофилии В основана на применении FIX из донорской плазмы, исходный вариант рекомбинантного FIX для медицинского применения должен был как можно точнее воспроизводить структуру природного белка. Предполагалось, что точная копия природного FIX че-

ловека будет обладать сравнимой клинической эффективностью и не будет вызывать иммунный ответ у больных. В то же время существующая заместительная терапия гемофилии В требует очень частых внутривенных введений и больших количеств дорогих препаратов FIX. Модификации молекулы FIX, позволяющие увеличить удельную прокоагулянтную активность или стабильность FIX в кровотоке, могут быть полезны для пациентов и снизить нагрузку на медицинский персонал.

Удельную прокоагулянтную активность FIX можно увеличить в 3 раза при помощи точечной замены остатка аргинина на остаток аланина (Arg338Ala) [65]. Стабильность теназного комплекса при этом остается неизменной. Замена двух аминокислотных остатков и двух коротких петель в домене сериновой протеазы FIX на гомологичные участки фактора X позволяет получить химерный белок, обладающий очень высокой протеолитической активностью и типичной для фактора X субстратной специфичностью [66]. Аналогичные свойства наблюдаются у FIX, содержащего только три замены – Tyr94Phe, Lys98Thr и Tyr177Thr [67]. Удельная прокоагулянтная активность таких химерных вариантов FIX в тестах *in vitro* и *in vivo* не определена.

Модификации FIX, позволяющие его активированной форме активировать фактор X в отсутствие природного кофактора VIIIa, могут использоваться в терапии гемофилии А вместо препаратов фактора VIII. Модифицированный таким образом FIX, в отличие от фактора VIII, может применяться и при ингибиторной форме гемофилии А. Введение мышам с нокаутом гена фактора VIII генотерапевтической плазмиды, кодирующей мутеин FIX с тройной заменой – Val181Ile, Lys265Thr, Ile383Val, приводило к улучшению показателей свертываемости крови [68], что указывает на возможность восстановления функции гемостаза при гемофилии А без использования препаратов фактора VIII.

Фармакокинетические свойства FIX можно улучшить при помощи FIX, слитого в рамке с долгоживущими белками плазмы крови, или путем конъюгации FIX с гидрофильными полимерами. Слитные белки, состоящие из FIX и сывороточного альбумина человека (HSA), получили, соединив С-концевой аминокислотный остаток FIX и N-концевой остаток в молекуле зрелого HSA нерасщепляемым линкерным пептидом или линкерным пептидом, отделяемым от молекулы FIX при его активации фактором XIa [69]. Были использованы неотщепляемые линкерные пептиды $(G)_6V$ и $SS(GGS)_6GS$ и отщепляемые пептидные линкеры, составленные из участков 136–154 или 137–154 FIX, окружающих N-концевой сайт отщепления активационного пептида FIX.

При активации слитных белков с неотщепляемыми линкерными пептидами домен HSA оставался прикрепленным к С-концу FIXа, а при активации слитных белков с отщепляемыми линкерными пептидами происходило образование свободной молекулы FIXа, содержащей несколько дополнительных аминокислотных остатков на С-конце молекулы. Этот остаточный пептид соответствовал последним аминокислотным остаткам второго ЭФР-подобного домена FIX (рис. 3А). Специфическая прокоагулянтная активность слитного белка с отщепляемым линкером была в 10–30 раз выше, чем у белка с неотщепляемым линкером, этот вариант отличался также существенным увеличением времени полувыведения из кровотока (по сравнению с интактным FIX) и достаточной эффективностью при коррекции времени прекращения кровотечения у мышей с генотипом FIX(-/-).

Слитные белки, содержащие фрагмент Fc иммуноглобулина G, могут обратимо связываться неонатальными Fc-рецепторами (FcRn) – гетеродимерами β-2-микроглобулина и тяжелой цепи МНС класса I-подобного белка. Рецепторы FcRn защищают молекулы иммуноглобулинов G, содержащих домен Fc, от катаболического распада путем обратимого связывания на поверхности эндотелиальных клеток [70].

Слитный белок, состоящий из FIX и Fc-фрагмента, получен с использованием клеточной линии НЕК-293Н и выделен в виде ковалентного гетеродимера FIX-Fc и свободного Fc-фрагмента (рис. 3Б). Он обладал приемлемой удельной прокоагулянтной активностью (около 50 МЕ/мг) и в опытах на различных животных моделях показал существенно увеличенное время полувыведения [44]. У низших приматов время полувыведения слитного белка из плазмы составило 47.3 ± 9.1 ч против 12.7 ч у интактного FIX. Аналогичное трехкратное увеличение периода полувыведения зафиксировано в ходе I/II фазы клинических испытаний [71].

Специфическое присоединение активированных молекул полиэтиленгликоля (PEG) к N-связанным олигосахаридным группам FIX (рис. 2) приведет к получению конъюгата, распадающегося при активации FIX на модифицированный активационный пептид и FIXа, идентичный природной молекуле. Такой тип конъюгата, содержащий один остаток PEG длиной 40 кДа, присоединенный к N-связанному олигосахариду FIX (код N9-GP), использовали для исследований на животных моделях [72] и в клинических испытаниях в диапазоне доз 25–100 ЕД/кг. При этом период полувыведения N9-GP из плазмы больных составил 93 ч, что в 5 раз больше периода полувыведения интактного FIX [73]. Установлено также, что уровень восстановления активности FIX *in vivo* при введении N9-GP на 94% превышал уровень вос-

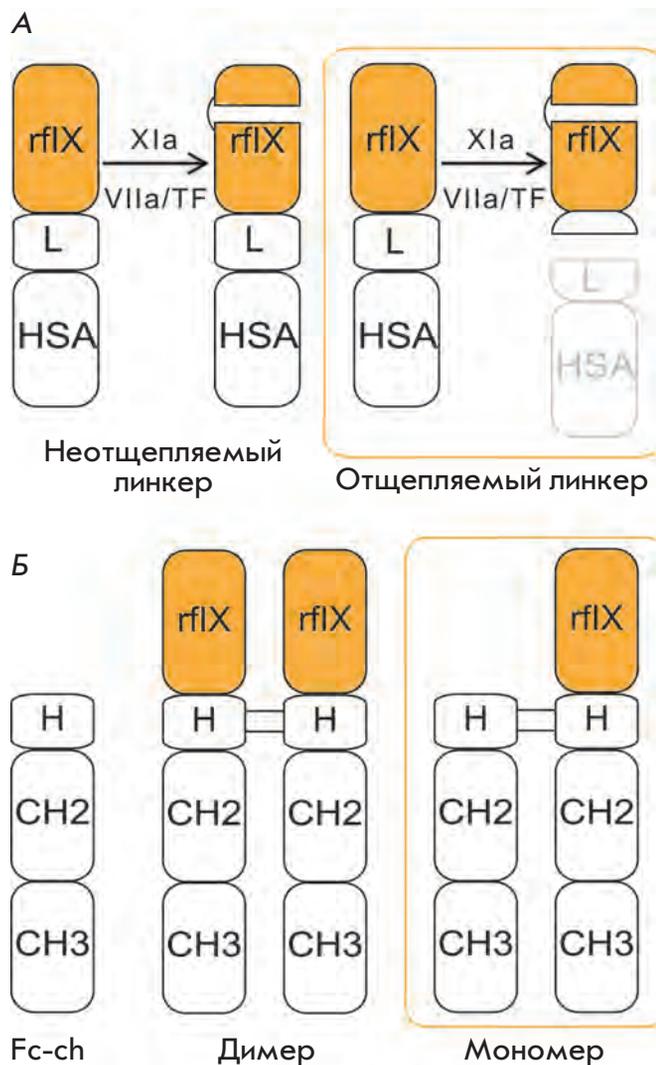


Рис. 3. Схемы слитных белков FIX. А – белок FIX–HSA, Б – белок FIX–фрагмент Fc IgG. L – линкерный пептид, Н – шарнирная область тяжелой цепи IgG, CH2 и CH3 – второй и третий константные домены тяжелой цепи IgG.

становления активности после введения интактного рекомбинантного FIX. Такое различие может быть обусловлено защитой молекулы модифицированного FIX от нежелательного взаимодействия с поверхностью эндотелиальных клеток слоем PEG или подавлением связывания N-гликанов FIX с молекулами на поверхности клеток. Другим объяснением обнаруженных различий уровня восстановления активности FIX может быть наличие полностью сиазированных N-гликанов в составе конъюгата N9-GP.

Пролонгация действия FIX может достигаться различными методами инкапсуляции, обеспечивающими

постепенное высвобождение белка в кровотоки. С этой целью могут использоваться биоразлагаемые полимеры, липосомы и т.д., однако подробное описание этой области исследований выходит за рамки данного обзора. Весьма необычный метод инкапсуляции FIX применили недавно в ходе клинических исследований [74]. Эритроциты были смешаны с раствором FIX *ex vivo*, подвергнуты осмотическому шоку, приводящему к перемещению части FIX внутрь клеток, и введены обратно в кровоток больного. В результате наблюдали медленное высвобождение FIX из лизирующихся реинъецированных остатков эритроцитов.

ГЕНОТЕРАПИЯ ГЕМОФИЛИИ В

Параллельно с развитием технологий получения рекомбинантного белка в терапии гемофилии В разрабатывались и стратегии генной терапии. Заместительная терапия при помощи белковых препаратов FIX имеет очевидные ограничения: она не приводит к излечению болезни, в течение всей жизни у больных сохраняется риск кровотечений и хронического повреждения суставов. Среди других существенных недостатков заместительной терапии – высокая стоимость препаратов, их нехватка, короткое время полужизни фактора IX и риск возникновения нейтрализующих антител (ингибиторов) к вводимому белку FIX.

Обе формы гемофилии (А и В) являются особенно хорошими мишенями для генной терапии, поскольку они вызываются известными единичными дефектами генов. Кроме того, они имеют широкое «терапевтическое окно» – достижение 1% от нормального уровня FIX в плазме может предотвратить большинство рисков геморрагий, а увеличение концентрации фактора свертывания до 150% также не приводит к побочным эффектам.

В случае генной терапии терапевтический уровень FIX обычно определяется как 5–10% от нормального уровня FIX в плазме. Такой уровень позволит избежать инъекций белка FIX. Экспрессия FIX на уровне ниже терапевтического в ряде случаев достаточна для индукции иммунной толерантности у больных с ингибиторной формой заболевания.

На модельных животных была показана возможность невирусной доставки гена *FIX in vivo* при помощи «голой» плазмидной ДНК. Одной гидродинамической инъекции экспрессионной плазмиды, содержащей кДНК *FIX* и гепатоцит-специфичную регуляторную область ДНК, было достаточно для поддержания терапевтического уровня FIX в FIX-дефицитных мышцах в течение 210 дней [75]. Процедура гидродинамической инъекции в данной работе сводилась к введению 50 мкг плазмиды в 2 мл

раствора в течение 5–8 с в хвостовую вену. Естественно, что такой метод введения не может применяться в клинической практике, поэтому клинические испытания, включающие доставку плазмид методом «гидродинамических инъекций», станут возможными только после существенных модификаций метода.

Доставка целевого гена в клетки организма может производиться с куда большей эффективностью при использовании вирусных векторов – либо на основе интегрирующихся в геном клетки-хозяина ретровирусов и лентивирусов, либо преимущественно эписомально персистирующих аденовирусов и аденоассоциированных вирусов.

Первые векторные системы для генетической терапии базировались на ретровирусах. Ретровирусные частицы, содержащие кДНК *FIX*, использовали для *ex vivo* трансдукции фибробластов модельных животных с последующей реимплантацией модифицированных клеток, что приводило к появлению детектируемых количеств FIX человека в плазме крови [76]. Экспрессия фактора IX наблюдалась лишь у очень небольшого процента животных с имплантированными трансдуцированными фибробластами, однако в опытах с кроликами эффект был стабильным в течение более чем 600 дней [77]. Была проведена фаза I клинических испытаний метода терапии гемофилии В, состоящего в реимплантации аутологичных фибробластов кожи, трансдуцированных *ex vivo* γ -ретровирусным вектором, кодирующим FIX [78], в ходе которой наблюдали транзитное умеренное увеличение уровня FIX в плазме крови двух участвовавших в исследовании пациентов.

Лентивирусные векторы, в отличие от γ -ретровирусных, способны трансдуцировать гепатоциты взрослого организма *in vivo*. Внутривенное введение лентивирусного вектора половозрелым мышам с нокаутом гена *FIX* обеспечивало достижение терапевтических уровней FIX в плазме (транзентно) [79]. Известно, что лентивирусные векторы способны эффективно трансдуцировать антигенпредставляющие клетки в селезенке, что может приводить к развитию иммунной реакции против трансгенного целевого белка, попадающего в системную циркуляцию [80]. Это нежелательное свойство лентивирусных векторов может быть подавлено при ограничении экспрессии трансгена в различных типах клеток, что достигается использованием тканеспецифических промоторов или коэкспрессией микроРНК, тканеспецифично подавляющих экспрессию трансгена. Индукция стабильной экспрессии FIX в гепатоцитах мышей путем использования гепатоцит-специфичной промоторной области и микроРНК гемопоэтических клеток miR-142-3p привела к длительному (280 дней) повышению

уровня FIX (до 10% от нормального) у мышей с моделью гемофилии В [81]. Все опытные животные выжили после отсечения хвоста, ни у одного из животных не наблюдалось появления антител к FIX.

Экспрессию FIX можно ограничить гемопоэтическими клетками, чтобы обеспечить лучшее поступление целевого белка к местам его действия. Lentivirальные конструкции с промотором интегрин альфа-IIb, избирательно экспрессируемые в мегакариоцитах, показали обнадеживающие результаты на мышинной модели гемофилии В – FIX накапливался в α -гранулах тромбоцитов и высвобождался после их активации [82], фенотипическая коррекция гемофилии В подтверждена 100% выживаемостью мышей после отсечения хвоста.

Использование векторов на основе интегрирующихся вирусов, в том числе ретро- и лентивирусов, ограничивается риском инсерционного мутагенеза и активации онкогенов при интеграции вектора [80], поэтому эписомально реплицирующиеся векторы, кодирующие FIX, потенциально более безопасны и привлекают большее внимание исследователей. Аденовирусные векторы высокой емкости (HCAV), способные к долговременной эписомальной репликации и не кодирующие белки вируса, обычно вызывают сильно уменьшенный иммунный ответ. Применение тканеспецифических промоторов для ограничения типов клеток, экспрессирующих целевой ген, может еще больше уменьшить иммунный ответ, что потенциально позволяет продлить период активной экспрессии трансдуцированного целевого гена [83]. HCAV со специфичным для клеток печени промотором позволил получить терапевтически значимый уровень экспрессии FIX на моделях гемофилии В у мышей [84] и собак [85, 86] при небольшом уровне острой токсичности вектора, однако во всех случаях уровень экспрессии трансгена со временем постепенно снижался. При введении высоких доз вектора у животных наблюдалось возникновение ингибиторных антител к FIX, гематологическая и печеночная токсичность [86], что ограничивало период экспрессии трансгена у собак 446–604 днями.

Непатогенные, неспособные к самостоятельной репликации и интегрирующиеся в геном с низкой вероятностью векторы на основе аденоассоциированных вирусов считаются перспективными для доставки генов длиной не более 4.7 т.п.н. [87]. Разработан процесс производства генотерапевтических частиц аденоассоциированных вирусов, соответствующий правилам надлежащей производственной практики (GMP) [88]. Как правило, такие векторы вводят при помощи внутримышечной инъекции или инфузии в портальную вену. Такие способы введения обеспечивают преимуще-

ственную трансдукцию клеток скелетной мускулатуры или гепатоцитов.

При внутримышечной инъекции аденоассоциированных вирусных частиц AAV2-FIX собакам с гемофилией В, вызванной миссенс-мутацией, достигалась долговременная экспрессия FIX [89]. Показано, что появление ингибиторных антител зависит от природы дефекта гена *FIX* – у собак с миссенс-мутацией ингибиторные антитела не возникали [89], тогда как у собак с нонсенс-мутацией или нестабильной мРНК *FIX* отмечен значительный уровень таких антител [90], а также наблюдалась положительная корреляция между частотой развития иммунного ответа и дозой вектора [91]. Вследствие этого для клинических испытаний AAV2-FIX, вводимого путем внутримышечных инъекций, привлекали больных с миссенс-мутациями в гене *FIX* и использовали низкую дозу AAV2-FIX для каждого места инъекции [92–94]. Подобный вид терапии был безопасным для больных, однако уровни экспрессии FIX при этом не достигали терапевтически значимых величин.

Долговременная экспрессия FIX, не сопровождающаяся возникновением ингибиторных антител, получена у здоровых мышей и в мышинной модели гемофилии В, а также у собак и низших приматов при применении более инвазивной процедуры – направленного введения частиц аденоассоциированного вируса в печень [87, 95–99]. При доставке AAV2-FIX в печень собак с гемофилией В, вызванной нулевой мутацией (при которой часто появляются ингибиторные антитела к FIX), удалось добиться долговременной коррекции проявлений гемофилии (8 лет наблюдения) и не наблюдалось появления ингибиторных антител [100].

Проведены клинические испытания (фаза I) эффективности внутривенной инфузии векторов на основе AAV2, кодирующих FIX под контролем гепатоспецифичного промотора [101]. Уровень экспрессии трансдуцированного FIX достигал 10% от физиологической нормы, однако период экспрессии трансгена не превышал 6 нед., что, вероятно, объясняется развитием иммунной реакции на компоненты вирусного капсида. Предполагается, что быстрая элиминация трансдуцированных вирусов обусловлена наличием у больных иммунитета к аденоассоциированным вирусам типа 2 дикого типа, довольно распространенным в популяции [101, 102].

Другие серотипы аденоассоциированного вируса, а именно типы 8 и 9, имеющие тропизм к печени и менее распространенные в человеческой популяции [103], были проверены на модельных животных. Аденоассоциированный вирус типа 8 оказался более эффективным носителем гена *FIX*, чем вирус типа 2 у модельных мышей и собак [104, 105], и показал

длительную (до 5 лет) безопасность и эффективность у низших приматов (не человекообразных) [106]. В последнем случае терапевтически значимый уровень трансдуцированного FIX сохранялся постоянным у животных из группы с оптимальной дозой введенного вектора. Проведены клинические испытания фазы I AAV8-FIX, доставляемого к печени инфузией через периферические вены. Ожидаемые иммунные реакции больных были подавлены при помощи курсовой терапии уменьшающимися дозами преднизолона (несколько недель), у шести человек получены стабильные уровни экспрессии FIX от 1 до 8% от физиологической нормы [107]. У четырех больных заместительная терапия FIX была прекращена, у двоих – значительно сокращена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многочисленные усилия исследователей, основой терапии гемофилии В остается заместительная терапия препаратами рекомбинантного

или полученного из донорской плазмы фактора IX. Модификация молекулы FIX при помощи добавления к FIX слитых с ним в рамке считывания доменов белков или конъюгация FIX с PEG может снизить частоту введения препаратов, но, скорее всего, не изменит стоимость и общую безопасность заместительной терапии. Генотерапия гемофилии В, проводимая при помощи вирусных векторов, несущих кДНК *FIX*, весьма перспективна для значительной части больных. Предположительно, большинство больных гемофилией В смогут сократить частоту и интенсивность заместительной терапии препаратами FIX, а некоторая часть больных – полностью отказаться от инъекций FIX. Можно ожидать, что простое увеличение производства рекомбинантного FIX, реализованное как выпуск в обращение препаратов-аналогов, получаемых при помощи все более продуктивных клеточных линий и трансгенных животных, существенно улучшит качество жизни больных гемофилией В уже в ближайшие годы. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhong D., Bajaj M.S., Schmidt A.E., Bajaj S.P. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 5. P. 3622–3631.
- Wright I.S. // *Can. Med. Assoc. J.* 1962. V. 86. P. 373–374.
- Howard E.L., Becker K.C., Rusconi C.P., Becker R.C. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27. № 4. P. 722–727.
- Green P.M., Giannelli F., Sommer S.S., Poon M.-C., Ludwig M., Schwaab R., Reitsma P.H., Goossens M., Yoshioka A., Figueiredo M.S., et al. The Haemophilia B Mutation Database – version 13. 2004; <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>.
- Rogaev E.I., Grigorenko A.P., Faskhutdinova G., Kittler E.L., Moliaka Y.K. // *Science.* 2009. V. 326. № 5954. P. 817.
- Reitsma P.H., Bertina R.M., Ploos van Amstel J.K., Riemens A., Briet E. // *Blood.* 1988. V. 72. № 3. P. 1074–1076.
- Evatt B.L., Black C., Batorova A., Street A., Srivastava A. // *Haemophilia.* 2004. V. 10 Suppl. 4. P. 9–13.
- Tabor E. // *Transfusion.* 1999. V. 39. № 11–12. P. 1160–1168.
- Kim H.C., McMillan C.W., White G.C., Bergman G.E., Horton M.W., Saidi P. // *Blood.* 1992. V. 79. № 3. P. 568–575.
- Ludlam C.A., Powderly W.G., Bozzette S., Diamond M., Koerper M.A., Kulkarni R., Ritchie B., Siegel J., Simmonds P., Stanley S., et al. // *Lancet.* 2006. V. 367. № 9506. P. 252–261.
- Kurachi K., Davie E.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 21. P. 6461–6464.
- Anson D.S., Austen D.E., Brownlee G.G. // *Nature.* 1985. V. 315. № 6021. P. 683–685.
- de la Salle H., Altenburger W., Elkaim R., Dott K., Dieterle A., Drillien R., Cazenave J.P., Tolstoshev P., Lecocq J.P. // *Nature.* 1985. V. 316. № 6025. P. 268–270.
- Busby S., Kumar A., Joseph M., Halfpap L., Insley M., Berkner K., Kurachi K., Woodbury R. // *Nature.* 1985. V. 316. № 6025. P. 271–273.
- Kaufman R.J., Wasley L.C., Furie B.C., Furie B., Shoemaker C.B. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 21. P. 9622–9628.
- Harrison S., Adamson S., Bonam D., Brodeur S., Charlebois T., Clancy B., Costigan R., Drapeau D., Hamilton M., Hanley K., et al. // *Semin. Hematol.* 1998. V. 35. № 2 Suppl. 2. P. 4–10.
- Bush L., Webb C., Bartlett L., Burnett B. // *Semin. Hematol.* 1998. V. 35. № 2 Suppl. 2. P. 18–21.
- Lambert T., Recht M., Valentino L.A., Powell J.S., Udata C., Sullivan S.T., Roth D.A. // *Haemophilia.* 2007. V. 13. № 3. P. 233–243.
- White G., Shapiro A., Ragni M., Garzone P., Goodfellow J., Tubridy K., Courter S. // *Semin. Hematol.* 1998. V. 35. № 2 Suppl. 2. P. 33–38.
- Rup B. // *Dev. Biol. (Basel).* 2002. V. 109. P. 103–106.
- Bond M., Jankowski M., Patel H., Karnik S., Strang A., Xu B., Rouse J., Koza S., Letwin B., Steckert J., et al. // *Semin. Hematol.* 1998. V. 35. № 2 Suppl. 2. P. 11–17.
- Ewenstein B.M., Joist J.H., Shapiro A.D., Hofstra T.C., Leissing C.A., Seremetis S.V., Broder M., Mueller-Velten G., Schwartz B.A. // *Transfusion.* 2002. V. 42. № 2. P. 190–197.
- Bjorkman S. // *Haemophilia.* 2011. V. 17. № 2. P. 179–184.
- Rouse J.C., McClellan J.E., Patel H.K., Jankowski M.A., Porter T.J. // *Methods Mol. Biol.* 2005. V. 308. P. 435–460.
- Derian C.K., VanDusen W., Przysiecki C.T., Walsh P.N., Berkner K.L., Kaufman R.J., Friedman P.A. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 12. P. 6615–6618.
- Spitzer S.G., Kuppuswamy M.N., Saini R., Kasper C.K., Birktoft J.J., Bajaj S.P. // *Blood.* 1990. V. 76. № 8. P. 1530–1537.
- Rees D.J., Jones I.M., Handford P.A., Walter S.J., Esnouf M.P., Smith K.J., Brownlee G.G. // *EMBO J.* 1988. V. 7. № 7. P. 2053–2061.
- Ahmad S.S., Rawala R., Cheung W.F., Stafford D.W., Walsh P.N. // *Biochem. J.* 1995. V. 310 (Pt. 2). P. 427–431.
- Chang Y.J., Wu H.L., Hamaguchi N., Hsu Y.C., Lin S.W. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 28. P. 25393–25399.
- Larson P.J., Stanfield-Oakley S.A., VanDusen W.J., Kasper C.K., Smith K.J., Monroe D.M., High K.A. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 7. P. 3869–3876.
- Harris R.J., van Halbeek H., Glushka J., Basa L.J., Ling V.T., Smith K.J., Spellman M.W. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. № 26. P. 6539–6547.
- Agarwala K.L., Kawabata S., Takao T., Murata H., Shimomishi Y., Nishimura H., Iwanaga S. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 17. P. 5167–5171.

33. Kaufman R.J. // *Thromb. Haemost.* 1998. V. 79. № 6. P. 1068–1079.
34. Makino Y., Omichi K., Kuraya N., Ogawa H., Nishimura H., Iwanaga S., Hase S. // *J. Biochem.* 2000. V. 128. № 2. P. 175–180.
35. Bharadwaj D., Harris R.J., Kisiel W., Smith K.J. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 12. P. 6537–6542.
36. Sunnerhagen M.S., Persson E., Dahlqvist I., Drakenberg T., Stenflo J., Mayhew M., Robin M., Handford P., Tilley J.W., Campbell I.D., et al. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 31. P. 23339–23344.
37. McGrath B.M., Walsh G. *Directory of therapeutic enzymes*. N.Y.: Taylor & Francis, 2005. 312 p.
38. Dadehbeigi N., Ostad S.N., Faramarzi M.A., Ghahremani M.H. // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. № 11. P. 1909–1912.
39. De Castilho Fernandes A., Fontes A., Gonsales N., Swiech K., Picanco-Castro V., Faca S., Covas D. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2011. V. 58. № 4. P. 243–249.
40. Kim W.H., Kim J.S., Yoon Y., Lee G.M. // *J. Biotechnol.* 2009. V. 142. № 3–4. P. 275–278.
41. Lim I., Kim J.-S., Lee G., Choi M., Yoon Y. // *Cells and Culture / Ed. Noll T.* Amsterdam: Springer Netherlands, 2010. P. 613–618.
42. Wasley L.C., Rehemtulla A., Bristol J.A., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 12. P. 8458–8465.
43. Lusson J., Vieau D., Hamelin J., Day R., Chretien M., Seidah N.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 14. P. 6691–6695.
44. Peters R.T., Low S.C., Kamphaus G.D., Dumont J.A., Amari J.V., Lu Q., Zarbis-Papastoitis G., Reidy T.J., Merricks E.P., Nichols T.C., et al. // *Blood.* 2010. V. 115. № 10. P. 2057–2064.
45. Gillis S., Furie B.C., Furie B., Patel H., Huberty M.C., Switzer M., Foster W.B., Scoble H.A., Bond M.D. // *Protein Sci.* 1997. V. 6. № 1. P. 185–196.
46. Wajih N., Hutson S.M., Owen J., Wallin R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 36. P. 31603–31607.
47. McClure D.B., Walls J.D., Grinnell B.W. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 27. P. 19710–19717.
48. Bolt G., Steenstrup T.D., Kristensen C. // *Thromb. Haemost.* 2007. V. 98. № 5. P. 988–997.
49. Vatandoost J., Zomorodipour A., Sadeghizadeh M., Aliyari R., Bos M.H., Ataei F. // *Biotechnol. Prog.* 2012. V. 28. № 1. P. 45–51.
50. Clark A.J., Ali S., Archibald A.L., Bessos H., Brown P., Harris S., McClenaghan M., Prowse C., Simons J.P., Whitelaw C.B., et al. // *Genome.* 1989. V. 31. № 2. P. 950–955.
51. Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K.H. // *Science.* 1997. V. 278. № 5346. P. 2130–2133.
52. Zhang K., Wang H., Bao Y., Lu D., Xue J., Qiu X., Huang S., Huang Y., Li B., Li H., et al. // *Chinese Sci. Bull.* 1997. V. 42. № 15. P. 1308–1313.
53. Yull F., Harold G., Wallace R., Cowper A., Percy J., Cottingham I., Clark A.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 24. P. 10899–10903.
54. van Cott K.E., Butler S.P., Russell C.G., Subramanian A., Lubon H., Gwazdauskas F.C., Knight J., Drohan W.N., Velandier W.H. // *Genet. Anal.* 1999. V. 15. № 3–5. P. 155–160.
55. Lindsay M., Gil G.C., Cadiz A., Velandier W.H., Zhang C., van Cott K.E. // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1026. № 1–2. P. 149–157.
56. Gil G.C., Velandier W.H., van Cott K.E. // *Glycobiology.* 2008. V. 18. № 7. P. 526–539.
57. Edmunds T., van Patten S.M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J.M., et al. // *Blood.* 1998. V. 91. № 12. P. 4561–4571.
58. Dove A. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 10. P. 1045–1048.
59. Panno J. *Animal Cloning: The Science of Nuclear Transfer*. N.Y.: Facts on File, 2004. 176 p.
60. Gomord V., Faye L. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. V. 7. № 2. P. 171–181.
61. Zhang H., Zhao L., Chen Y., Cui L., Ren W., Tang K. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2007. V. 48. Pt 2. P. 101–107.
62. Cunha N.B., Murad A.M., Ramos G.L., Maranhao A.Q., Brigido M.M., Araujo A.C., Lacorte C., Aragao F.J., Covas D.T., Fontes A.M., et al. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. № 4. P. 841–855.
63. DiMichele D. // *Br. J. Haematol.* 2007. V. 138. № 3. P. 305–315.
64. Verma D., Moghimi B., LoDuca P.A., Singh H.D., Hoffman B.E., Herzog R.W., Daniell H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 15. P. 7101–7106.
65. Chang J., Jin J., Lollar P., Bode W., Brandstetter H., Hamaguchi N., Straight D.L., Stafford D.W. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 20. P. 12089–12094.
66. Hopfner K.P., Brandstetter H., Karcher A., Kopetzki E., Huber R., Engh R.A., Bode W. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 22. P. 6626–6635.
67. Sichler K., Kopetzki E., Huber R., Bode W., Hopfner K.P., Brandstetter H. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 6. P. 4121–4126.
68. Milanov P., Ivanciu L., Abriss D., Quade-Lysson P., Miesbach W., Alesci S., Tonn T., Grez M., Seifried E., Schuttrumpf J. // *Blood.* 2012. V. 119. № 2. P. 602–611.
69. Metzner H.J., Weimer T., Kronthaler U., Lang W., Schulte S. // *Thromb. Haemost.* 2009. V. 102. № 4. P. 634–644.
70. Dumont J.A., Low S.C., Peters R.T., Bitonti A.J. // *BioDrugs.* 2006. V. 20. № 3. P. 151–160.
71. Shapiro A.D., Ragni M., Valentino L.A., Key N.S., Josephson N., Powell J., Cheng G., Tubridy K.L., Peters R., Dumont J., et al. // *Haemophilia.* 2010. V. 16. № Suppl. s4. P. 1–158.
72. Ostergaard H., Bjelke J.R., Hansen L., Petersen L.C., Pedersen A.A., Elm T., Moller F., Hermit M.B., Holm P.K., Krogh T.N., et al. // *Blood.* 2011. V. 118. № 8. P. 2333–2341.
73. Negrier C., Knoke K., Tiede A., Giangrande P., Moss J. // *Blood.* 2011. V. 118. № 10. P. 2695–2701.
74. Sinauridze E.I., Vuimo T.A., Kulikova E.V., Shmyrev I.I., Ataulakhanov F.I. // *Med. Sci. Monit.* 2010. V. 16. № 10. P. P119–26.
75. Kim H.S., Kim J.C., Lee Y.K., Kim J.S., Park Y.S. // *J. Gene Med.* 2011. V. 13. № 7–8. P. 365–372.
76. Palmer T.D., Thompson A.R., Miller A.D. // *Blood.* 1989. V. 73. № 2. P. 438–445.
77. Chen L., Nelson D.M., Zheng Z., Morgan R.A. // *Hum. Gene Ther.* 1998. V. 9. № 16. P. 2341–2351.
78. Qiu X., Lu D., Zhou J., Wang J., Yang J., Meng P., Hsueh J.L. // *Chin. Med. J. (Engl.)* 1996. V. 109. № 11. P. 832–839.
79. Tsui L.V., Kelly M., Zayek N., Rojas V., Ho K., Ge Y., Moskalenko M., Mondesire J., Davis J., Roey M.V., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 1. P. 53–57.
80. Petrus I., Chuah M., van den Driessche T. // *J. Gene Med.* 2010. V. 12. № 10. P. 797–809.
81. Brown B.D., Cantore A., Annoni A., Sergi L.S., Lombardo A., Della Valle P., D'Angelo A., Naldini L. // *Blood.* 2007. V. 110. № 13. P. 4144–4152.
82. Zhang G., Shi Q., Fahs S.A., Kuether E.L., Walsh C.E., Montgomery R.R. // *Blood.* V. 116. № 8. P. 1235–1243.
83. Pastore L., Morral N., Zhou H., Garcia R., Parks R.J., Kochanek S., Graham F.L., Lee B., Beaudet A.L. // *Hum. Gene Ther.* 1999. V. 10. № 11. P. 1773–1781.
84. Ehrhardt A., Kay M.A. // *Blood.* 2002. V. 99. № 11. P. 3923–3930.
85. Ehrhardt A., Xu H., Dillow A.M., Bellinger D.A., Nichols T.C., Kay M.A. // *Blood.* 2003. V. 102. № 7. P. 2403–2411.

86. Brunetti-Pierri N., Nichols T.C., McCorquodale S., Merricks E., Palmer D.J., Beaudet A.L., Ng P. // *Hum. Gene Ther.* 2005. V. 16. № 7. P. 811–820.
87. Snyder R.O., Miao C.H., Patijn G.A., Spratt S.K., Danos O., Nagy D., Gown A.M., Winther B., Meuse L., Cohen L.K., et al. // *Nat. Genet.* 1997. V. 16. № 3. P. 270–276.
88. Allay J.A., Sleep S., Long S., Tillman D.M., Clark R., Carney G., Fagone P., McIntosh J.H., Nienhuis A.W., Davidoff A.M., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2011. V. 22. № 5. P. 595–604.
89. Herzog R.W., Yang E.Y., Couto L.B., Hagstrom J.N., Elwell D., Fields P.A., Burton M., Bellinger D.A., Read M.S., Brinkhous K.M., et al. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 1. P. 56–63.
90. Herzog R.W., Mount J.D., Arruda V.R., High K.A., Lothrop C.D., Jr. // *Mol. Ther.* 2001. V. 4. № 3. P. 192–200.
91. Herzog R.W., Fields P.A., Arruda V.R., Brubaker J.O., Armstrong E., McClintock D., Bellinger D.A., Couto L.B., Nichols T.C., High K.A. // *Hum. Gene Ther.* 2002. V. 13. № 11. P. 1281–1291.
92. Kay M.A., Manno C.S., Ragni M.V., Larson P.J., Couto L.B., McClelland A., Glader B., Chew A.J., Tai S.J., Herzog R.W., et al. // *Nat. Genet.* 2000. V. 24. № 3. P. 257–261.
93. Manno C.S., Chew A.J., Hutchison S., Larson P.J., Herzog R.W., Arruda V.R., Tai S.J., Ragni M.V., Thompson A., Ozelo M., et al. // *Blood.* 2003. V. 101. № 8. P. 2963–2972.
94. Jiang H., Pierce G.F., Ozelo M.C., de Paula E.V., Vargas J.A., Smith P., Sommer J., Luk A., Manno C.S., High K.A., et al. // *Mol. Ther.* 2006. V. 14. № 3. P. 452–455.
95. Snyder R.O., Miao C., Meuse L., Tubb J., Donahue B.A., Lin H.F., Stafford D.W., Patel S., Thompson A.R., Nichols T., et al. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 1. P. 64–70.
96. Nathwani A.C., Davidoff A.M., Hanawa H., Hu Y., Hoffer F.A., Nikanorov A., Slaughter C., Ng C.Y., Zhou J., Lozier J.N., et al. // *Blood.* 2002. V. 100. № 5. P. 1662–1669.
97. Mount J.D., Herzog R.W., Tillson D.M., Goodman S.A., Robinson N., McClelland M.L., Bellinger D., Nichols T.C., Arruda V.R., Lothrop C.D., Jr., et al. // *Blood.* 2002. V. 99. № 8. P. 2670–2676.
98. Wang L., Nichols T.C., Read M.S., Bellinger D.A., Verma I.M. // *Mol. Ther.* 2000. V. 1. № 2. P. 154–158.
99. Wang L., Takabe K., Bidlingmaier S.M., Ill C.R., Verma I.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 7. P. 3906–3910.
100. Niemeyer G.P., Herzog R.W., Mount J., Arruda V.R., Tillson D.M., Hathcock J., van Ginkel F.W., High K.A., Lothrop C.D., Jr. // *Blood.* 2009. V. 113. № 4. P. 797–806.
101. Manno C.S., Pierce G.F., Arruda V.R., Glader B., Ragni M., Rasko J.J., Ozelo M.C., Hoots K., Blatt P., Konkle B., et al. // *Nat. Med.* 2006. V. 12. № 3. P. 342–347.
102. Mingozzi F., Maus M.V., Hui D.J., Sabatino D.E., Murphy S.L., Rasko J.E., Ragni M.V., Manno C.S., Sommer J., Jiang H., et al. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. № 4. P. 419–422.
103. van den Driessche T., Thorrez L., Acosta-Sanchez A., Petrus I., Wang L., Ma L., Waelle D.E., Iwasaki Y., Gillijns V., Wilson J.M., et al. // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. № 1. P. 16–24.
104. Cooper M., Nayak S., Hoffman B.E., Terhorst C., Cao O., Herzog R.W. // *Hum. Gene Ther.* 2009. V. 20. № 7. P. 767–776.
105. Wang L., Calcedo R., Nichols T.C., Bellinger D.A., Dillow A., Verma I.M., Wilson J.M. // *Blood.* 2005. V. 105. № 8. P. 3079–3086.
106. Nathwani A.C., Rosales C., McIntosh J., Rastegarlar G., Nathwani D., Raj D., Nawathe S., Waddington S.N., Bronson R., Jackson S., et al. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 5. P. 876–885.
107. Nathwani A.C., Tuddenham E.G., Rangarajan S., Rosales C., McIntosh J., Linch D.C., Chowdary P., Riddell A., Pie A.J., Harrington C., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2011. V. 365. № 25. P. 2357–2365.

УДК 577.21

Участие гена *TGFB1* в формировании предрасположенности к инфаркту миокарда

Р. М. Барсова^{1,2}, Б. В. Титов^{1,2}, Н. А. Матвеева^{1,2}, А. В. Фаворов^{3,4}, И. Н. Рыбалкин²,
Т. Н. Власик², Э. М. Тарарак², Т. С. Сухина², Р. М. Шахнович², М. Я. Руда²,
О. О. Фаворова^{1,2*}

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития Российской Федерации, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

²Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития Российской Федерации, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

⁴Oncology Biostatistics and Bioinformatics, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205, US

*E-mail: olga_favorova@mail.ru

Поступила в редакцию 10.02.2012 г.

РЕФЕРАТ Проведен анализ частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфных участков (SNP) $-509C>T$ (rs1800469), $869T>C$ (rs1982073), $915G>C$ (rs1800471) гена трансформирующего фактора роста бета 1 (*TGFB1*), влияющих на уровень продукции цитокина TGF- β 1, у больных инфарктом миокарда (ИМ) (406 человек) и в контрольной группе (198 человек), все русские по этнической принадлежности. Наблюдалась значимая позитивную ассоциацию частот носительства аллеля *TGFB1** $-509T$ ($p = 0.046$, ОШ = 1.45, 95% ДИ: 1.02–2.06) и генотипов *TGFB1** $869T/T$ ($p = 0.0024$, ОШ = 1.75, 95% ДИ: 1.22–2.51) и *TGFB1** $915G/G$ ($p = 0.048$, ОШ = 1.76, 95% ДИ: 1.05–2.97) с ИМ. Анализ неравновесия по сцеплению между этими SNP показал, что выявленные ассоциации можно рассматривать как не зависящие друг от друга. Комплексный анализ ассоциации ИМ с носительством сочетаний аллелей/генотипов указанных SNP свидетельствует о кумулятивных эффектах этих SNP. При анализе предрасположенности к раннему ИМ (≤ 50 лет) обнаружена позитивная ассоциация аллеля *TGFB1** $-509T$ ($p = 0.002$, ОШ = 2.24, 95% ДИ: 1.35–3.71) и генотипа *TGFB1** $869T/T$ ($p = 0.008$, ОШ = 1.93, 95% ДИ: 1.18–3.15), а также аддитивность их вкладов. Анализ предрасположенности к повторным ИМ выявил ассоциацию генотипа *TGFB1** $-509T/T$ ($p = 0.0078$, ОШ = 2.60, 95% ДИ: 1.28–5.28). Полученные результаты свидетельствуют о важной роли гена *TGFB1* в формировании предрасположенности к ИМ, в том числе к раннему и повторным ИМ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА инфаркт миокарда, русские, гены, аллельный полиморфизм, трансформирующий фактор роста β 1, *TGFB1*, APSampler.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ dNTP – дезоксирибонуклеозидтрифосфат; LD – неравновесное сцепление; SD – стандартное отклонение; SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism); TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста бета 1; *TGFB1* – ген TGF- β 1; ДИ – доверительный интервал; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИМ – инфаркт миокарда; ОШ – отношение шансов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-SSP – ПЦР с применением аллель-специфических праймеров; ср. возраст – средний возраст; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания.

ВВЕДЕНИЕ

Абсолютное большинство сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) представляет собой комплексные полигенные заболевания. К настоящему времени выявлено множество генетических маркеров ССЗ, среди которых особое место занимают гены, кодирующие

белки, вовлеченные в атеросклеротический процесс. Это справедливо и для ишемической болезни сердца (ИБС), одной из форм которой является инфаркт миокарда (ИМ). Среди этих маркеров можно выделить ген *TGFB1*, продукт которого – трансформирующий фактор роста бета 1, входит в суперсемейство

цитокинов TGF- β и выполняет как проатерогенную, так и антиатерогенную функцию. Особый интерес представляют три однонуклеотидных полиморфизма (SNP) этого гена: rs1800469 (SNP -509C>T) в промоторной области, rs1982073 (SNP 869T>C, Leu10Pro) и rs1800471 (SNP 915G>C, Arg25Pro) в сигнальной последовательности (экзон 1) [1]. Все исследованные полиморфизмы влияют на уровень продукции TGF- β 1; по данным [2–4], аллель T SNP -509C>T, аллель T SNP 869T>C и генотип G/G SNP 915G>C связаны с более высоким уровнем белка в плазме крови.

Анализу ассоциаций названных полиморфных участков с развитием ИБС и ИМ посвящен ряд работ, в одних из которых ассоциации были выявлены [1, 5, 6], а в других – нет.

Поскольку, как это было окончательно доказано в последние годы, генетическая предрасположенность ко многим полигенным заболеваниям отличается в различных этнических группах, исследования необходимо проводить в этнически гомогенных популяциях. У этнических русских ассоциации SNP 869T>C и 915G>C гена *TGFB1* с развитием ИМ и других ССЗ не исследовали. Ранее на относительно небольших выборках мы наблюдали позитивную ассоциацию аллеля *TGFB1**-509T с развитием ИМ в составе сочетаний с аллелями/генотипами других генов системы воспаления, а также участие «альтернативного аллеля» -509*С в протективных сочетаниях [7]. В настоящей работе на выборке более чем из 400 русских больных проведен поиск ассоциации полиморфизмов rs1800469 (SNP -509C>T), rs1982073 (SNP 869T>C, Leu10Pro) и rs1800471 (SNP 915G>C, Arg25Pro) гена *TGFB1* с развитием ИМ, а также анализ их гаплотипов у здоровых индивидов. Анализировали распределение аллелей и генотипов данных полиморфных участков, сравнивая разные возрастные группы больных и здоровых, а также группы больных, перенесших первый и повторный(е) ИМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования методом «случай-контроль» использовали образцы из коллекции крови и геномной ДНК 406 больных ИМ, русских по этнической принадлежности, средний возраст (ср. возраст) \pm стандартное отклонение (SD) – 57.5 \pm 12.8 лет. Из них 272 мужчины (ср. возраст – 53.4 \pm 11.9 лет) и 134 женщины (ср. возраст – 65.6 \pm 10.3 лет). Контрольная группа состояла из 198 лиц, русских, без ССЗ в анамнезе, ср. возраст – 59.8 \pm 13.3 лет. Из них 112 мужчин (ср. возраст – 57.1 \pm 11.9 лет) и 86 женщин (ср. возраст – 63.2 \pm 14.2 лет).

Диагноз ИМ ставили на основании критериев АНА/ESC 2001 г. Лица контрольной группы прохо-

дили обследование для исключения ИБС. От всех больных или их родственников, а также индивидов контрольной группы получено информированное согласие на проведение исследования.

ДНК выделяли из периферической крови с помощью модифицированного метода с использованием экстракции смесью фенол-хлороформ [8].

Полиморфные участки гена *TGFB1* анализировали методом ПЦР-SSP. Фрагмент ДНК длиной 283 п.н., содержащий SNP 869T>C, амплифицировали с использованием аллель-специфических праймеров: 5'-AGCAGCGGTAGCAGCAGCA-3' (SSP T), 5'-GCAGCGGTAGCAGCAGCG-3' (SSP C) и общего праймера 5'-CTACCTTTTGCCGGGAGACC-3'. В случае SNP 915G>C амплифицировали фрагмент ДНК длиной 125 п.н. с использованием аллель-специфических праймеров: 5'-TG GTGCTGACGCCTGGCCG-3' (SSP G), 5'-TG GTGCTGACGCCTGGCCC-3' (SSP C) и общего праймера 5'-GGCGAGCCGCAGCTTGGACA-3'. Все праймеры сконструированы с помощью пакетов программ Vector NTI 7.1 и Primo [9]. Амплификационная смесь (10 мкл) содержала 70 мМ Трис-НСl (рН 9.0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 1.0 мМ MgCl₂, 0.025% Твин-20, 0.025% NP-40, по 5 пмоль каждого праймера, 0.2 мМ dNTP, 0.5 ед. Taq-полимеразы и 100–200 нг ДНК, минеральное масло. Программа амплификации: 95°C, 5 мин. Затем 10 циклов: 95°C – 1 мин, 64°C – 1 мин, 72°C – 1 мин; и 20 циклов: 95°C – 30 с, 58°C – 50 с, 72°C – 50 с. ПЦР проводили в амплификаторе MC16 (ООО «ДНК-технология», Россия). Присутствие продуктов амплификации проверяли электрофорезом в 2% агарозном геле в присутствии бромида этидия. SNP -509C>T анализировали как описано в [7].

Статистический анализ

Анализ отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга и неравновесия по сцеплению (LD) проводили с использованием свободно распространяемой программы Haploview 4.0 [10]. Частоты носительства аллелей и генотипов отдельных SNP в различных группах сравнивали с помощью точного двустороннего критерия Фишера с использованием онлайн-версии программы GraphPad InStat [11]. Для выявления значимой связи с ИМ носительства сочетаний аллелей/генотипов исследуемых полиморфных участков гена *TGFB1* применяли программное обеспечение APSampler [12, 13], оценивая значимость ассоциации каждого найденного основным алгоритмом сочетания по значению точного одностороннего критерия Фишера. Значимым считали различие сравниваемых частот при $p \leq 0.05$.

Ассоциация инфаркта миокарда с носительством сочетаний аллелей/генотипов трех SNP гена *TGFB1*

SNP гена <i>TGFB1</i> *			Носители (%) / неносители (%) сочетания		Значение <i>p</i> при сравнении частот**	ОШ (95% ДИ) для значимых различий
-509C>T	869T>C	915G>C	Пациенты (N = 397)	Контрольная группа (N = 198)		
Предрасполагающие сочетания						
T	T/T	G	116 (29.2)/281 (70.8)	33 (16.7)/165 (83.3)	0.00048	2.06 (1.34–3.18)
T	T/T	-	116 (29.2)/281 (70.8)	33 (16.7)/165 (83.3)	0.00048	2.06 (1.34–3.18)
-	T/T	G	181 (45.6)/216 (54.4)	64 (32.3)/134 (67.7)	0.0012	1.75 (1.23–2.51)
T	-	G	273 (67.2)/ 133 (32.8)	116 (58.6)/ 82 (41.4)	0.023	1.45 (1.02–2.06)
Протективные сочетания						
C	C	C	17 (4.3)/380 (95.7)	23 (11.6)/175 (88.4)	0.00097	0.34 (0.18–0.65)
-	C	C	20 (5.0)/377 (95.0)	23 (11.6)/175 (88.4)	0.0036	0.40 (0.22–0.75)
C	-	C	31 (7.8)/375 (92.2)	29 (14.6)/169 (85.4)	0.0061	0.48 (0.28–0.83)
C	C	-	190 (47.9)/207 (52.1)	117 (59.1)/81 (40.9)	0.0062	0.64 (0.45–0.90)

*Для каждого из трех SNP аллель (генотип) риска показан на более темном цветном фоне, чем протективный аллель.
 **Представлены в порядке убывания уровня значимости для предрасполагающих и протективных сочетаний по отдельности.

Оценивая отношения шансов (ОШ) и их 95% доверительный интервал (ДИ), исключали из числа статистически значимых ассоциаций те, для которых ДИ пересекал 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено геномное типирование полиморфных участков -509C>T, 869T>C и 915G>C гена *TGFB1* у больных ИМ и индивидов без ССЗ в анамнезе (все русские по этнической принадлежности) с последующим анализом возможной ассоциации этих полиморфизмов с развитием ИМ. Не наблюдали отклонений в распределении аллелей и генотипов этих полиморфизмов от равновесия Харди-Вайнберга в контрольной группе. В группе больных равновесие Харди-Вайнберга соблюдалось для SNP 869T>C и 915G>C, но не для -509C>T ($p = 0.0007$).

Частоты носительства аллелей и генотипов гена *TGFB1* у пациентов с ИМ и в контрольной группе приведены на рис. 1. Среди больных значимо чаще, чем в контрольной группе, встречались носители ал-

леля *TGFB1**-509T (в составе генотипов T/T и C/T) ($p = 0.046$, ОШ = 1.45, 95% ДИ: 1.02–2.06) и реже – генотипа *TGFB1**-509C/C ($p = 0.046$, ОШ = 0.69, 95% ДИ: 0.49–0.98). Кроме того, у них чаще встречались генотипы *TGFB1**869T/T ($p = 0.0024$, ОШ = 1.75, 95% ДИ: 1.22–2.51) и *TGFB1**915G/G ($p = 0.048$, ОШ = 1.76, 95% ДИ: 1.05–2.97). Соответственно в контрольной группе было больше носителей аллелей *TGFB1**869C (сумма генотипов C/C и C/T) ($p = 0.0024$, ОШ = 0.57, 95% ДИ: 0.40–0.81) и *TGFB1**915C (сумма генотипов C/C и G/C) ($p = 0.048$, ОШ = 0.57, 95% ДИ: 0.34–0.96). Таким образом, носительство аллеля *TGFB1**-509T, или генотипа *TGFB1**869T/T, или генотипа *TGFB1**915G/G может рассматриваться как фактор риска развития ИМ. При этом ассоциация с ИМ носительства генотипа *TGFB1**869T/T в 20 раз более значима, чем с остальными маркерами.

В связи с тем, что все исследуемые полиморфизмы находятся в одном гене, и учитывая опубликованные данные о неравновесном сцеплении полиморфных участков в этой области [14–16], мы проанализи-

ровали возможные гаплотипы этих SNP. Мы ограничились контрольной группой, поскольку в ней уравнение Харди-Вайнберга соблюдалось во всех исследованных полиморфных участках. Расчет попарного неравновесия по сцеплению между SNP -509C>T, SNP 915G>C и 869T>C, выполненный с помощью программы Haploview 4.0 [10], выявил слабое сцепление ($r^2 < 0.05$ для всех пар). Вероятно, ассоциации ИМ с носительством аллелей этих SNP можно рассматривать как независимые друг от друга. Это дало основание проанализировать ассоциацию совместного носительства аллелей/генотипов этих полиморфизмов с развитием ИМ, используя результаты подсчетов с помощью программного обеспечения APSampler (таблица).

Как видно из данных таблицы, совместное носительство аллеля *TGFB1**-509T и генотипа *TGFB1**869T/T, каждый из которых является фактором риска развития ИМ (см. рис. 1А,Б), приводит к возрастанию как уровня значимости ассоциации с ИМ ($p = 0.00048$), так и значения ОШ (равно 2.06), по сравнению с носительством каждого из них. Добавление к этому биаллельному сочетанию аллеля *TGFB1**915G, носительство которого в отдельности не ассоциировано с ИМ (см. рис. 1В), сохраняет неизменными значения p и ОШ, поскольку все носители сочетания (*TGFB1**-509T + *TGFB1**869T/T) несли также аллель *TGFB1**915G. Носительство двух других биаллельных сочетаний (*TGFB1**869T/T + *TGFB1**915G) и (*TGFB1**-509T + *TGFB1**915G) характеризуется меньшими уровнями значимости ($p = 0.0012$ и 0.023 соответственно) и значений ОШ (1.75 и 1.45 соответственно), чем сочетание (*TGFB1**-509T + *TGFB1**869T/T).

Совместное носительство аллелей *TGFB1**-509C, *TGFB1**869C и *TGFB1**915C также высокозначимо, но негативно ассоциировано с ИМ (таблица). Поодиночке негативная ассоциация с ИМ показана для двух последних аллелей, но не для *TGFB1**-509C (см. рис. 1). В этом случае уровень значимости и отличие величины ОШ от 1 для трехаллельного сочетания ($p = 0.00097$, ОШ = 0.34) больше, чем для всех трех входящих в его состав биаллельных сочетаний (p от 0.0036 до 0.0062; ОШ от 0.40 до 0.64). При этом аллели/генотипы трех SNP, входящие в протективное сочетание, являются альтернативными по отношению к аллелям, входящим в предрасполагающее сочетание.

Известно, что факторы генетического риска часто более значимы для развития ИМ у более молодых индивидов (при раннем ИМ). Исходя из этого, проанализировали распределение частот аллелей/генотипов полиморфных участков в различных возрастных подгруппах больных ИМ. При выделении подгруппы лиц, у которых ИМ развился до 50 лет

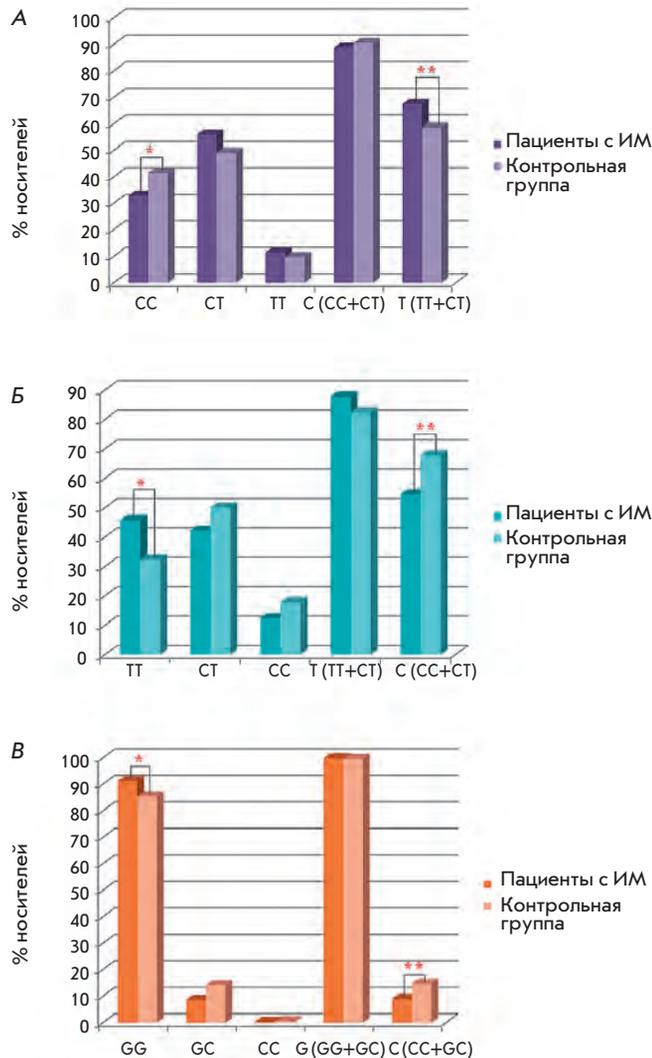


Рис. 1. Частоты носительства аллелей и генотипов полиморфных участков гена *TGFB1* у пациентов с ИМ и индивидов контрольной группы. А – SNP -509C>T. * $p = 0.046$, ОШ = 0.69; ** $p = 0.046$, ОШ = 1.45. Б – SNP 869T>C. * $p = 0.0024$, ОШ = 1.75; ** $p = 0.0024$, ОШ = 0.57. В – SNP 915G>C. * $p = 0.048$, ОШ = 1.76; ** $p = 0.048$, ОШ = 0.57.

включительно (121 человек), и сравнении их с общей контрольной группой наблюдали различия, сходные с различиями в общей выборке. Так, в группе пациентов моложе 50 лет чаще встречались носители аллеля *TGFB1**-509T ($p = 0.002$, ОШ = 2.24, 95% ДИ: 1.35–3.71) и генотипа *TGFB1**869T/T ($p = 0.008$, ОШ = 1.93, 95% ДИ: 1.18–3.15), а в контрольной группе – носители генотипа *TGFB1**-509C/C ($p = 0.002$, ОШ = 0.45, 95% ДИ: 0.27–0.74) и аллеля *TGFB1**869C ($p = 0.008$, ОШ = 0.52, 95% ДИ: 0.32–0.85). Кроме того,

при комплексном анализе было выявлено ассоциированное с ранним ИМ сочетание носительства аллеля *TGFB1**-509T и генотипа *TGFB1**869T/T ($p = 0.00015$, ОШ = 2.73, 95% ДИ: 1.60–4.63), аналогичное полученному в общей группе.

Далее мы разделили группу больных на подгруппы с одним ИМ (73 человека) и с повторным(и) ИМ (226 человек) и сравнили их генотипы между собой. Выявили ассоциацию только одного SNP: генотип *TGFB1**-509T/T чаще встречался у больных с повторными ИМ, чем у перенесших один ИМ ($p = 0.0078$, ОШ = 2.60, 95% ДИ: 1.28–5.28), в то время как аллель *TGFB1**-509C был протективным ($p = 0.016$, ОШ = 0.38, 95% ДИ: 0.19–0.78). Обнаруженные комплексным анализом сочетания оказались менее значимыми, чем одиночная ассоциация SNP -509C>T.

ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе представлены данные о распределении аллелей и генотипов трех функционально значимых полиморфных участков гена *TGFB1* в популяционной выборке индивидов русской этнической принадлежности (контрольная группа). Мы смогли найти опубликованные данные о частоте аллелей/генотипов только одного из исследованных нами SNP у русских, а именно 869T>C, причем в группе мужчин [17]. Полученные в этом исследовании частоты генотипов близки к частотам, определенным в нашей работе (рис. 2Б). На рис. 2 представлены сведения не только для русских, но и опубликованные данные о распределении генотипов SNP -509C>T, SNP 869T>C и SNP 915G>C гена *TGFB1* в различных популяциях европеоидов. В целом, наблюдавшиеся нами у русских частоты генотипов укладываются в довольно широкий диапазон частот, описанных для различных популяций Европы. При этом картина различается для отдельных SNP: если по полиморфизму 915G>C наблюдается полное единообразие распределения генотипов во всех исследованных популяциях европеоидов (рис. 2В), то в случае SNP -509C>T и SNP 869T>C этнические различия достигают уровня значимости при сравнении частот генотипов -509T/T у русских и итальянцев ($p = 0.001$) (рис. 2А).

Эти данные могут отражать различия в характере сцепления полиморфизмов гена *TGFB1* в разных популяциях. Хотя во многих работах у европеоидов выявляли различные гаплотипы, содержащие исследуемые полиморфизмы гена *TGFB1*, мы не получили подобных данных для русских. Вероятно, это связано с популяционно-специфическим характером формирования паттернов LD, а наблюдаемые различия отражают значительную этноспецифическую вариативность гаплотипических блоков [18].

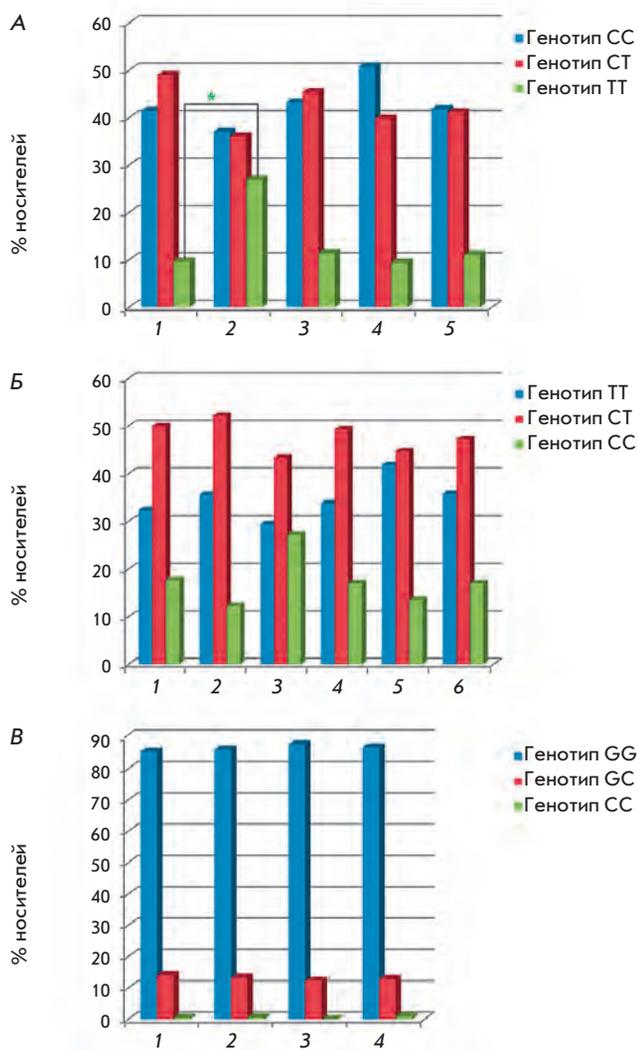


Рис. 2. Частоты генотипов полиморфных участков гена *TGFB1* в различных популяциях европеоидов. А – SNP -509C>T. 1 – Россия, контрольная группа настоящего исследования; 2 – Италия [6]; 3 – Германия [5]; 4 – Англия [14]; 5 – исследование ЕСТИМ (Франция + Северная Ирландия) [1]. Б – SNP 869T>C. 1 – Россия, контрольная группа настоящего исследования; 2 – Россия, лица мужского пола [17]; 3 – Италия [6]; 4 – Германия [5]; 5 – Англия [14]; 6 – исследование ЕСТИМ (Франция + Северная Ирландия) [1]. В – SNP 915G>C. 1 – Россия, контрольная группа настоящего исследования; 2 – Германия [5]; 3 – Англия [14]; 4 – исследование ЕСТИМ (Франция + Северная Ирландия) [1]. * $p = 0.001$.

Нами показано участие гена *TGFB1*, а именно вклад носительства полиморфных участков $-509C>T$, $869T>C$ и $915G>C$ гена *TGFB1*, а также их сочетаний, в формирование генетической предрасположенности к ИМ в этнической группе русских. Сопоставление уровней значимости и величин ОШ для этих сочетаний с параметрами отдельных аллелей/генотипов позволяет сделать вывод, что в случае их совместного носительства имеет место кумулятивный эффект, отражающий скорее всего суммирование независимых вкладов разных полиморфных участков одного и того же гена в развитие ИМ. Поскольку все найденные нами аллели/генотипы риска (*TGFB1** $-509T$, *TGFB1** $869T/T$ и *TGFB1** $915G/G$) связаны с более высоким уровнем экспрессии гена [2–4], можно предположить, что кумулятивная ассоциация определяется однонаправленностью изменения уровня белка TGF- β 1.

При анализе предрасположенности к раннему ИМ мы наблюдали значимые ассоциации с SNP *TGFB1** $-509C>T$ и $869T>C$, но не с $915G>C$. В случае повторных ИМ – значимые ассоциации найдены только с SNP *TGFB1** $-509C>T$. При этом аллелями риска оказались те же аллели, что и в общей группе пациентов. Таким образом, SNP $-509C>T$ и SNP $869T>C$ можно рассматривать в качестве независимых от возраста маркеров ИМ, в том числе и раннего ИМ, а SNP *TGFB1** $-509C>T$ может служить прогностическим маркером развития повторных ИМ. При этом нельзя исключить, что сужение числа ассоциированных маркеров в рассмотренных подгруппах по сравнению с общей группой пациентов может быть связано с уменьшением размеров выборок.

Найденные нами ассоциации в целом согласуются с результатами, полученными для других европеоидов, хотя следует отметить достаточно большой разброс опубликованных данных. Результаты изучения раннего ИМ в итальянской популяции [6] и исследования ЕСТИМ, выполненного на французской и североирландской популяциях [1], аналогичны нашим данным о предрасполагающей к ИМ роли аллелей *TGFB1** $-509T$ и *TGFB1** $915G$ соответственно. Наши результаты о позитивной ассоциации аллеля *TGFB1** $869T$ совпали с данными для немецкой популяции [5], но противоречат данным для итальянской популяции [6]. В ряде публикаций не выявлено значимых ассоциаций с ИМ этих полиморфизмов у европеоидов.

Цитокин TGF- β 1, секретируемый различными типами клеток, включая мононуклеарные клетки крови, гладкомышечные клетки сосудов и фибробласты, участвует в образовании и ремоделировании сосудов, в дифференцировке и миграции клеток [19]. Он играет важную роль в патогенезе ССЗ, в том числе и атеросклероза (включая ИБС и ИМ), гипертонической болезни, гипертрофии миокарда и фибротических явлений, приводящих к сердечной недостаточности и рестенозу после операций на сердце [20].

В некоторых исследованиях обнаружено, что TGF- β 1 обладает антиатерогенным действием: он подавляет воспаление и усиливает стабилизацию атеросклеротической бляшки. С другой стороны, высокий уровень TGF- β 1 ассоциирован со стенозом сосудов и тромбообразованием [20], усиливает фиброз и подавляет регенерацию эндотелия [21], т.е. является проатерогенным фактором. В частности, он может способствовать раннему появлению липидного пятна, стимулируя образование внеклеточного матрикса и подавляя его деградацию [20]. Исходя из данных о роли TGF- β 1 в патогенезе атеросклероза, можно предположить, что в зависимости от совокупности других факторов неблагоприятным при развитии ИМ может быть как низкий, так и высокий уровень TGF- β 1, а соответственно носительство альтернативных аллелей полиморфных участков гена, влияющих на уровень продукции белка. Одним из таких факторов может быть этническое своеобразие исследуемых групп.

ВЫВОДЫ

Полученные нами данные об ассоциации с ИМ аллелей/генотипов SNP *TGFB1** $-509T$, *TGFB1** $869T/T$ и *TGFB1** $915G/G$, связанных с более высоким уровнем экспрессии гена [2–4], могут указывать на доминирование проатерогенных функций этого цитокина при ИМ у русских.

Совокупность полученных результатов свидетельствует о важной роли гена *TGFB1* в формировании предрасположенности к ИМ у этнических русских и лишней раз доказывает необходимость изучения генетических факторов в каждой отдельной этнической группе. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Правительства Москвы (Государственный
контракт № 8/3-280н-10).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cambien F., Ricard S., Troesch A., Mallet C., Genereaux L., Evans A., Arveiler D., Luc G., Ruidavets J.B., Poirier O. // *Hypertension*. 1996. V. 28. № 5. P. 881–887.

2. Shah R., Hurley C.K., Posch P.E. // *Hum. Genet.* 2006. V. 120. P. 461–469.
3. Nikolova P.N., Ivanova M.I., Mihailova S.M., Myhailova A.P., Baltadjieva D.N., Simeonov P.L., Paskalev E.K., Naumova E.J.

- // *Transpl. Immunol.* 2008. V. 18. № 4. P. 344–348.
4. Khalil M.S., El Nahas A.M., Blakemore A.I. // *Nephron Exp. Nephrol.* 2005. V. 101. № 2. P. e31–41.
 5. Koch W., Hoppmann P., Mueller J.C., Schomig A., Kastrati A. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. V. 26. № 5. P. 1114–1119.
 6. Crobu F., Palumbo L., Franco E., Bergerone S., Carturan S., Guarrera S., Frea S., Trevi G., Piazza A., Matullo G. // *BMC Med. Genet.* 2008. V. 9. № 13.
 7. Судомоина М.А., Сухина Т.С., Барсова Р.М., Фаворов А.В., Шахнович Р.М., Титов Б.В., Матвеева Н.А., Рыбалкин И.Н., Власик Т.Н., Ochs M.F., et al. // *Молекуляр. биология.* 2010. Т. 44. № 3. С. 463–471.
 8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning* / Ed. Nolan C. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
 9. www.changbioscience.com/primio/
 10. <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>
 11. <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>
 12. <http://code.google.com/p/apsampler/>
 13. Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M.F. // *Genetics.* 2005. V. 171. P. 2113–2121.
 14. Syrris P., Carter N.D., Metcalfe J.C., Kemp P.R., Grainger D.J., Kaski J.C., Crossman D.C., Francis S.E., Gunn J., Jeffery S., et al. // *Clin. Sci. (London).* 1998. V. 95. № 6. P. 659–667.
 15. Grainger D.J., Heathcote K., Chiano M., Snieder H., Kemp P.R., Metcalfe J.C., Carter N.D., Spector T.D. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. № 1. P. 93–97.
 16. Sie M.P., Uitterlinden A.G., Bos M.J., Arp P.P., Breteler M.M., Koudstaal P.J., Pols H.A., Hofman A., van Duijn C.M., Witteman J.C. // *Stroke.* 2006. V. 37. № 11. P. 2667–2671.
 17. Чурносов М.И., Некипелова Е.В., Текунова Т.С., Конева О.А., Решетников Е.А., Акулова Л.Ю., Добродомова И.С., Алтухова О.Б., Демин С.С. // *Научные ведомости БелГУ.* 2008. Т. 46. № 6. Вып. 6. С. 34–39.
 18. de Bakker P.I., Yelensky R., Pe'er I., Gabriel S.B., Daly M.J., Altshuler D. // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. № 11. P. 1217–1223.
 19. Khan R., Agrotis A., Bobik A. // *Cardiovasc. Res.* 2007. V. 74. № 2. P. 223–234.
 20. Aihara K., Ikeda Y., Yagi S., Akaike M., Matsumoto T. // *Cardiol. Res. Pract.* 2011. V. 2011. P. 175381.
 21. Kim I.Y., Kim M.M., Kim S.J. // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 38. № 1. P. 1–8.

УДК 577.152.351, 577.151.02

Построение механистической полноатомной модели апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы человека АРЕ1 для виртуального скрининга новых ингибиторов

И. Г. Халиуллин¹, Д. К. Ниров^{1,2}, И. В. Шаповалова², В. К. Швядас^{1,2*}¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73²Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

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

Поступила в редакцию 18.04.2012 г.

РЕФЕРАТ Создана полноатомная молекулярная модель апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы 1 (АРЕ1) человека – одного из ключевых ферментов системы репарации ДНК. Исследование включало в себя гибридное квантово-механическое/молекулярно-механическое моделирование фермент-субстратных взаимодействий и расчет ионизационных состояний аминокислотных остатков активного центра фермента. В результате обобщения расчетных и экспериментальных данных обоснован выбор механизма действия АРЕ1 с остатком Asp210 в качестве акцептора протона. Выявлены взаимодействия в активном центре, наиболее важные для связывания субстрата и потенциальных ингибиторов АРЕ1, представляющих интерес в качестве перспективных сопровождающих препаратов в химио- и радиотерапии онкологических заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза 1, КМ/ММ, механизм действия, молекулярное моделирование, ингибирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AP – апуриновый/апириимидиновый; АРЕ1 – апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза 1; КМ/ММ – квантово-механический/молекулярно-механический; МД – молекулярная динамика; ЭРО – эксцизионная репарация оснований.

ВВЕДЕНИЕ

Повреждения ДНК постоянно возникают в результате ошибок репликации и под воздействием различных экзогенных и эндогенных факторов, таких, как ультрафиолетовое излучение и окислительный стресс. Для обеспечения стабильности клеточного генома у млекопитающих существуют специальные ферментные системы репарации – прямая эксцизионная репарация оснований и нуклеотидов и репарация в результате рекомбинации, позволяющие устранять большинство повреждений ДНК [1–3]. Фармакологическое ингибирование систем репарации является перспективным путем увеличения эффективности терапии онкологических заболеваний. Это обусловлено тем, что системы репарации противостоят действию химиотерапевтических агентов (например, темозоломида или цисплатина [4]), повреждающих ДНК с це-

лью уничтожения опухолевой клетки. Следовательно, селективное воздействие, направленное на ингибирование ферментов, участвующих в процессах репарации ДНК, может быть использовано в качестве сопровождающего лечения. Следует ожидать, что наиболее эффективными окажутся соединения, связывание которых в активном центре фермента будет затрагивать остатки, непосредственно вовлеченные в каталитический механизм. Поэтому адекватная информация об организации активного центра фермента-мишени, распределении зарядов, а также анализ взаимодействий, определяющих прочность связывания субстрата и ингибиторов, абсолютно необходимы для поиска новых лекарственных средств в терапии рака.

Апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза 1 (АРЕ1) – ключевой фермент механизма репарации ДНК, известного как эксцизионная репарация осно-

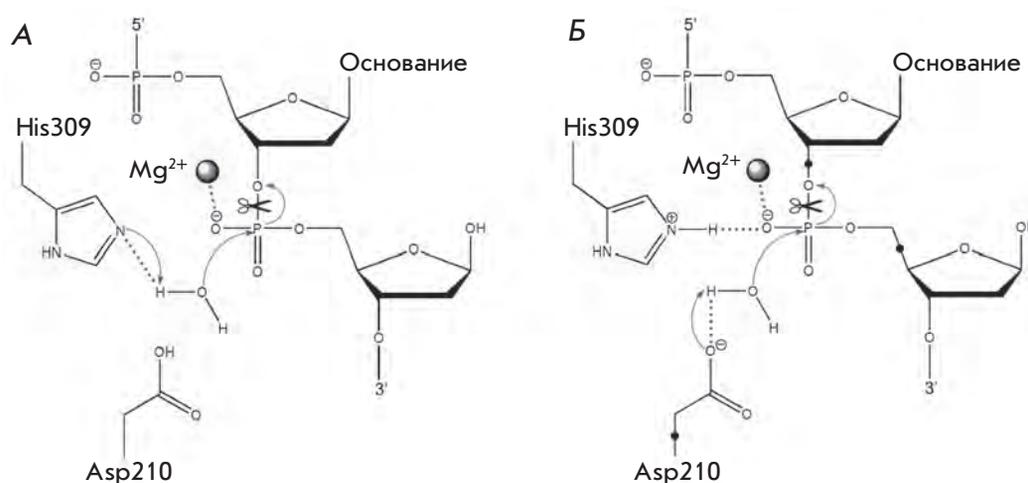
ваний (ЭРО). Апуриновые/апиримидиновые (АР) сайты – остатки дезоксирибозы в молекуле ДНК, лишенные азотистого основания, образуются в результате ферментативного гидролиза N-гликозидной связи поврежденных нуклеотидов и представляют собой, по сути, интермедиаты процесса ЭРО. Кроме того, АР-сайты в клетках могут возникать и спонтанно в результате апуринизации [5]. По существующим оценкам в клетках млекопитающих за сутки образуется до 10000 АР-сайтов [6]. Эндонуклеаза АРЕ1 распознает АР-сайты и осуществляет гидролиз их 5'-фосфодиэфирной связи для последующего замещения на неповрежденный нуклеотид [5, 7]. Данные лабораторных и клинических исследований свидетельствуют о важной роли этого фермента в развитии опухолей и формировании их устойчивости к противоопухолевым препаратам [8].

Существуют разные точки зрения на каталитический механизм действия эндонуклеазы АРЕ1. Первая кристаллографическая структура фермента была получена в 1997 году (PDB ID 1bix) [9], и в процессе описания структуры авторами был предложен механизм, в котором роль общего основания в катализе приписывается остатку His309. В предполагаемом механизме незаряженный остаток His309 совместно с Asp283 образует цепь переноса заряда подобно сериновым протеазам с той разницей, что в роли активируемого нуклеофильного агента выступает молекула воды (*рис. 1А*). В этом механизме роль иона металла заключается в связывании и поляризации отрицательно заряженной фосфатной группы субстрата, а также в стабилизации промежуточного соединения ферментативной реакции.

В исследованиях, проведенных с использованием сайт-направленного мутагенеза, показана принципиальная значимость другого остатка активного

центра – Asp210, для катализа: мутантные формы фермента с заменами Asp210Ala и Asp210Asn практически полностью теряли свои каталитические свойства (активность падала более чем в 25000 раз) по сравнению с ферментом дикого типа [10]. Определение кристаллографических структур АРЕ1 человека в комплексе с производными ДНК привело к существенному пересмотру предположений о механизме действия фермента [11]. Одна из установленных структур (PDB ID 1de8) представляет собой комплекс неактивного фермента, не содержащего иона металла, с аналогом субстрата, в то время как вторая структура (PDB ID 1de9) содержит ион металла (двухвалентного марганца) и связанный с ферментом ДНК-аналог субстрата после каталитического расщепления. При объединении структур (их наложении в пространстве) получено представление о строении фермент-субстратного комплекса, содержащего одновременно аналог субстрата и ион металла. Хотя полученная таким образом модельная структура фермент-субстратного комплекса не содержит молекулы воды, потенциально способной атаковать субстрат, положение остатков активного центра до и после каталитического акта позволило сделать предположение об альтернативном механизме протекания каталитической реакции [11]. В предложенной схеме в роли общего основания, активирующего молекулу воды, выступает остаток Asp210, в то время как остатку His309, наряду с ионом металла, отводится роль связывания и координации фосфатной группы субстрата (*рис. 1Б*). В этом случае подразумевается участие положительного заряда остатка His309 в процессе катализа, чему, по-видимому, способствует близкое расположение остатка Asp238. Основную же стабилизирующую функцию при образовании промежуточного соедине-

Рис. 1. Основные представления о механизме действия АРЕ1. А – В роли общего основания, активирующего молекулу воды, выступает остаток His309. Б – В роли общего основания выступает остаток Asp210, в то время как His309 участвует в связывании субстрата. Черные кружки – линкерные атомы, использованные в данной работе при КМ/ММ-моделировании АРЕ1.



ния ферментативной реакции выполняет, по мнению авторов работы [11], остаток Asn212.

В более поздних кристаллографических [12], а также молекулярно-динамических [13] исследованиях были выдвинуты предположения о втором участке связывания металла в активном центре фермента. В этих работах предложен механизм действия APE1 с участием двух ионов металла [12], аналогичный механизму, выявленному у родственного фермента, эндонуклеазы Endo IV, и механизм «движущегося металла» [13], включающий в себя переход иона металла между двумя участками связывания в процессе катализа.

Следует отметить, однако, что ЯМР-исследование с применением изотопа ^{25}Mg [14] не подтвердило гипотезы о связывании второго иона магния в активном центре эндонуклеазы APE1, поставив тем самым под сомнение механизмы с участием двух ионов металла и «движущегося металла». Результаты кристаллографических исследований, полученные в работе [12], объясняются, по мнению авторов работы [14], артефактами, вызванными использованием иона свинца вместо иона магния. Эффект движения иона металла при молекулярно-динамическом моделировании, в свою очередь, может быть обусловлен погрешностями и приближениями метода классической молекулярной динамики.

Мандл и сотр. [15] предложили двухстадийный вариант механизма действия фермента APE1, включающий участие остатка Tyr171 в форме фенолят-иона для прямой нуклеофильной атаки фосфатной группы субстрата. Такой вывод был сделан на основании данных, полученных с помощью сайт-направленного мутагенеза с заменой по положению 171. Кинетические исследования каталитических свойств мутантных форм Tyr171Ala, Tyr171Phe, Tyr171His показали падение активности фермента почти на пять порядков. Однако позднее [16] авторы признали несостоятельность предложенной ими двухстадийной схемы и высказались в пользу одностадийного механизма, в котором общим основанием, активирующим молекулу воды, служит остаток His309, а остаток Tyr171 участвует в связывании и правильной ориентации субстрата.

Методы молекулярного моделирования могли оказать существенную помощь при изучении механизма действия фермента, однако этот подход практически не использовался для исследования APE1, а при моделировании взаимодействия ингибитора с ферментом не учитывалось состояние ионизации ингибитора, что осложняет интерпретацию полученных результатов [17].

Таким образом, не существует однозначного представления о механизме действия эндонуклеазы чело-

века APE1, роли аминокислотных остатков активного центра в связывании и катализе. Поэтому актуальным остается уточнение структуры активного центра, характера взаимодействий фермента с субстратом и ингибиторами, участия аминокислотных остатков активного центра в механизме действия APE1 с применением методов молекулярного моделирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Программное обеспечение для молекулярного моделирования

Расчет ионизационных состояний аминокислотных остатков проводили с помощью программы PROPKA 2.0 [18, 19]. Подготовку стартовой структуры к расчетам и анализ траекторий выполняли в пакете AmberTools 1.2 (<http://ambermd.org>). Минимизацию энергии и молекулярную динамику проводили в пакете Amber 10 [20, 21], молекулярный докинг – с помощью программы Lead Finder 1.1.14 компании ООО «Молекулярные технологии» [22]. Моделирование пространственной структуры 6-гидрокси-ДОФА осуществляли с помощью программы ACD/ChemSketch 8.17 [23]. Визуализацию структур и траекторий осуществляли с помощью программы VMD 1.8.6 [24]. Параллельные вычисления молекулярно-динамических траекторий проводили на суперкомпьютере СКИФ МГУ «Чебышев».

Подготовка структуры

Стартовая модель фермент-субстратного комплекса APE1 была подготовлена на основе кристаллографической структуры 1de8 [11]. Координаты атакующей молекулы воды в активном центре получили методом докинга, координаты иона марганца перенесли из структуры 1de9, а затем изменили тип металла на магний. Структуру фермент-субстратного комплекса протонировали и поместили в ячейку молекул воды типа TIP3P с минимальным расстоянием 12 Å от белка до края ячейки. Для нейтрализации заряда в систему добавили ионы натрия. Для молекулярно-механического описания молекул белка и ДНК использовали силовое поле *ff99SB* [25], для описания AP-сайта – параметры из базы данных R.E.DD.B (<http://q4md-forcefieldtools.org>) [26].

Минимизация энергии и молекулярная динамика

Модель фермент-субстратного комплекса APE1 уравнивали и проводили расчет 1000 пс молекулярно-динамической траектории согласно следующему протоколу. Прежде всего, проводили двухстадийную минимизацию энергии сольватированной системы. На первой стадии (2500 шагов по алгоритму steepest descent, затем 2500

шагов по алгоритму conjugate gradient) систему описывали молекулярно-механически, при этом координаты белка, ДНК и иона магния фиксировали позиционными ограничениями формы $k(\Delta x)^2$ с константой 2 ккал/(моль·Å²). На второй стадии (5000 steepest descent шагов, 5000 conjugate gradient шагов) систему разбивали на квантово-механический (КМ) и молекулярно-механический (ММ) регионы, и минимизацию энергии проводили без ограничений. КМ-регион включал боковую цепь остатка активного центра Asp210, атакующую молекулу воды, фрагмент AP-сайта и описывался полуэмпирическим гамильтонианом RM1 [27]. При рассмотрении связей, пересекающих границу КМ- и ММ-регионов, использовали метод линкерного атома.

После минимизации энергии с применением указанного выше КМ/ММ-разбиения систему разогревали от 0 до 300 К в течение 50 пс (с позиционными ограничениями 1 ккал/(моль·Å²) на атомах белка, ДНК и иона магния), уравнивали при 300 К в течение 500 пс и проводили симуляцию равновесной системы в течение 1000 пс. Во всех симуляциях использовали периодические граничные условия и метод учета дальнедействующих взаимодействий PME (Particle Mesh Ewald). Радиус отсечения несвязных взаимодействий составлял 10 Å. Разогрев системы проводили при постоянном объеме, уравнивание и расчет траектории в течение 1000 пс – при постоянном давлении. Регуляцию температуры осуществляли по методу Ланжевена. Шаг интегрирования составлял 0.002 пс. Межатомные расстояния и углы в активном центре АРЕ1 анализировали на основании траектории 1000 пс равновесной симуляции.

Молекулярный докинг

Модель для проведения молекулярного докинга потенциальных ингибиторов АРЕ1 была получена следующим образом. Из структуры сольватированного фермент-субстратного комплекса АРЕ1, полученного в результате минимизации энергии, удалили молекулу воды, ионы натрия и субстрат-аналог ДНК, после чего рассчитали потенциальную решетку (карту потенциала взаимодействия в активном центре), охватывающую область связывания AP-сайта. Затем с использованием генетического алгоритма поиска в активный центр докировали молекулу потенциального ингибитора 6-гидрокси-ДОФА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ионизационные состояния остатков активного центра

По результатам расчета ионизационных состояний остатков активного центра методом PROPKA 2.0

было установлено, что в оптимальных условиях протекания реакции гидролиза фосфодиэфирной связи (рН 7–8 [12]) остаток His309 находится в протонированной форме (расчетное значение pK_a , равное 8.6, совпадает со значением pK_2 экспериментально определенного рН-профиля активности фермента), а остаток Asp210 – в непротонированной (расчетное значение pK_a , равное 6.2, близко к значению pK_1 рН-профиля активности фермента – 6.6). Таким образом, можно заключить, что функцию общего основания при катализе выполняет непротонированный отрицательно заряженный остаток Asp210, в то время как положительно заряженный в условиях оптимума реакции остаток His309 участвует в связывании отрицательно заряженной фосфатной группы субстрата и стабилизации переходного состояния. Поэтому далее при построении полноатомной модели АРЕ1 Asp210 и His309 моделировали в заряженной форме.

Модель фермент-субстратного комплекса и предполагаемый механизм действия эндонуклеазы АРЕ1

Стартовая сольватированная модель фермент-субстратного комплекса АРЕ1 была создана на основе кристаллографических структур 1de8 и 1de9 как описано в «Экспериментальной части». Далее было необходимо оптимизировать позиции атомов модели (прежде всего координаты добавленных атомов водорода), для чего проведена двухстадийная минимизация энергии системы. На первой стадии проводили молекулярно-механическую минимизацию с целью удаления наибольших напряжений в системе. На второй стадии осуществляли более тонкую настройку структуры активного центра при помощи гибридной КМ/ММ-минимизации энергии с использованием гамильтониана RM1 как описано выше. Стабильность полученной структуры подтверждена в результате КМ/ММ молекулярно-динамической симуляции продолжительностью 1000 пс. Рассчитанные межатомные расстояния в активном центре АРЕ1 приведены в *таблице*. Анализ полученной модели показывает, что связывание субстрата в активном центре апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы сопровождается образованием большого количества связей и взаимодействий различной природы. Среди них следует выделить гидрофобные взаимодействия дезоксирибозы AP-сайта в гидрофобном кармане, образованном остатками Leu282, Phe266 и Trp280. Свободная гидроксильная группа дезоксирибозы AP-сайта также образует водородную связь с карбонильной группой основной цепи Ala230. Фосфатная группа, расположенная на 3'-конце AP-сайта, удерживается положительным зарядом остатка Arg177. Атакующая фосфатная группа

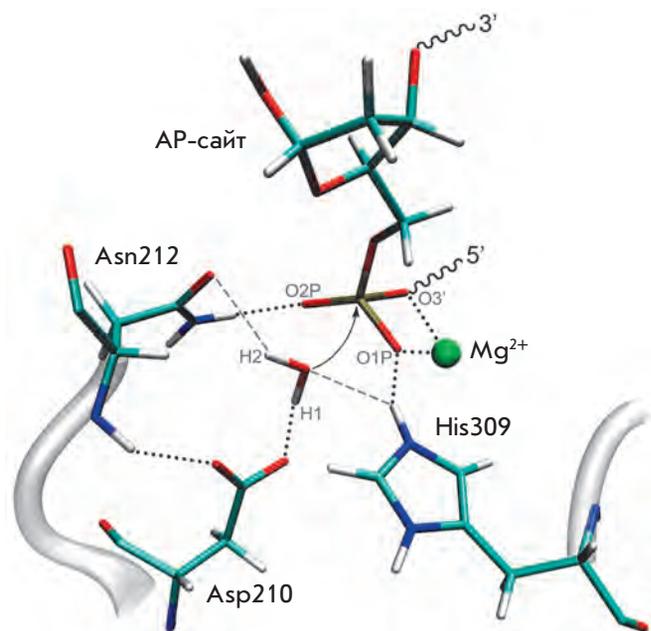


Рис. 2. Активный центр полноатомной модели фермент-субстратного комплекса APE1. Пунктирными линиями показана система водородных связей. Штриховыми линиями отмечены электростатические взаимодействия, не являющиеся водородными связями. Стрелка указывает направление нуклеофильной атаки.

электростатически взаимодействует с ионом магния и образует водородные связи с боковыми радикалами остатков Asn174, Asn212 и His309. Гидроксильная группа остатка Tyr171 направлена в сторону атома кислорода уходящей группы.

Ориентация атакующей молекулы воды обеспечивается взаимодействием с общим основанием Asp210, карбонильной группой остатка Asn212 и боковым радикалом остатка His309, причем взаимодействия $\text{H}_2\text{O}:\text{H2} \cdots \text{Asn212}:\text{OD1}$, $\text{H}_2\text{O}:\text{O} \cdots \text{His309}:\text{HE2}$ не являются полноценными водородными связями: средние значения углов $\text{O}\cdots\text{H2}\cdots\text{OD1}$ и $\text{NE2}\cdots\text{HE2}\cdots\text{O}$ составляют 137° и 122° соответственно, в то время как в случае водородной связи эти значения должны быть не менее 150° . Реакционноспособная конформация карбоксильной группы общего основания Asp210 в ферменте поддерживается взаимодействием его бокового радикала с аминогруппой основной цепи остатка Asn212 (рис. 2).

Ориентированная и поляризованная под действием зарядов остатков Asp210, His309 и иона металла молекула воды способна атаковать фосфатную группу субстрата, одновременно передавая протон общему основанию – остатку Asp210. Образующийся в результате атаки интермедиат в виде тригональной бипирамиды стабилизирован следующими взаимодействиями в активном центре фермента: атомы кис-

Дистанционные характеристики фермент-субстратного комплекса APE1, полученные в результате равновесной КМ/ММ-симуляции продолжительностью 1000 пс. Средние значения приведены вместе со стандартным отклонением

Взаимодействие	Расстояние, Å
$\text{H}_2\text{O}:\text{O} \cdots \text{AP-сайт}:\text{P}$	1.91 ± 0.03
$\text{H}_2\text{O}:\text{O} \cdots \text{His309}:\text{HE2}$	2.52 ± 0.17
$\text{H}_2\text{O}:\text{H1} \cdots \text{Asp210}:\text{OD1}$	1.49 ± 0.07
$\text{H}_2\text{O}:\text{H2} \cdots \text{Asn212}:\text{OD1}$	2.62 ± 0.47
$\text{AP-сайт}:\text{O1P} \cdots \text{Mg}^{2+}$	1.84 ± 0.04
$\text{AP-сайт}:\text{O1P} \cdots \text{His309}:\text{HE2}$	1.78 ± 0.09
$\text{AP-сайт}:\text{O2P} \cdots \text{Asn212}:\text{HD2}$	2.08 ± 0.32
$\text{dC5}:\text{O3}' \cdots \text{Mg}^{2+}$	1.95 ± 0.06
$\text{Asp210}:\text{OD2} \cdots \text{Asn212}:\text{H}$	2.22 ± 0.20

лорода в «вершинах» бипирамиды взаимодействуют с боковыми радикалами остатков His309 и Tyr171; плоскость треугольника в «основании» бипирамиды расположена между остатками Asn174, Asn212 и ионом магния (рис. 3).

Данные по мутагенезу Tyr171 [15] указывают на важную роль этого остатка в механизме действия APE1, однако, в отличие от ранее сделанных предположений [15, 16], мы предполагаем другую роль

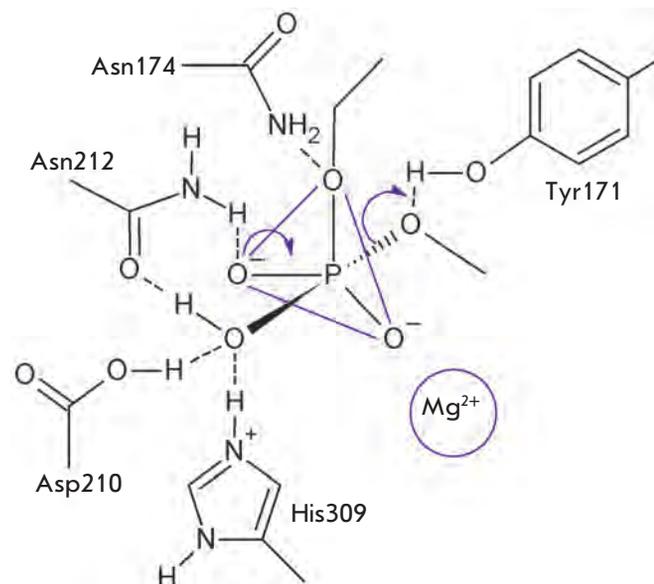
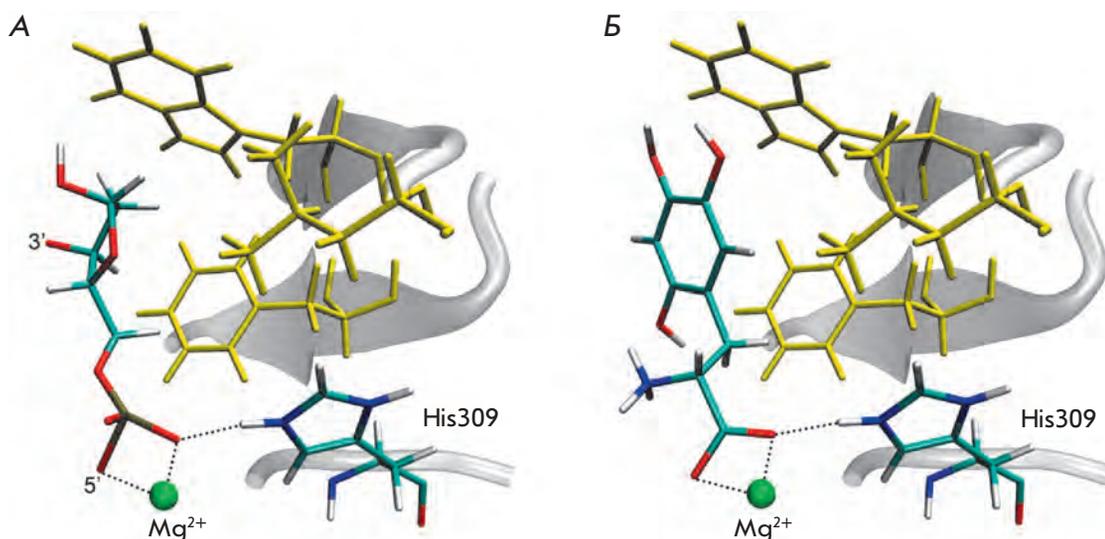


Рис. 3. Схематичное изображение строения и превращения промежуточного продукта (интермедиата в виде тригональной бипирамиды) в реакции гидролиза, катализируемой AP-эндонуклеазой 1.

Рис. 4. Расположение субстрата (А) и потенциально ингибитора (Б) в активном центре полноатомной модели АРЕ1. Желтым показаны остатки гидрофобного кармана: Phe266, Trp280 и Leu282.



Tyr171 в катализе. Близкое расположение положительных зарядов иона магния и остатка Arg156 должно способствовать облегченному уходу протона с гидроксильной группы Tyr171, поэтому мы рассматриваем данный остаток в качестве потенциального донора протона для уходящей группы, являющейся сильным основанием. Менее значительное влияние мутаций по положению 171 на связывание субстрата по сравнению с падением каталитической константы [15] объясняется слабо выраженным взаимодействием остатка с субстратом на ранних стадиях реакции, предшествующих каталитическому акту, что полностью согласуется со сделанным предположением. В ходе каталитического превращения, по-видимому, происходит сближение уходящей группы с боковым радикалом остатка Tyr171, что обеспечивает дополнительную стабилизацию интермедиата реакции, и передача протона на уходящую группу становится возможной.

При дальнейшем протекании реакции менее стабилизированная связь P–O, находящаяся в плоскости основания и направленная в сторону остатка Asn212, превращается в двойную P=O. Одновременно с этим разрывается связь P–O, направленная к остатку Tyr171, и уходящая группа забирает протон у гидроксильной группы тирозина (рис. 3).

Восстановление каталитически активного состояния активного центра (депротонирование общего основания Asp210 и протонирование кислоты Tyr171) происходит в результате взаимодействия с молекулами воды из внешней среды.

Анализ связывания субстрата и механизмов ингибиторов

В связывании субстрата и стабилизации переходного состояния в ходе реакции участвует множество заря-

дов и полярных групп, характер этих взаимодействий и ионное состояние аминокислотных остатков активного центра определяют требования к структуре соединений, способных связываться в активном центре АРЕ1. При конструировании эффективных ингибиторов фермента следует реализовать по крайней мере наиболее важные взаимодействия. Существование гидрофобного участка связывания наряду с множеством полярных и различно заряженных групп осложняет поиск низкомолекулярных соединений подходящей структуры. Аминокислоты являются тем классом природных соединений, в структуре которых одновременно имеются заместители различной природы, способные осуществить гидрофобные, электростатические взаимодействия, выступить донором или акцептором водородных связей. Отмечалось [17], что 6-гидрокси-ДОФА может быть ингибитором эндонуклеазной активности АРЕ1, однако, при моделировании взаимодействия фермента с ингибитором было неправильно учтено состояние ионизации ингибитора, что затрудняет интерпретацию полученных результатов. Для выяснения особенностей взаимодействия фермента с потенциальными ингибиторами такого строения проведено молекулярное моделирование связывания различных аминокислот (в том числе 6-гидрокси-ДОФА) и их производных в активном центре АРЕ1 с учетом ионизации как самого потенциального ингибитора, так и аминокислотных остатков активного центра фермента.

Анализ результатов молекулярного моделирования показывает, что наличие карбоксильной группы позволяет выбранным соединениям связываться с ионом металла и остатком His309, в то время как гидрофобный заместитель, например фенильный радикал, может располагаться в гидрофобном кармане связывания дезоксирибозы (рис. 4). Введение

гидроксильных заместителей в фенильный радикал может приводить к образованию дополнительных водородных связей с полярными остатками активного центра фермента. Кроме того, одним из возможных факторов, определяющих эффективность ингибирования, является связывание ингибитора с заряженным остатком общего основания.

ВЫВОДЫ

Целью работы был выбор наиболее достоверного механизма действия АРЕ1 на основе данных молекулярного моделирования, анализа построенной механистической полноатомной модели АРЕ1, а также критического рассмотрения опубликованных ранее экспериментальных результатов и предположений. Для этого проведен расчет ионизационных состояний остатков активного центра и гибридное КМ/ММ-моделирование фермент-субстратного комплекса, содержащего молекулу воды, способную атаковать субстрат. В результате проведенного исследования показано, что функцию общего основания в каталитическом механизме выполняет, по всей видимости, остаток Asp210, а остаток His309, находясь в протонированной (заряженной) форме, участвует в связывании фосфатной группы субстрата. Анализ молекулярно-динамической траектории фермент-субстратного комплекса показывает его высокую ре-

акционноспособность и свидетельствует об адекватности проведенного молекулярного моделирования.

Выявлены наиболее важные взаимодействия в активном центре, определяющие эффективность связывания субстрата и потенциальных ингибиторов фермента, представляющих интерес в качестве перспективных сопровождающих препаратов в химио- и радиотерапии онкологических заболеваний. Выдвинуто предположение о роли Tyr171 активного центра АРЕ1 как остатка, способного отдать протон уходящей группе субстрата. Таким образом, проведенное исследование позволило установить согласованный механизм действия фермента, обобщающий данные молекулярного моделирования, экспериментальные результаты кинетических исследований и другие опубликованные данные. В дальнейшей работе планируется применить гибридные квантово-механические методы более высокого порядка для расчета энергетического барьера реакции, катализируемой эндонуклеазой АРЕ1 в соответствии с предложенным механизмом, и провести поиск эффективных ингибиторов с использованием построенной механистической полноатомной модели фермента. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства образования и науки России
(Государственный контракт № 16.512.11.2240).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lindahl T., Wood R.D. // *Science*. 1999. V. 286. P. 1897–1905.
- Hoeyjmakers J.H. // *Nature*. 2011. V. 411. P. 366–374.
- Речкунова Н.И., Красикова Ю.С., Лаврик О.И. // *Биохимия*. 2011. Т. 76. С. 32–45.
- Abbotts R., Madhusudan S. // *Cancer Treatment Rev*. 2010. V. 36. P. 425–435.
- Невинский Г.А. // *Биохимия*. 2011. Т. 76. С. 115–141.
- Wilson D.M., Simeonov A. // *CMLS*. 2010. V. 67. P. 3621–3631.
- Дырхеева Н.С., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // *Молекулярная биология*. 2007. Т. 41. С. 450–466.
- Fishel M.L., Kelley M.R. // *Mol. Aspects Medicine*. 2007. V. 28. P. 375–395.
- Gorman M.A., Morera S., Rothwell D.G., de La Fortelle E., Mol C.D., Tainer J.A., Hickson I.D., Freemont P.S. // *EMBO J*. 1997. V. 16. P. 6548–6558.
- Erzberger J.P., Wilson D.M. // *J. Mol. Biol*. 1999. V. 290. P. 447–457.
- Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. // *Nature*. 2000. V. 403. P. 451–456.
- Beernink P.T., Segelke B.W., Hadi M.Z., Erzberger J.P., Wilson D.M., Rupp B. // *J. Mol. Biol*. 2001. V. 307. P. 1023–1034.
- Oezguen N., Schein C.H., Peddi S.R., Power T.D., Izumi T., Braun W. // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2007. V. 68. P. 313–323.
- Lipton A.S., Heck R.W., Primak S., McNeill D.R., Wilson D.M., Ellis P.D. // *J. Amer. Chem. Soc*. 2008. V. 130. P. 9332–9341.
- Mundle S.T., Fattal M.H., Melo L.F., Coriolan J.D., O'Regan N.E., Strauss P.R. // *DNA Repair*. 2004. V. 3. P. 1447–1455.
- Mundle S.T., Delaney J.C., Essigmann J.M., Strauss P.R. // *Biochemistry*. 2009. V. 48. P. 19–26.
- Simeonov A., Kulkarni A., Dorjsuren D., Jadhav A., Shen M., McNeill D.R., Austin C.P., Wilson D.M. III // *PloS One*. 2009. V. 4. P. e5740.
- Li H., Robertson A.D., Jensen J.H. // *Proteins*. 2005. V. 61. P. 704–721.
- Bas D.C., Rogers D.M., Jensen J.H. // *Proteins*. 2008. V. 73. P. 765–783.
- Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E. III, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Crowley M., Walker R.C., Zhang W., et al. // *AMBER 10*. University of California. San Francisco. 2008.
- Walker R.C., Crowley M.F., Case D.A. // *J. Comput. Chem*. 2008. V. 29. P. 1019–1031.
- Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Chem. Inf. Model*. 2008. V. 48. P. 2371–2385.
- ACD/ChemSketch Freeware, version 8.17. Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com. 2005.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graphics*. 1996. V. 14. № 1. P. 33–38.
- Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. // *Proteins*. 2006. V. 65. P. 712–725.
- Chen J., Dupradeau F.-Y., Case D.A., Turner C.J., Stubbe J. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 3096–3107.
- Rocha G.B., Freire R.O., Simas A.M., Stewart J.J.P. // *J. Comp. Chem*. 2006. V. 27. P. 1101–1111.

УДК 547.288.3 / 876 576.382.49; 577.16.086 / 151.042; 579.882.11

Создание ингибиторов системы секреции типа III *S. trachomatis*, подавляющих развитие острой и хронической хламидийной инфекции

Н. А. Зигангирова, Е. С. Заякин*, Л. Н. Капотина, Е. А. Кост, Л. В. Диденко, Д. Ю. Давыдова, Ю. П. Румянцева, А. Л. Гинцбург

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

*E-mail: e.s.zayakin@gmail.com

Поступила в редакцию 17.01.2012 г.

РЕФЕРАТ Система секреции типа III (ССТТ) в настоящее время рассматривается как один из основных факторов патогенности грамотрицательных бактерий, осуществляющих различные типы паразитизма. Эта структура абсолютно необходима для развития острого инфекционного процесса, а хронизация инфекции принципиально зависит от ее функционирования, поэтому ССТТ считается одной из наиболее перспективных мишеней для разработки антибактериальных препаратов широкого спектра действия, не вызывающих развития резистентности и эффективных при острой и хронической формах инфекции. Действие разрабатываемых препаратов основано на специфическом ингибировании работы ССТТ, что должно прерывать инфекционный процесс, позволяя иммунной системе элиминировать патоген. В результате скрининга с использованием специфических клеточных и бактериальных тестов, дальнейшей оптимизации структуры и детального изучения биологической активности получен новый класс ингибиторов ССТТ хламидий. Отобранные соединения обладают выраженными преимуществами перед имеющимися на данный момент ингибиторами ССТТ патогенных микроорганизмов, что обусловлено их высокой ингибирующей активностью при минимальном повреждении эукариотической клетки. Выбранные ингибиторы перешли на стадию проведения доклинических испытаний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА тиогидразоны, тиогидразиды, тиadiaзины, система секреции типа III, цитотоксичность, хламидии, ингибиторы, микроскопия, электронная микроскопия, морфология.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ССТТ – система секреции типа III; МОИ – множественность инфекции; МОМР – белок наружной мембраны хламидий; ЛПС – липополисахарид; ВОЕ – включениеобразующие единицы.

ВВЕДЕНИЕ

Хламидии – грамотрицательные бактерии с внутриклеточным типом паразитирования. Два вида хламидий являются широко распространенными возбудителями заболеваний человека. В общей структуре заболеваний, передаваемых половым путем, хламидийная инфекция, вызываемая *Chlamydia trachomatis*, занимает первое место, ежегодно вызывая более 100 млн новых случаев заболевания [1]. По данным ВОЗ, число инфицированных хламидиями на земном шаре по самым скромным подсчетам достигает одного миллиарда и сохраняет стабильную тенденцию к увеличению даже в развитых странах. Респираторный хламидиоз, обусловленный *S. pneumoniae*, составляет до 20% в общей структуре пневмоний, а каждые 4–7 лет в европейских странах наблюдаются

эпидемические вспышки этой инфекции (по данным ВОЗ). В результате до 80% населения земного шара в течение своей жизни переболевает респираторным хламидиозом. Наибольшую проблему представляют хронические хламидиозы, которые, как доказано, служат механизмом, запускающим такие тяжелые хронические заболевания, как астма, атеросклероз, артрит, женское и мужское бесплодие, патологии беременности [2, 3].

Отсутствие эффективных средств борьбы с хроническими бактериальными инфекциями и быстрые темпы развития резистентности патогенов к антибактериальным препаратам, применяемым при острых инфекционных процессах, определяет медицинскую и социально-экономическую значимость поиска препаратов нового поколения с использованием мишень-

специфических технологий [4–6]. В случае антибактериальных препаратов эта технология включает выбор в качестве мишеней белков, ответственных за проявление патогенных свойств микроба; последующий поиск специфических ингибиторов с применением компьютерных программ, методов органического синтеза и экспериментального тестирования; подтверждение предсказанной биологической активности на модельных системах инфекционного процесса.

Секреция в клетку макроорганизма факторов патогенности – белков, ответственных за проявление бактериями патогенных свойств, является важнейшим механизмом развития инфекционного процесса. Всего к настоящему времени описано семь систем секреции, характеризующихся различной специфичностью в отношении секретлируемых молекул и различиями в структуре секреторного аппарата. Одна из этих систем, получившая название система секреции типа III (ССТТ), переносит белковые факторы патогенности из бактериальной клетки непосредственно в цитоплазму эукариотической клетки. Такой «молекулярный шприц» найден только у патогенных бактерий, так как именно благодаря его функционированию бактерии с различным типом паразитирования, экзо- и эндопаразиты реализуют свои патогенные свойства [7]. Ввиду консервативности этой структуры у таксономически удаленных микроорганизмов – возбудителей социально значимых инфекций, таких, как *Chlamydia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Brucella* и др., можно рассчитывать, что антибактериальные препараты на основе специфических ингибиторов ССТТ будут обладать широким спектром действия.

У внутриклеточных патогенов, к типичным представителям которых относятся хламидии, транспортная система отвечает за возможность использования регуляторных путей хозяйской эукариотической клетки, фактически подавляя клеточный ответ. ССТТ необходима на всех стадиях жизненного цикла хламидий, она обеспечивает возможность внутриклеточного размножения возбудителя как при острой, так и при хронической инфекции. Блокирование работы ССТТ приводит к подавлению размножения хламидий в условиях *in vitro* [8].

В настоящее время известно несколько ингибиторов ССТТ – низкомолекулярных соединений различных классов, отобранных при помощи высокопроизводительного скрининга библиотек химических соединений [9–13]. Существенным недостатком этих соединений является их плохая растворимость в органических растворителях и воде. Более того, эти ингибиторы обладают значительной токсичностью для клеток млекопитающих, вызывая гибель до 60%

клеток в присутствии специфической ингибирующей концентрации (50 мкМ), что затрудняет их разработку для дальнейшего использования в качестве антибактериальных препаратов.

Цель данной работы состояла в создании фармакологически перспективных соединений для подавления острой и хронической инфекции, которые ингибируют секрецию факторов патогенности хламидий, но лишены указанных недостатков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы и клеточные линии

В работе использовали лабораторный штамм *S. trachomatis* BU-434 серовара L2 (ATCC VR 902B), *S. muridarum* штамм Nigg (ATCC VR-123), штамм *S. pneumoniae* K-6, любезно предоставленный Р. Saikkii (Финляндия), и клеточную линию McCoy В (гибридная линия синовиальных клеток человека и мышечных фибробластов).

Оценка токсичности для эукариотических клеток

Работу проводили с использованием 96- и 24-луночных планшетов и односуточного монослоя клеток. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии различных доз ингибиторов. Цитотоксическое действие препаратов оценивали при помощи трех стандартных методов: окрашивания клеток метиленовым синим; МТТ-теста («Sigma»); и кальцеинового теста (LIVE/DEAD Viability/ Cytotoxicity Kit for mammalian cells, «Invitrogen», США).

Заражение клеток штаммами хламидий

Клетки McCoyВ заражали хламидиями с множественностью инфекции 1 (МОИ 1) согласно стандартной методике [3].

Иммунофлуоресцентная детекция накопления хламидий

Внутриклеточные хламидийные включения детектировали методом прямой иммунофлуоресценции (ПИФ) с применением моноклональных видоспецифических антител к белку МОМР наружной мембраны *S. trachomatis* и родоспецифических антител к ЛПС хламидий, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) (ООО «Ниармедик Плюс», Москва).

Оценка жизнеспособности хламидий

Жизнеспособность хламидий оценивали полуколичественным методом, основанным на иммунофлуоресценции. Лизаты инфицированных клеток высевали на новый монослой клеток. С этой целью 48-часовой монослой инфицированных клеток снимали сахарозофосфатно-глутаминовым буфером (SPG) и лизирова-

ли замораживанием. Готовили необходимые разведения лизатов, которые высевали на новый монослой. Клетки инкубировали в течение 48 ч, фиксировали и окрашивали мечеными ФИТЦ моноклональными антителами для последующей оценки результатов с помощью люминесцентной микроскопии. Количество инфицированных клеток определяли в 10 произвольных полях зрения и подсчитывали среднее число включениеобразующих единиц (ВОЕ) в 1 мл образца (использовали результаты трех независимых экспериментов).

Детекция эффекторного белка IncA *C. trachomatis*

Суточный монослой клеток McCoу заражали *C. trachomatis* с МОИ, равной пяти. Через 8 ч после заражения (время начала транслокации эффекторного белка в мембрану включения) добавляли исследуемые соединения в разных дозах. Через 24 ч клетки окрашивали первичными анти-IncA-антителами («Innovagen», Швеция) и вторичными, мечеными ФИТЦ. Параллельно клетки окрашивали моноклональными антителами к белку МОМР *C. trachomatis*.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Клетки культивировали и заражали в 6-луночных планшетах. Осадок клеток, полученный центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин (Rotanta 460R, Hettich), фиксировали по методу Ito-Karnovsky. Для этого использовали постфиксацию OsO₄ и контрастирование в водном растворе уранилацетата. Далее проводили дегидратацию образцов в серии спиртов восходящей концентрации, инфльтрацию в смеси смолы LR White и 100% этанола (1 : 1) в течение 1 ч, затем в чистой смоле в течение 12 ч при +4°C. Полимеризацию смолы проводили при +56°C в течение 24 ч. После этого получали ультратонкие срезы, которые контрастировали раствором свинца по Рейнольдсу и анализировали с помощью ТЭМ Jeol 100В.

Выделение РНК и анализ экспрессии генов

РНК выделяли из культуры клеток через 24 ч после заражения с использованием реагента Trizol («Invitrogen»). Концентрацию РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (DNA-free™, «Ambion»), определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-100 («ThermoFisher Scientific», США). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием набора «Reverse Transcription System» («Promega», США).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с полученной кДНК проводили с праймерами к следующим генам: 16S рРНК (primer forward 5'-GGCGTATTTGGGCATCCGAGTAACG, primer reverse 5'-ТCAAATССА-

GCGGGTATTAACCGCCT, Pb 5'-R6G-TGG CGG CCA ATC TCT CAA TCC GCC TAG A-BHQ2), *trpA* (primer forward 5'-CGG GAA TAA ATG GTG TGT GCG T, primer reverse 5'-TAAAGACATCCGTTCCG-GCGTT, Pb 5'-ROX-ATC TTC CAG CAC STT TAT CAC ACG GAG A-BHQ2), *incA* (primer forward 5'-СТА CAG AAG AAA TGC GCA AAC TTT, primer reverse 5'-AAT GAT TGC TGG TTA TGC GCT AAT, Pb 5'-FAM-CGG CGA ACT TCT TCT GCT AAT GGG GTT-BHQ1), *lcrE* (primer forward 5'-GAG GCT GTG TTG AGG TAG GT, primer reverse 5'-CGA TAA ATG CGG ATA ATG AGG AT, Pb 5'-FAM-AGG TAC TGG AGC ATG AGG AGG CGT A-RTQ1). ПЦР-РВ проводили на амплификаторе CFX 96 («Bio-Rad Lab.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ структурного сходства известных ингибиторов ССТТ

Среди известных ингибиторов ССТТ [9–13] наиболее хорошо изучены соединения класса гидразонов на основе гидразидов ароматических карбоновых кислот и различных салициловых альдегидов (IV). На рис. 1 приведены структуры веществ, подавляющих ССТТ.

Эти молекулы обладают некоторым сходством – все они содержат остаток салициловой, 4-гидроксибензойной кислот и их производных (эти остатки выделены зеленым). Кроме того, можно отметить структурное сходство сочленения производных салициловых кислот с остальной частью молекулы (от-

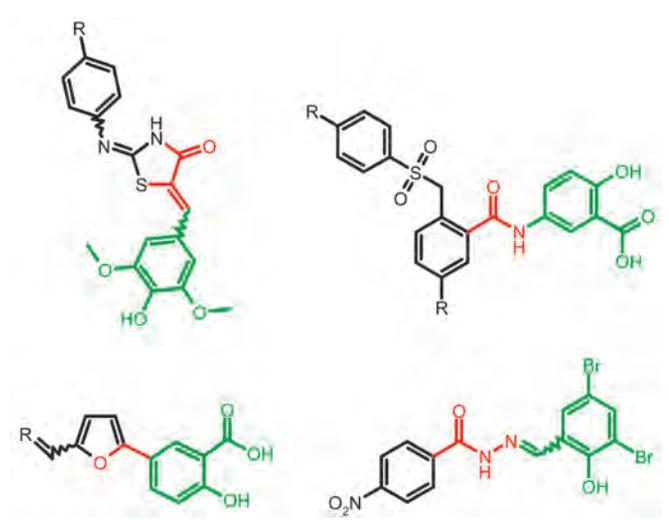


Рис. 1. Структуры различных классов соединений – известных ингибиторов ССТТ.

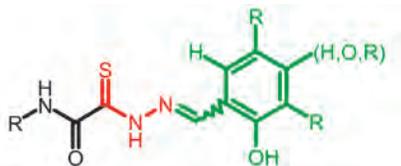


Рис. 2. Общая формула тиогидразонов тиогидразидов оксаминовых кислот.

мечено красным). Исходя из теории биоизостерических замен [14, 15], согласно которой карбонильная и тиокарбонильная группы функционально взаимозаменяемы в биологических системах, можно предположить, что действие тиогидразонов оксаминовых кислот и различных салициловых альдегидов должно быть аналогичным действию гидразонов. Данный класс соединений относительно новый, и его биологические свойства до настоящего времени оставались практически неизученными.

С использованием тиогидразонов тиогидразидов оксаминовых кислот в качестве возможных ингибиторов ССТТ предполагалось решить следующие задачи.

Получить вещества с низкой токсичностью в отношении эукариотических клеток.

Получить вещества с высокой селективной активностью в отношении ССТТ.

Получить вещества с хорошими фармакокинетическими свойствами.

Разработать простую схему синтеза нужных веществ.

Получение тиогидразонов и тестирование их способности ингибировать ССТТ, токсичности и активности *in vitro*

Тиогидразоны оксаминовых кислот (рис 2.) синтезировали согласно довольно простой схеме [16], представленной на рис. 3.

Видно, что, используя различные коммерчески доступные амины и альдегиды, путем несложных химических превращений можно получить большое количество соединений. Всего синтезировано около 300 веществ, из которых для дальнейшего тестирования

отобран ряд соединений, обладающих хорошей растворимостью. Всего таких соединений оказалось 120, так как, несмотря на лучшую, чем у гидразонов, растворимость, тиогидразоны в целом являются мало растворимыми.

В первую очередь оценивали токсичность отобранных таким образом соединений. Сначала применяли метод окрашивания клеток метиленовым синим. Соединения, которые имели удовлетворительные показатели токсичности, далее тестировали с помощью кальцеинового и МТТ-тестов. В результате было отобрано 15 соединений (табл. 1), показавших приемлемую токсичность при концентрации 50 мкМ (гибель менее 30% клеток). Все эти соединения содержали остатки различных фторпроизводных анилина и производных салицилового и 4-гидроксibenзальдегида.

Известно, что ингибиторы ССТТ хламидий подавляют внутриклеточное размножение возбудителя в условиях *in vitro*. Проверка способности отобранных соединений подавлять хламидийную инфекцию, выполненная на клеточных культурах, показала, что все они обладали ингибирующей активностью (табл. 2).

Методом иммунофлуоресценции определили способность этих соединений подавлять транслокацию эффекторного белка IncA *S. trachomatis*. Оказалось, что все проверенные соединения ингибировали эффекторную функцию ССТТ хламидий.

Таким образом были отобраны новые ингибиторы ССТТ *S. trachomatis*, принадлежащие к классу тиогидразонов тиогидразидов оксаминовых кислот, все они подавляли размножение хламидий в клеточных культурах. Присутствие атома фтора повышало, вероятно, липофильность отобранных молекул, что позволяло им легко проходить через биологические мембраны и, предположительно, повышало стабильность к действию различных ферментов [17]. Кроме того, включение производных салицилового и 4-гидроксibenзальдегидов позволило получить соединения с лучшей растворимостью и активностью.

Изучение стабильности и природы токсичности тиогидразонов

Из 15 ингибиторов ССТТ, отобранных по совокупности проведенных тестов, для детального изучения стабильности при хранении в различных условиях

Рис. 3. Получение тиогидразонов на основе тиогидразидов оксаминовых кислот: а – хлорацетилхлорид, ДМФА, б – 1) ТЭА, сера элементарная, морфолин, ДМФА; 2) ДМФА, гидразингидрат, в – метанол, соответствующий альдегид R¹.

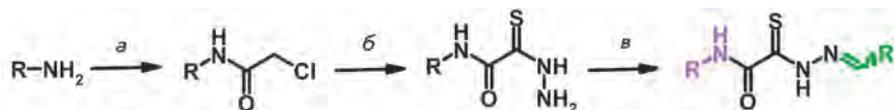


Таблица 1. Показатели токсичности отобранных соединений – тиогидразонов тиогидразидов оксаминовых кислот

№ соединения	Структура	Окрашивание метиленовым синим, % погибших клеток			Кальцеиновый тест, % погибших клеток			МТТ-тест, % метаболически неактивных клеток		
		12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ
1		0±2	12±2	23±2	0±2	11±2	20±2	3±1	12±3	29±3
2		2±2	13±1	24±3	3±2	12±1	21±3	3±2	15±1	31±5
3		6±4	20±2	27±2	5±4	16±2	23±2	2±2	15±5	30±4
4		5±1	15±2	28±2	6±1	12±2	23±2	3±3	13±4	28±2
5		2±1	14±2	26±3	3±1	16±2	22±3	4±3	20±4	29±6
6		2±1	15±2	26±2	5±1	12±2	24±2	2±4	17±5	27±8
7		2±2	15±4	29±5	4±2	16±4	22±5	4±5	18±3	29±9
8		2±1	14±1	24±4	6±1	12±1	24±4	3±3	15±3	28±4
9		2±1	12±1	24±4	4±1	15±1	25±4	4±5	20±4	30±4
10		2±1	12±2	24±2	5±1	14±2	22±2	3±3	19±3	31±7
11		1±1	12±1	21±4	4±1	13±1	25±4	5±1	16±2	30±5
12		0±1	11±1	22±3	3±1	10±1	24±3	5±5	15±4	29±6
13		2±1	15±2	26±3	2±1	11±2	25±3	5±4	14±3	29±7
14		4±1	15±1	25±4	3±1	12±1	22±4	3±5	17±3	28±6
15		0±1	11±2	22±3	0±1	10±2	21±3	4±1	13±3	29±5

были выбраны три. Оказалось, что в сухом виде эти соединения длительное время оставались стабильными (по данным ТСХ), тогда как в растворах их активность быстро падала.

При анализе опубликованных данных [18, 19] было установлено, что для тиогидразонов характерно наличие кольчато-цепной таутомерии. Циклические тау-

томеры (тиадиазолины **II**) легко окисляются под действием кислорода воздуха, в результате образуются неактивные и токсичные тиадиазолы **III** (рис. 4).

Данные предположения были подтверждены экспериментально путем синтеза предполагаемых тиадиазолов и ЯМР-исследованиями растворов тиогидразонов оксаминовых кислот. Установлено,

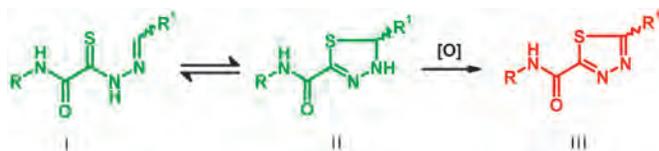


Рис. 4. Кольчато-цепная таутомерия тиогидразонов и продукт окисления – триадиазол.

что в растворах тиогидразонов действительно присутствует и циклическая, и линейная формы, а продукты окисления в растворах идентичны направленно синтезированным триадиазолам.

Внимание обращали не только на стабильность, но и на результаты МТТ-теста, которые указывали на довольно высокую токсичность данных соединений, обусловленную подавлением дыхательной активности клетки, а также нарушением ее окислительно-восстановительного потенциала. Анализ опубликованных данных позволил предположить, что на токсичность влияет открытая и довольно активная тиокарбонильная группа, которая связывается с восстановленным глутатионом и приводит к развитию окислительного стресса. Эта гипотеза была подтверждена в опытах с добавлением глутатиона к культуральной среде, в которых наблюдали снижение токсичности на 30–40%.

Таким образом, необходимо было повысить стабильность и понизить токсичность полученных соединений так, чтобы это не отразилось на их активности и специфичности воздействия.

Модификация тиогидразонов с целью повышения стабильности и снижения токсичности

Для повышения стабильности и снижения токсичности тиогидразонов нужно было модифицировать

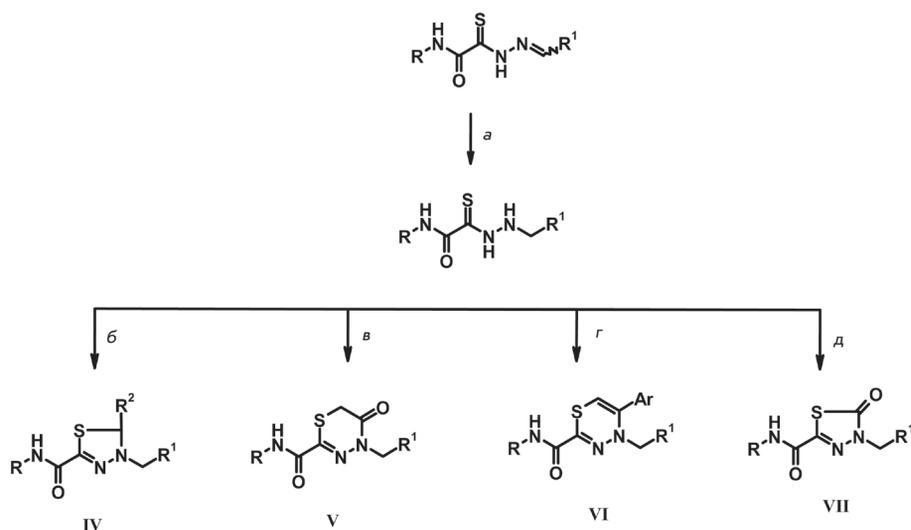


Рис. 5. Получение различных гетероциклических соединений, исключая наличие таутомерии и содержащих закрытую тиокарбонильную группу: а – боргидрид натрия, метанол, б – альдегид R², изо-пропанол, соляная кислота, в – хлоруксусная кислота, изо-пропанол, ацетат аммония, г – этанол, α-бромкетон, ацетат натрия, д – карбонилдиимидазол, тетрагидрофуран.

Таблица 2. Ингибирование внутриклеточного развития *C. trachomatis* под действием тестируемых соединений

№ соединения	Ингибирование развития <i>C. trachomatis</i> (% подавления инфекции) при различных концентрациях ингибитора, мкМ		
	12.5	25	50
1	30±4	99±7	100±1
2	70±5	98±3	100±1
3	1±1	30±6	60±5
4	5±2	10±5	60±11
5	0±1	10±3	75±6
6	20±4	40±5	90±12
7	15±3	85±8	100±2
8	5±3	10±5	90±13
9	30±8	40±7	90±10
10	0±2	10±7	98±3
11	10±2	90±7	100±1
12	0±1	70±15	100±3
13	15±5	70±14	100±15
14	15±4	45±7	100±3
15	40±3	85±8	100±2

их структуру таким образом, чтобы исключить образование таутомерных форм и открытой реакционноспособной тиокарбонильной группы.

Данная задача была решена путем синтеза нескольких гетероциклических соединений на основе восстановленных тиогидразонов согласно схеме, приведенной на рис. 5.

Синтезированные гетероциклические производные тиогидразонов оксаминовых кислот обладали

Таблица 3. Показатели токсичности триазинов

№ соединения	Структура	Окрашивание метиленовым синим, % погибших клеток			Кальцеиновый тест, % погибших клеток			МТТ-тест, % метаболически неактивных клеток		
		12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	12.5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ
16		0±2	5±2	10±2	0±1	6±2	12±3	1±2	8±3	13±3
17		0±2	6±1	11±3	0±3	7±2	10±3	0±2	9±3	14±4
18		0±1	4±2	9±2	0±2	8±1	12±3	0±1	9±2	15±3
19		0±1	6±2	11±2	0±1	5±1	13±4	0±1	8±3	13±3
20		0±1	5±2	12±3	0±2	6±2	14±2	0±1	8±3	14±4
21		0±1	6±2	9±2	0±1	7±2	12±3	0±1	9±3	14±3
22		0±2	5±4	10±5	0±3	6±3	12±4	1±2	8±3	15±4
23		0±2	7±1	12±4	0±1	6±2	13±3	0±2	9±3	14±5
24		0±1	4±1	10±4	0±1	6±1	14±3	0±1	10±3	17±4
25		0±3	6±2	11±2	0±2	7±2	12±3	1±3	9±2	14±3
26		0±1	7±1	12±4	0±2	6±3	13±3	0±1	8±3	14±2
27		0±2	5±1	10±3	0±3	7±2	11±3	1±2	8±3	13±3

большей растворимостью, чем исходные продукты, поэтому оценили их токсичность и способность ингибировать ССТТ. Соединения, относящиеся к группам **IV** и **V**, проявили низкую токсичность и показали специфическую активность в отношении ССТТ,

в то время как соединения групп **VI** и **VII** подобной активностью не обладали.

Соединения группы **IV** оказались нестабильными в растворах (по данным ТСХ при хранении растворов при +20°C продукты распада обнаруживались через

Таблица 4. Ингибирование развития *C. trachomatis* в культуре клеток

№ соединения	Ингибирование развития <i>C. trachomatis</i> (% подавления инфекции) при различных концентрациях ингибитора, мкМ		
	12.5	25	50
16	15±5	40±8	87±6
17	24±3	69±6	100±5
18	7±2	26±7	63±6
19	12±3	37±6	65±8
20	9±3	26±7	59±7
21	15±7	42±7	86±10
22	2±4	23±6	52±4
23	34±6	78±8	100±2
24	30±8	69±6	98±4
25	25±5	59±6	95±5
26	24±3	82±9	100±2
27	27±4	65±10	100±2

24 ч). Соединения группы V имели приемлемые показатели. На основе фторсодержащих тиогидразонов оксаминовых кислот было синтезировано 12 соединений группы V.

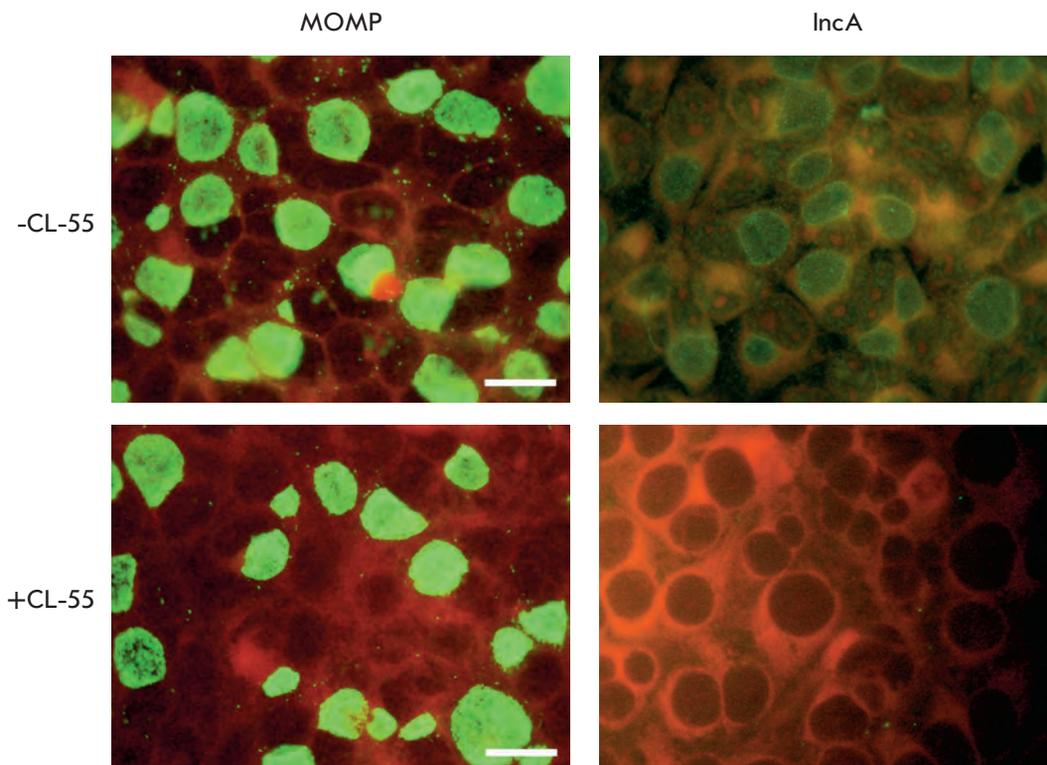
Все эти соединения были значительно менее токсичными в отношении эукариотических клеток, чем известные и полученные нами ранее ингибиторы ССТТ (табл. 3).

Показано, что синтезированные нами тиадиазины дозозависимо подавляют развитие внутриклеточной инфекции. Четыре соединения в концентрации 50 мкМ полностью подавляли инфекционный процесс в культуре клеток (табл. 4). Сравнение результатов определения токсичности и активности позволило выбрать одно наиболее эффективное соединение. Это соединение, названное CL-55, использовали для дальнейшего более детального изучения биологических свойств.

Подавление эффекторной функции ССТТ синтезированным ингибитором

Специфическую активность химических соединений, т.е. их способность ингибировать функции третьей транспортной системы (ССТТ), изучали с использованием метода, основанного на детекции эффекторного белка *C. trachomatis*. Одним из эффекторных белков этого патогена является белок IncA, который синтезируется в бактериальной клетке, а затем секре-

Рис. 6. Подавление транслокации эффекторного белка *C. trachomatis* IncA в мембрану внутриклеточного включения при действии ингибитора ССТТ CL-55. Клетки McSoy инфицировали *C. trachomatis*, через 8 ч в культуральную среду вносили CL-55 в концентрации 50 мкМ и культивировали в течение еще 24 ч. Хламидийные включения окрашивали антителами к белку наружной мембраны *C. trachomatis* МOMP или к белку IncA и просматривали в люминесцентном микроскопе (зеленое свечение). Масштабная линейка – 20 мкм.



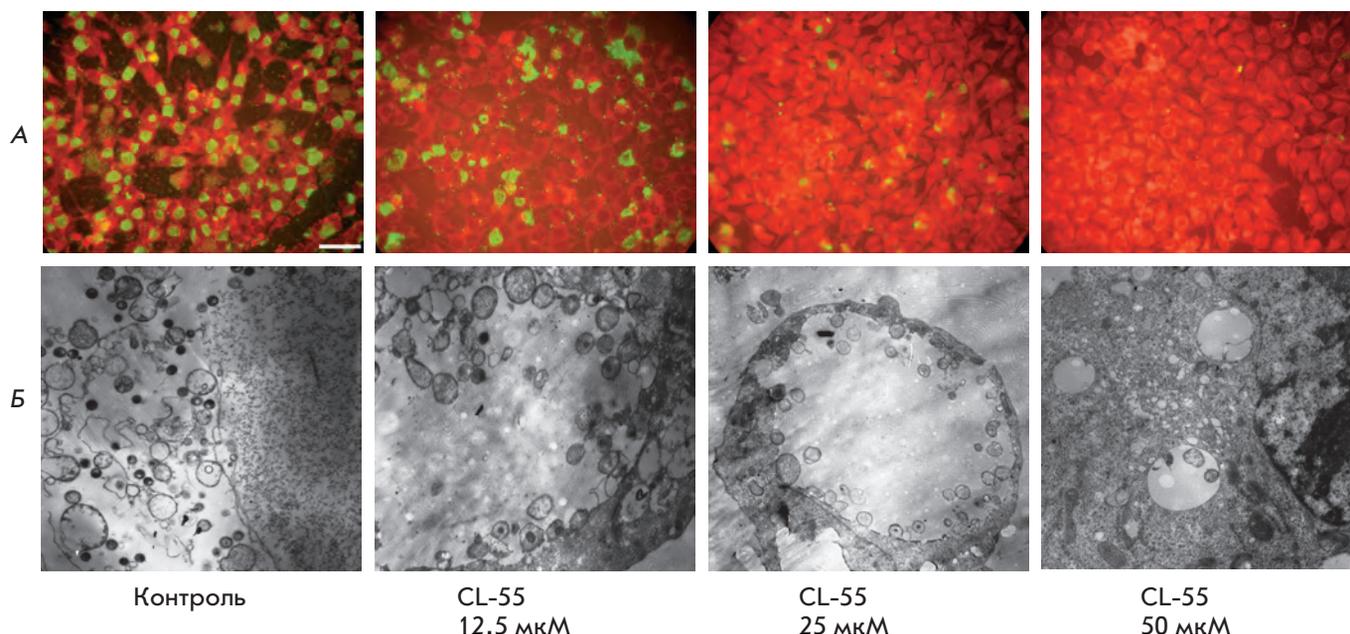


Рис. 7. Дозозависимое ингибирование внутриклеточного цикла развития *C. trachomatis* при действии CL-55. А – Люминесцентная микроскопия после окрашивания антителами к белку МОМР *C. trachomatis*. Масштабная линейка – 10 мкм. Б – Трансмиссионная электронная микроскопия. Увеличение: контроль $\times 4000$, CL-55 (12.5 мкМ) $\times 10000$, CL-55 (25 мкМ) $\times 4000$, CL-55 (50 мкМ) $\times 10000$.

тируется и встраивается в мембрану хламидийного включения. Известно, что этот белок синтезируется через 6 ч после начала инфекции, а через 8 ч появляется на поверхности включения. В составе мембраны включения белок IncA можно обнаружить с помощью специфических антител. На рис. 6 показано подавление транслокации эффекторного белка IncA ССТТ *C. trachomatis* выбранным ингибитором. Окрашивание клеток антителами к белку наружной мембраны хламидий (МОМР) выявляет мелкие включения, размер которых коррелирует со сроками инфекции.

Другой тест, позволяющий оценить специфичность соединений в отношении ССТТ, основан на том, что транслоцируемый с помощью ССТТ хламидийный белок IncA участвует в процессе слияния отдельных включений, развивающихся внутри клетки. Окрашивание инфицированных клеток антителами к белку МОМР показало, что при внесении через 8 ч после заражения соединения, действующего на ССТТ, в цитоплазме образуются несколько мелких, не слившихся включений, тогда как в контрольных клетках наблюдали крупные включения, по одному в каждой клетке (рис. 6).

Влияние ингибитора ССТТ на морфологию внутриклеточных включений *C. trachomatis*

Влияние ингибитора ССТТ, CL-55, на внутриклеточное развитие возбудителя изучали с помощью люми-

несцентной и электронной микроскопии. Культуру клеток McCoу инфицировали *C. trachomatis*, одновременно в среду культивирования вносили ингибитор в разных концентрациях (12.5, 25 и 50 мкМ). Через 48 ч клеточные культуры анализировали иммунофлуоресцентными методами и с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Действие соединения CL-55 на внутриклеточное развитие хламидий выражалось в снижении количества инфицированных клеток, а также размера включений. Уже в дозе 12.5 мкМ число включений составляло 80% от контроля, при этом сами включения были мельче. Концентрация CL-55, равная 25 мкМ, приводила к подавлению накопления хламидий на 50%. Средний размер включений был в несколько раз меньше, чем в контроле. При использовании CL-55 в дозе 50 мкМ полноценные включения практически отсутствовали (рис. 7).

Электронно-микроскопическое исследование клеток выявило снижение размера включений, а также значительное уменьшение количества бактерий, находящихся внутри одного включения. Кроме того, следует отметить, что в контроле наблюдалась характерная картина завершения жизненного цикла хламидий: подавляющее большинство хламидий внутри включений были представлены внеклеточными формами – элементарными тельцами, часть включений была разрушена. При действии ингиби-

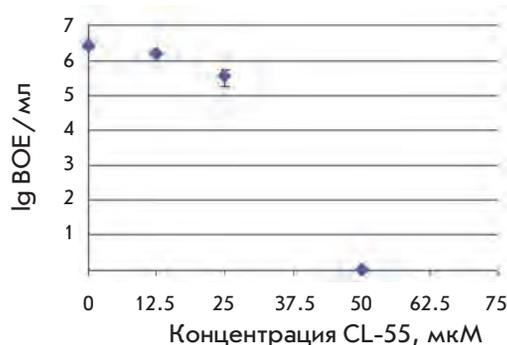


Рис. 8. Подавление жизнеспособности *C. trachomatis* после воздействия CL-55 в разных концентрациях.

тора ССТТ внутриклеточные хламидии находились в состоянии ретикулярных телец. При концентрации 50 мкМ в клетках наблюдались единичные очень мелкие включения, содержащие аномальные бактериальные клетки. Тем самым было показано, что выбранный ингибитор ССТТ дозозависимо подавлял внутриклеточное размножение *C. trachomatis*.

Влияние соединения CL-55 на жизнеспособность *C. trachomatis*

Влияние ингибитора ССТТ на развитие хламидий оценивали также полуколичественным методом определения инфекционных свойств патогена в условиях *in vitro*. Подсчет числа инфекционных частиц *C. trachomatis* после действия разных концентраций ингибитора показал дозозависимое снижение (рис. 8) и полное подавление жизнеспособности в присутствии 50 мкМ CL-55. При этом при меньших концентрациях соединения значительная часть формирующихся включений имела атипичную морфологию. При дальнейшем пассировании не наблюдали образование внутриклеточных включений.

Действие соединения CL-55 на экспрессию генов *C. trachomatis*

На данном этапе изучали влияние ингибитора ССТТ на активность конститутивных генов, 16S рРНК и *trpA*, гена триптофанового оперона, а также на экспрессию гена *incA*, кодирующего синтез эффекторного белка, и гена *lcrE* регуляторного белка ССТТ *C. trachomatis*. Ингибитор вносили в момент заражения клеток, а через 24 ч выделяли РНК и анализировали экспрессию генов с помощью количественного варианта ПЦР в реальном времени.

Активность гена 16S рРНК снижалась в 4 раза при использовании соединения в концентрации 25 мкМ и в 29 раз – в концентрации 50 мкМ. В даль-

нейшем все пробы нормировали по кДНК гена 16S рРНК. Активность генов *trpA* и *incA* при действии 25 и 50 мкМ CL-55 не изменялась по сравнению с контролем. Эти данные свидетельствуют, во-первых, об отсутствии выраженного действия ингибитора на метаболизм патогена, а во-вторых, о том, что ингибитор не влиял на экспрессию гена эффекторного белка *IncA* на уровне транскрипции. В присутствии 50 мкМ ингибитора экспрессия гена *lcrE*, кодирующего белок-регулятор ССТТ, снижалась на 90%. В настоящее время продолжается изучение влияния соединения CL-55 на экспрессию ССТТ-специфичных генов хламидий, с целью понимания механизма действия выбранного ингибитора.

Действие ингибитора CL-55 на внутриклеточное развитие других видов хламидий

С помощью описанных выше методов мы оценили влияние выбранного ингибитора ССТТ на внутриклеточное размножение представителей двух других видов семейства Chlamydiaceae: *C. pneumoniae* и *C. muridarum*. Установили универсальность действия ингибитора в отношении других хламидий, так как CL-55 в концентрации 50 мкМ полностью подавлял как внутриклеточное накопление, так и жизнеспособность этих видов хламидий.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска новых антибактериальных препаратов, эффективных в отношении как острых, так и хронических инфекций, в качестве мишени была выбрана система секреции типа III, найденная только у патогенных бактерий. Этот секреторный аппарат, так называемый «молекулярный шприц», начинает формироваться после контакта с эукариотической клеткой, образует пору в мембране клетки-мишени, после чего факторы патогенности поступают непосредственно в цитоплазму хозяйской клетки [20]. ССТТ функционирует и при внутриклеточной локализации патогена. Транспорт факторов патогенности приводит к реорганизации цитоскелета, блокированию апоптоза, модификации аппарата транскрипции и трансляции эукариотической клетки, модуляции продукции цитокинов и других процессов хозяйской клетки, что способствует инвазии патогена, блокированию защиты хозяина и установлению длительной персистенции [21]. ССТТ абсолютно необходима для развития острого инфекционного процесса, а хронизация инфекции принципиально зависит от ее функционирования. Таким образом, специфическое ингибирование работы ССТТ должно прерывать инфекционный процесс как на ранних стадиях, так и при его хроническом течении, позволяя иммунной системе элиминировать патоген.

Поиск новых эффективных ингибиторов ССТТ мы проводили по следующей схеме. В результате структурного анализа известных ингибиторов ССТТ в молекулах органических соединений разных классов были найдены сходные участки. Это позволило сконструировать новый класс соединений, обладающих антибактериальной активностью, специфичной в отношении ССТТ. Синтезировано значительное число таких соединений, что позволило провести экспериментальный скрининг на клеточных тестах и отобрать из них 15, специфично подавляющих ССТТ хламидий в условиях *in vitro*, с целью изучения соотношения структура–свойство. В дальнейшем проводили химическую модификацию отобранных соединений с целью улучшения их растворимости, стабильности и биологической активности, снижения токсичности для эукариотических клеток, повышения специфической эффективности.

Это позволило получить новый ингибитор ССТТ, относящийся к классу гетероциклических соединений. Это низкомолекулярное соединение блокировало эффекторную функцию ССТТ *C. trachomatis*. Так, после действия CL-55 на мембране хламидийного включения не выявлялся IncA – один из ранних эффекторных белков ССТТ, а также нарушался процесс гомотипичного слияния фагосом, опосредованный данным белком. Анализ экспрессии гена *incA* показал, что при действии ингибитора транскрипция этого гена не снижается. Тем самым можно заключить, что выбранное соединение специфически блокирует процесс транслокации эффекторного белка хламидий.

Соединение CL-55 не оказывало выраженного ингибирующего эффекта на уровень экспрессии конститутивных генов *C. trachomatis*, что соответствует известному механизму действия ингибиторов ССТТ, согласно которому ингибитор действует на функционирование секреторного аппарата, а не на метаболизм бактериальной клетки. При этом наблюдали существенное снижение активности гена одного из ключевых регуляторов ССТТ хламидий – белка CopN. В норме этот ген экспрессируется на всех стадиях внутриклеточного жизненного цикла хламидий. Выполняя функции белка-шаперона, он участвует в контроле секреции белков семейства Inc на ранних этапах внутриклеточного развития, а также регулирует опосредованный ССТТ процесс дифференцировки ретикулярных телец хламидий в элементарные тельца на этапе завершения жизненного цикла. Важно отметить, что сам процесс пролиферации ретикулярных телец зависит от непосредственного контакта с мембраной включения и взаимодей-

ствия с транслоцированными в нее эффекторными белками. Белок CopN, как негативный регулятор, снижает экспрессию основных эффекторов на мембране включения (в том числе IncA) и закрывает канал, препятствуя транслокации других эффекторов ССТТ [22]. Наблюдаемое снижение экспрессии гена, кодирующего этот регуляторный белок, может свидетельствовать о специфическом действии выбранного ингибитора на процесс контроля работы ССТТ хламидий. В настоящее время продолжается изучение влияния ингибитора CL-55 на активность целого ряда генов, контролирующих активность ССТТ *C. trachomatis*.

В связи с тем, что функционирование ССТТ хламидий определяет возможность внутриклеточного развития патогена, специфический ингибитор ССТТ должен нарушать жизненный цикл, блокируя инфекционный процесс как при острой, так и персистентной форме инфекции. Созданный нами ингибитор подавлял размножение трех видов хламидий – *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. muridarum*, на моделях клеточных культур. Это выражалось в изменении морфологии хламидийных включений, нарушении процесса преобразования ретикулярных телец в элементарные тельца, ингибировании инфекционных свойств патогена. Кроме того, нами показано (результаты не представлены), что выбранный ингибитор блокировал секрецию эффекторных белков ССТТ сальмонелл, представителя таксономически неродственной группы патогенных бактерий, что может свидетельствовать об универсальности полученного ингибитора ССТТ. Данное соединение при этом не оказывало бактерицидного эффекта на целый ряд грамотрицательных и грамположительных бактерий, представителей нормальной микрофлоры.

Таким образом, в результате направленного химического синтеза, экспериментального скрининга и химической оптимизации получен новый ингибитор ССТТ, относящийся к классу гетероциклических соединений. Это соединение находится в настоящее время на стадии изучения терапевтической активности на экспериментальных животных и фармакокинетических свойств с целью дальнейшей разработки на его основе антибактериального лекарственного средства, эффективного в отношении острых и хронических форм инфекции. ●

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 16.512.11.2248 по заказу Департамента приоритетных направлений науки и технологий Министерства образования и науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шинский Г.Э., Мерзляков В.А., Тимофеева С.Б. // Вестн. дерматологии и венерологии. 1999. № 1. С. 11–13.
2. Dean D. // *Drugs Today (Barc.)*. 2009. V. 45. P. 25–31.
3. Bashmakov Y.K., Zigangirova N.A., Pashko Y.P., Kapotina L.N., Petyaev I.M. // *Comp. Hepatol.* 2010. V. 28. P. 3–9.
4. Зигангирова Н.А. 150 лет со дня рождения Н.Ф. Гама-леи: Сб. научных трудов. М.: ООО «Дизайн-студия А4», 2009. С. 49–61.
5. Зигангирова Н.А., Федина Е.Д., Зорина В.В., Борцов П.А., Токарская Е.А., Карягина А.С., Алексеевский А.В., Кра-юшкин М.М., Заякин Е.С., Гинцбург А.Л. // *Журн. микро-биологии, эпидемиологии и инфектологии*. 2009. № 4. С. 71–77.
6. Гинцбург А.Л., Зигангирова Н.А., Зорина В.В. // *Вестник РАМН*. 2008. № 10. С. 34–39.
7. Erhardt M., Namba K., Hughes K.T. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010. doi: 10.1101/cshperspect.a000299
8. Карягина А.С., Алексеевский А.В., Спирин С.А., Зигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. // *Молекуляр. биология*. 2009. Т. 43. № 6. С. 963–983.
9. Felise H.B., Nguyen H.V., Pfuetzner R.A., Barry K.C., Jackson S.R., Blanc M.P., Bronstein P.A., Kline T., Miller S.I. // *Cell Host & Microbe*. 2008. V. 4. P. 325–336.
10. Bailey L., Gylfe A., Sundin C., Muschiol S., Elofsson M., Nordström P., Henriques-Normark B., Lugert R., Waldenström A., Wolf-Watz H., et al. // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. P. 587–595.
11. Tautz L., Bruckner S., Sareth S., Alonso A., Becattini B., Salvesen G.S., Mustelin T. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 10. P. 9400–9408.
12. Kauppi A.M., Andersson C.D., Norberg H.A., Sundin C., Linusson A., Elofsson M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2007. V. 15. № 22. P. 6994–7011.
13. Kauppi A.M., Nordfelth R., Uvell H., Wolf-Watz H., Elofsson M. // *Chem. Biol.* 2003. V. 10. P. 241–249.
14. Patani G.A., LaVoie E.J. // *Chem Rev.* 1996. V. 96. № 8. P. 3147–3176.
15. Yang H., Hendricks R.T., Arora N., Nitzan D., Yee C., Lucas M.C., Yang Y., Fung A., Rajyaguru S., Harris S.F., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. № 15. P. 4614–4619.
16. Гинцбург А.Л., Зигангирова Н.А., Токарская Е.А., Зорина В.В. // Патент № 2400471 от 27.09.2010 г. РФ. C07D 213/75, C07D 338/38, C07C 327/56, C07C/225/16.
17. Hagmann W.K. // *J. Med. Chem.* 2008. V. 51. № 15. P. 4359–4369.
18. Зеленин К.Н., Хрусталева В.А., Алексеев В.В., Шарбатян П.А., Лебедев А.Т. // *Химия гетероцикл. соед.* 1982. № 7. С. 904–910.
19. Lempert-Sreter M., Lempert K., Möller J. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1983. V. 1. № 9. P. 2011–2020.
20. Cornelis G.R. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 811–825.
21. Hoare A., Timms P., Bavoil P.M., Wilson D.P. // *BMC Microbiol.* 2008. V. 8. P. 5–16.
22. Delphine S., Beeckman A., Daisy C., Vanrompay G. // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2010. V. 12. P. 17–42.

УДК 612.115.12:612.115.3

Рекомбинантный человеческий циклофилин А тормозит образование фибринового сгустка *in vitro*

Ю. А. Морозов^{1*}, Л. М. Хромых², И. И. Дементьева¹, М. А. Чарная¹, Н. Л. Куликова³,
Д. Б. Казанский²

¹Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского РАМН, 119991, Москва, Абрикосовский пер., 2

²Научно-исследовательский институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское ш., 24

³ОАО «Институт инженерной иммунологии», 142380, Московская обл., Чеховский район, пос. Любучаны

*E-mail: moroz_111@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.03.2012 г.

РЕФЕРАТ Хемотаксические свойства циклофилина А хорошо изучены в отличие от его гемостатических эффектов. Показано, что рекомбинантный человеческий циклофилин А (ЦФА), в отличие от гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, способен тормозить образование фибринового сгустка *in vitro*, нарушая тем самым пространственную динамику роста сгустка крови. Этот эффект кратковременный и дозозависимый. Выдвинута гипотеза, согласно которой конформационные изменения тромбина в комплексе с ЦФА возможно опосредуют антикоагулянтное действие ЦФА на автоволновые процессы свертывания крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рекомбинантный человеческий циклофилин А, пространственная динамика роста сгустка, антикоагулянтное действие.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЦФА – рекомбинантный человеческий циклофилин А; ГКСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

ВВЕДЕНИЕ

Циклофилин А – белок с молекулярной массой около 20 кДа, который проявляет цис-транс-изомеразную активность и имеет широкий спектр разнообразных функций. Циклофилин А продуцируется клетками тимуса и обладает хемотаксическим действием, регулируя миграцию стволовых клеток из костного мозга на периферию [1]. Активированные макрофаги также секретируют ЦФА, который привлекает зрелые моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и активированные Т-клетки к очагу воспаления [2].

Однако участие этого белка в функционировании системы гемостаза изучено недостаточно. Известно, что гладкомышечные клетки сосудистой стенки секретируют ЦФА при гипоксии и окислительном стрессе, а при повреждении сосудистой стенки активированные тромбоциты способны выделять ЦФА [3], который, в свою очередь, стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов [4] и таким образом способствует развитию регенеративных процессов.

В представленной работе изучено влияние *in vitro* рекомбинантного человеческого циклофилина А на рост фибринового сгустка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантный человеческий ЦФА получали, используя клетки *Escherichia coli* BL21, трансформированные плазмидой pCuPAwt/pGEX-2TK, кодирующей слитый белок GST-CuPA. Генетическая конструкция использована с любезного разрешения М. Bukrinsky (Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, США). Синтез GST-CuPA индуцировали, добавляя 0.2 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 100 мкМ. Клетки осаждали центрифугированием, суспендировали в Na-K-фосфатном буфере (pH 7.3) и разрушали ультразвуком. Лизат клеток центрифугировали, надсадок наносили на колонку GSTrap FF («GE Healthcare»). Слитый белок GST-CuPA элюировали 50 мМ Трис-HCl-буфером, pH 8.0, содержащим 10 мМ восстановленного глутатиона. Фракции, содержащие GST-CuPA, объединяли, переводили в раствор 10 мМ Трис-HCl (pH 8.0) на колонке HiTrap Desalting («GE Healthcare») и наносили на колонку MonoQ 5 × 50 («GE Healthcare»). Элюцию проводили градиентом 1 М хлорида натрия (0–1 М) в 10 мМ Трис-HCl, pH 8.0. Фракции, содержащие GST-CuPA, переводили диа-

Влияние инкубации в течение 30 мин и 3 ч богатой тромбоцитами плазмы с рекомбинантным человеческим циклофилином А на параметры пространственной динамики роста сгустка

Проба	ЗРС, мин	НСП, мин	ССР, мин	РС-30, мкм	ПС, усл. ед.
Инкубация в течение 30 мин					
Контроль	3.0 ± 1.6	53.3 ± 16.7	32.8 ± 13.1	868.0 ± 180.1	13679.0 ± 2395.0
Опыт	14.8 ± 5.7*	14.3 ± 6.2*	16.8 ± 7.2*	341.1 ± 114.3*	9116.0 ± 2086.0*
Инкубация в течение 3 ч					
Контроль	1.0 ± 0.3	59.7 ± 4.8	37.0 ± 9.0	1329.0 ± 244.7	16182.0 ± 2797.0
Опыт	1.4 ± 0.6	61.8 ± 6.7	33.5 ± 5.2	1258.0 ± 189.8	13971.5 ± 3294.5

Примечание. ЗРС – задержка роста сгустка, НСП – начальная скорость роста, ССР – стационарная скорость роста, РС-30 – размер сгустка на 30-й мин роста, ПС – плотность сгустка.

*Значимость различий ($p < 0.05$) по сравнению с контролем.

лизом в Na-K-фосфатный буфер (pH 7.3) и добавляли раствор тромбина («Sigma-Aldrich») из расчета 1 ед. акт. на 1 мг слитого белка. Расщепление вели в течение 10 ч при 4°C. Смесь белков СуРА и GST разделяли на колонке GSTrap FF. Раствор СуРА освобождали от тромбина на колонке HiTrap Benzamide FF («GE Healthcare»). Полноту реакции контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ). Чистота используемого белка составила ~98%.

Влияние ЦФА *in vitro* на пространственную динамику роста сгустка изучали с использованием венозной крови здоровых доноров, полученную самотеком из периферической вены и стабилизированную 3.7% раствором цитрата натрия в соотношении цитрат : кровь = 1 : 9.

Пробы крови центрифугировали при 1500 об/мин в течение 7 мин. Плазму, богатую тромбоцитами, делили на две части. Первая часть служила контролем (К), во вторую часть (опыт – О) добавляли ЦФА в конечной концентрации 10 или 50 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 30 мин и 3 ч при постоянном перемешивании для предотвращения оседания тромбоцитов. В качестве вещества сравнения использовали гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) в конечной концентрации 20 мкг/мл.

По прошествии времени инкубации богатую тромбоцитами плазму центрифугировали при 13700 об/мин в течение 10 мин. Плазму без тромбоцитов использовали для изучения пространственной динамики роста сгустка в соответствии с инструкцией к прибору «Тромбоимиджер-2» (ООО «ГемаКор», Россия).

Регистрировали задержку роста сгустка, или лаг-фазу (мин), начальную (мин) и стационарную (мин)

скорости роста сгустка, размер сгустка на 30-й мин роста (мкм), плотность сгустка (усл. ед.), спонтанное тромбообразование в объеме камеры.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием критерия Манна-Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Параметры пространственной динамики роста сгустка при инкубации богатой тромбоцитами плазмы с ЦФА в течение 30 мин и 3 ч представлены в *таблице*.

Как видно из *таблицы*, 30-минутная инкубация богатой тромбоцитами плазмы с ЦФА в конечной концентрации 10 мкг/мл статистически значимо тормозила пространственную динамику роста сгустка, т.е. ЦФА обнаруживал свойства вещества с гипокоагуляционной активностью. При этом в двух образцах контрольной группы зарегистрировано спонтанное тромбообразование в объеме измерительной камеры. Инкубация с ЦФА предотвращала развитие спонтанного тромбообразования в системе. Однако этот эффект был кратковременным, и через 3 ч различия в параметрах пространственной динамики роста сгустка исчезали (*таблица*).

Не выявлено дозозависимого влияния препарата на рост сгустка при инкубации проб богатой тромбоцитами плазмы с ЦФА в конечной концентрации 50 мкг/мл. Параметры пространственной динамики образования сгустка были такими же, как при инкубации с ЦФА в конечной концентрации 10 мкг/мл. После 3 ч инкубации не наблюдали замедления роста сгустка.

ГКСФ не оказывал какого-либо влияния на величины определенных нами показателей, которые были сравнимы с величинами в контрольной группе.

ОБСУЖДЕНИЕ

В организме сгусток образуется не во всем объеме крови, а строго локально – только в небольшой зоне повреждения стенки кровеносного сосуда. При повреждении стенки сосуда в кровь экспонируется тканевый фактор – белок, иммобилизованный на мембране клеток сосудистой стенки, которые до повреждения закрыты слоем эндотелия. При этом диффузия факторов свертывания играет важную роль в процессе пространственного роста сгустка и его локализации. Отдельные патологии специфически влияют на активность компонентов системы свертывания, приводя к выраженным изменениям в различных фазах процесса. Нарушения в механизмах гемокоагуляции клинически проявляются либо кровотечением, либо тромбозом, либо их сочетанием.

Однако в значительной степени процесс тромбообразования происходит в организме в пространственно неоднородных условиях. Поэтому роль отдельных реакций свертывания может проявляться по-разному в *in vitro*-экспериментах при перемешивании и *in vivo* [5].

Метод регистрации пространственной динамики роста сгустка основан на контакте крови с тканевым фактором в измерительной кювете с иммобилизованным тромбопластином [6]. Появление и пространственный рост сгустка от активатора регистрируется по светорассеянию методом темного поля. При этом можно измерять такие важные характеристики процесса, как скорость роста, размер сгустка, образование спонтанных сгустков – информацию, которая недоступна гомогенным методам [7]. Это позволяет одновременно и независимо регистрировать нарушения на всех стадиях процесса.

Нами установлено также (неопубликованные данные), что *in vitro* ЦфА в дозе 10 мкг не влияет на внешний и внутренний пути свертывания крови. Однако уже через 10 мин инкубации с ЦфА наблюдалось увеличение уровня анти-Ха-активности плазмы в 8 раз относительно контрольных значений. После инкубации в течение 30 и 60 мин с белком уровень анти-Ха-активности хотя и снижался, но в 3 раза превышал уровень в контроле. Аналогичные данные получены в модельных опытах на животных. Введение ЦфА в дозе 100 мкг интактным мышам P815 сопровождалось статистически значимым повышением (в 3 раза) уровня ингибирования фактора Ха, а доза 200 мкг приводила к ингибированию фактора Ха, соответствующему 0.6 анти-Ха-Ед/мл. Представленные в данной статье результаты свидетельствуют о том, что ЦфА препятствует росту сгустка, замедляя скорость его образования через ингибирование

фактора Ха, а поскольку сгусток начинает расти не сразу и неравномерно, то возникновение тромба менее вероятно, поскольку в организме такой сгусток будет смываться током крови [8].

Система свертывания крови обладает пороговыми и автокаталитическими свойствами, поэтому ее поведение в пространстве может иметь много общего с активными средами. Атауллаханов и Гурия в 1994 г. выдвинули гипотезу, согласно которой пространственное (но не гомогенное) формирование сгустка происходит автоволновым образом [9]. Автоволновая фаза роста может быть нарушена при дефиците или ингибировании факторов внутреннего пути свертывания.

Автоволновое распространение тромбина не может тормозиться естественными ингибиторами, так как они не способны остановить автоволну в силу их однородного распределения в пространстве. Чтобы это произошло, нужно погасить автокаталитическое производство факторов свертывания. Гипотеза об автоволновом распространении процесса свертывания предполагает существование «двухавтоволнового» механизма остановки волны тромбина [10]. Считается, что в среде может запускаться вторая волна вещества, возникающего после появления тромбина и прекращающего его синтез. Если эта волна будет распространяться с большей скоростью, чем первая, то она сможет остановить движение первой волны.

К настоящему времени неизвестен ингибитор тромбина, который мог бы распространяться автокаталитическим образом. Предполагается, что тромбин может существовать в про- и антикоагулянтной формах [11]. В прокоагулянтном состоянии тромбин высокоактивен по отношению к фибриногену и слабо – к белку С; а в антикоагулянтной форме (вследствие изменения конформации тромбина в комплексе с некоторыми веществами) наоборот, высокоактивен в отношении белка С и малоактивен в отношении фибриногена [12]. Наши данные о влиянии ЦфА на пространственную динамику роста сгустка позволяют выдвинуть гипотезу о возможном воздействии ЦфА на механизм автоволнового процесса свертывания крови.

ВЫВОДЫ

Рекомбинантный человеческий циклофилин А обладает выраженным дозозависимым антикоагулянтным эффектом.

Рекомбинантный человеческий циклофилин А способен предотвращать спонтанное тромбообразование.

Антикоагулянтный эффект рекомбинантного человеческого циклофилина А сохраняется не более 2 ч. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khromykh L.M., Kulikova N.L., Anfalova T.V., Muranova T.A., Abramov V.M., Vasiliev A.M., Khlebnikov V.S., Kazansky D.B. // *Cell Immunol.* 2007. V. 249. № 1. P. 46–53.
2. Xu Q., Leiva M.C., Fischkoff S.A., Handschumacher R.E., Lyttle C.R. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 1168–1171.
3. Coppinger J.A., Cagney G., Toomey S., Kislinger T., Belton O., McRedmond J.P., Cahill D.J., Emili A., Fitzgerald D.J., Maguire P.B. // *Blood.* 2004. V. 103. № 6. P. 2094–2104.
4. Lay A., Jiang X.M., Kisker O., Flynn E., Underwood A., Condron R., Hogg P.J. // *Nature.* 2000. V. 408. P. 869–873.
5. Tijburg P.N., Ryan J., Stern D.M., Wollitzky B., Rimon S., Rimon A., Handley D., Nawroth P., Sixma J.J., de Groot P.G. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 18. P. 12067–12074.
6. Атауллаханов Ф.И., Гурия Г.Т. // *Биофизика.* 1994. Т. 39. № 1. С. 89–96.
7. Kondratovich A.Y., Pokhilko A.V., Ataulakhanov F.I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1569. № 1–3. P. 86–104.
8. Ованесов М.В. Влияние факторов внутреннего пути свертывания крови на пространственную динамику роста сгустка. М.: ГУ ГНЦ РАМН, 2002.
9. Атауллаханов Ф.И., Гурия Г.Т., Сафрошкина А.Ю. // *Биофизика.* 1994. Т. 39. № 1. С. 97–106.
10. Атауллаханов Ф.И., Волкова Р.И., Похилко А.В., Синауридзе Е.И. // *Биофизика.* 1994. Т. 39. № 4. С. 713–720.
11. Атауллаханов Ф.И. // *Соросовский образовательный журн.* 2000. Т. 6. № 7. С. 2–10.
12. Griffin J.H. // *Nature.* 1995. V. 378. № 6555. P. 337–338.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал «Acta Naturae» публикует экспериментальные и обзорные статьи, мини-обзоры, краткие сообщения, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается издательским домом «Парк-медиа» на русском и английском языках. Журнал «Acta Naturae» входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России.

Редакция журнала «Acta Naturae» просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков (примерно 40 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков (20 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10. Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (8 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать четырех.

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

При подаче статьи авторы заключают с редакцией договор о передаче права на использование произведения. Форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru. Договор, подписанный от имени всего авторского коллектива первым или последним автором, следует выслать на адрес редакции: 119311, Москва, а/я 136, редакция журнала «ActaNaturae», или принести в редакцию по адресу: Москва, Ленинские горы, Научный парк МГУ, влад. 1, стр. 75Г, офис 621.

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 μ М; нм, но не nm).

- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (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 специалиста 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) 930-80-05.

CompoZr[®] Zinc Finger Nucleases

Celebrating Five Years of Innovation with ZFNs



Functional Genomics

Special Price for our ZFN Customers

2012 marks the fifth year since Sigma® Life Science licensed ZFN technology from Sangamo™ BioSciences. To celebrate this milestone Sigma is providing the following promotion to all previous CompoZr ZFN customers:

- A 50% discount off the list price for one Custom ZFN Service project or a 25% discount off the list price for one Knockout ZFN
- Offer is valid for one Custom ZFN Service project or one Knockout ZFN
- Order must be placed by June 30th, 2012

Provide your Feedback

Sigma Life Science would like to hear your feedback on CompoZr ZFNs. Please complete the brief survey at:

surveymonkey.com/s/zfns

For more information on our CompoZr ZFN technology, visit sigma.com/zfn

Evolution of CompoZr ZFNs

Since the launch of CompoZr ZFNs, Sigma Life Science has been committed to providing ZFNs to the research community with the following products:

- Custom ZFN Service – 2008
- Knockout ZFNs – 2009
 - Expanded to include all human, mouse and rat genes in 2011
- Targeted Integration Kits - 2010

Sigma Life Science has also been able to significantly reduce the price for CompoZr ZFNs since the initial launch thanks to improvements in ZFN design and manufacturing.

Ordering Information

To take advantage of this promotion contact your local Sigma Life Science representative:

Sigma-Aldrich Russia

Sales Specialist Vera Peneva, email: Vera.Peneva@ru.sial.com
Russia Moscow Ul. Makarenko, 2/21 Bld. 1, Office 22 Phone: +7(495) 621-58-28 / Fax: +7(495) 621-59-23
www.sigmaaldrich.com/russian-federation.html

Unlimited Genomic Engineering Possibilities in any Species or Cell Line

